

Stephany Beyerstedt

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA TERAPIA CONVENCIONAL E
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA PARA A
PRESERVAÇÃO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DE PODÓCITOS E
REDUÇÃO DA PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL DIABÉTICA EM
ANIMAIS BTBR^{ob/ob}**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

São Paulo

2023

Stephany Beyerstedt

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA TERAPIA CONVENCIONAL E
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA PARA A
PRESERVAÇÃO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DE PODÓCITOS E
REDUÇÃO DA PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL DIABÉTICA EM
ANIMAIS BTBR^{ob/ob}**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Érika Bevilaqua
Rangel

São Paulo

2023

Beyerstedt, Stephany

Avaliação da associação da terapia convencional e células-tronco mesenquimais da medula óssea para a preservação da estrutura e função de podócitos e redução da progressão da doença renal diabética em animais BTBR^{ob/ob} / Stephany Beyerstedt. -- São Paulo, 2023.

xiv, 74 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Evaluation of the association of conventional therapy and bone marrow mesenchymal stem cells for the preservation of podocyte structure and function and reduction of the progression of diabetic kidney disease in BTBR^{ob/ob} animal model.*

1. Nefropatias diabéticas. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Proteínas Klotho. 4. Estresse oxidativo.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo

Stephany Beyerstedt

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA TERAPIA CONVENCIONAL E
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA PARA A
PRESERVAÇÃO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DE PODÓCITOS E
REDUÇÃO DA PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL DIABÉTICA EM
ANIMAIS BTBR^{ob/ob}**

Presidente da banca: Profa. Dra. Érika Bevilaqua Rangel

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Luciana Cavalheiro Marti

Profa. Dra. Lucia da Conceição Andrade

Profa. Dra. Marimelia Aparecida Porcionatto

Membros suplentes:

Dra. Samirah Abreu Gomes

Profa. Dra. Natássia Cristina Martins Oliveira

Aprovada em: 17/01/2023.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus pais por me proporcionarem as condições necessárias para a minha formação tanto acadêmica quanto como pessoa.

À minha orientadora Dra. Érika Bevilaqua Rangel pela grande oportunidade de ingressar na pós-graduação, pela atenção e aprendizado.

Aos meus colegas do Grupo EBR, sendo tanto os alunos atuais quanto os que passaram pelo grupo ao longo desses anos. Agradeço o acolhimento e a paciência quando cheguei à instituição. A colaboração de todos foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao meu colega de laboratório Eduardo Varejão pelo auxílio e amizade.

À minha amiga Marcella Liciani Franco pela amizade e suporte desde a graduação até o final do mestrado. Sinto-me privilegiada pela parceria de longa data que me proporciona risadas até hoje.

Aos colaboradores do IIEP e do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC), alunos e pesquisadores de outros grupos pela ajuda e pelo companheirismo.

Por fim, o presente trabalho foi realizado com apoio do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein, da agência FAPESP (processo 2021/02216-7) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sumário

Agradecimentos.....	v
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	x
Resumo	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Incidência e prevalência do <i>diabetes mellitus</i>	1
1.2 Doença renal diabética.....	1
1.3 Fisiopatologia	2
1.4 Podócitos.....	5
1.5 Sistema renina-angiotensina-aldosterona	8
1.6 Via Ang II/Nox4/TRPC6	10
1.7 Tratamento convencional da doença renal diabética	11
1.7.1 Tratamento medicamentoso	11
1.7.2 Ação hemodinâmica do inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2	14
1.7.3 Ação não-hemodinâmica do inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2	14
1.8 Células-tronco mesenquimais	16
1.9 Objetivo	20
2 MÉTODOS	21
2.1 Local do estudo	21
2.2 Aspectos éticos e legais	21
2.3 Cultura primária de CTMs-MO.....	21
2.4 Grupos e delineamento experimental <i>in vivo</i>	23
2.4.1 BTBR ^{ob/ob}	23
2.4.2 Genotipagem	25
2.4.3 Manuseio	26
2.4.4 Grupos e delineamento experimental	26
2.4.5 Grupo experimental: inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2	27
2.4.6 Grupo experimental: inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2 + restrição calórica	27
2.4.7 Grupo experimental: inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2 + restrição calórica + CTMs-MO.....	28

2.4.8 Grupo experimental: transplante de gordura	29
2.4.9 Glicemia capilar de jejum.....	31
2.4.10 Análise bioquímica urinária.....	32
2.4.11 Creatinina sérica.....	32
2.4.12 Avaliação histológica	32
2.4.13 Hematoxilina e eosina	33
2.4.14 Ácido periódico de Schiff	33
2.4.15 Imuno-histoquímica	33
2.5 Avaliação da expressão gênica	33
2.6 Avaliação dos resultados.....	34
3 RESULTADOS	36
3.1 Transplante de gordura como grupo comparável ao animal BTBR <i>wild-type</i>	36
3.2 Consumo de ração	37
3.3 Variação do peso.....	38
3.4 Glicemia de jejum	39
3.5 Morfometria das ilhotas pancreáticas	40
3.6 Taxa de filtração glomerular	41
3.7 Glicose e sódio urinários	42
3.8 Albuminúria.....	44
3.9 Análise histológica glomerular	45
3.10 Expressão gênica	47
3.11 Peroxidação lipídica	50
3.12 Quantificação de podócitos	51
4 DISCUSSÃO	53
5 CONCLUSÕES	65
6 ANEXOS.....	66
7 REFERÊNCIAS	69
Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. Estágios da doença renal crônica de acordo com a taxa de filtração glomerular e níveis de albuminúria e classificação de risco para progressão da doença renal de estágio terminal	2
Figura 2. Mediadores da lesão renal induzida por hiperglicemia crônica via desequilíbrio redox e inflamação na patogênese da doença renal diabética.....	4
Figura 3. Barreira de filtração glomerular e alteração de seus componentes em condição fisiológica e na doença renal diabética.....	6
Figura 4. Esquema do complexo proteico da fenda diafragmática	7
Figura 5. Esquema do sistema renina-angiotensina-aldosterona e efeitos associados a ativação dos eixos ECA/Ang II/AT1 e ECA2/Ang (1-7)/Mas.....	9
Figura 6. Esquema representativo da ativação da via Ang II/Nox4/TRPC6 e seu efeito deletério sobre a arquitetura do podócito e proteinúria. A ação da AngII através do receptor AT1R promove a produção de peróxido de hidrogênio pela Nox4. O H ₂ O ₂ , por sua vez, ativa o canal TRPC6 e o influxo de cálcio. Como estrutura cálcio-dependente, ocorre a reorganização do citoesqueleto e, como consequência, a quebra da barreira de filtração glomerular	10
Figura 7. Esquema representativo do <i>feedback</i> túbuloglomerular em condições fisiológicas, na doença renal diabética e com a administração de iSGLT2. SGLT2, cotransportador de sódio e glicose 2. AJG, aparelho justaglomerular.....	13
Figura 8. Tratamento convencional da doença renal diabética e terapia baseadas em células-tronco mesenquimais como estratégia para diminuição da progressão da doença	17
Figura 9. Esquema representativo da hipótese do trabalho. A utilização de CTMs-MO é uma estratégia para a redução da ativação da via AngII/Nox4/TRPC6, como forma de preservar a arquitetura do citoesqueleto do podócito e sua função na barreira de filtração glomerular.....	20
Figura 10. Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea isoladas de camundongos Rosa26/mTmG.....	23
Figura 11. Glicemia e proteinúria de animais BTBR ^{ob/ob} machos e fêmeas em comparação a animais BTBR <i>wild-type</i>	24
Figura 12. Genotipagem de animais BTBR ^{ob/ob}	25

Figura 13. Delineamento experimental <i>in vivo</i>	29
Figura 14. Procedimento cirúrgico do transplante de gordura	31
Figura 15. Comparação de dados funcionais de animais BTBR ^{ob/ob} , Tx e BTBR <i>wild-type</i>	37
Figura 16. Consumo de ração ao longo do tempo dos animais BTBR <i>wild-type</i> , BTBR ^{ob/ob} , iSGLT2, iSGLT2 + RC e iSGLT2 + RC + CTMs-MO	38
Figura 17. Variação do ganho de peso ao longo do tempo dos animais BTBR ^{ob/ob} , iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx	39
Figura 18. Avaliação da área das ilhotas pancreáticas em 14-15 e 18-20 semanas de idade dos grupos BTBR ^{ob/ob} , iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx	41
Figura 19. Variação da taxa de filtração glomerular ao longo do tempo dos grupos experimentais	42
Figura 20. Níveis de glicosúria e natriurese ao longo do tempo dos grupos BTBR ^{ob/ob} , iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx	43
Figura 21. Avaliação da progressão da albuminúria ao longo do tempo nos grupos experimentais	45
Figura 22. Avaliação da área glomerular em 14-15 e 18-20 semanas de idades dos grupos BTBR ^{ob/ob} , iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx.....	46
Figura 23. Avaliação da expansão mesangial em 14-15 e 18-20 semanas de idades dos grupos BTBR ^{ob/ob} , iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx.....	46
Figura 24. Deposição de matriz mesangial nos animais BTBR ^{ob/ob} , iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2+ RC + CTMs-MO, e Tx, de 14 a 15 semanas e 18 a 20 semanas de idade	47
Figura 25. Expressão gênica de marcadores podocitários e renoprotetores e componentes da via Ang II/Nox 4/TRPC6 e ECA2 e Klotho nos grupos experimentais em relação ao BTBR ^{ob/ob} nos time-points de 14 a 15 semanas e 18 a 20 semanas de idade	49
Figura 26. Avaliação do estresse oxidativo através da peroxidação lipídica pelo marcador 4-HNE nos grupos experimentais.....	51
Figura 27. Mensuração da quantidade de podócitos nos grupos experimentais através da marcação de <i>Wilms' tumour-1</i>	52

Lista de abreviaturas

AGEs	<i>Advanced glycation end-product</i>
Ang (1-7)	Angiotensina (1-7)
Ang (1-9)	Angiotensina (1-9)
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AT1R	<i>Angiotensin II type 1 receptor</i>
BMP-7	<i>Bone morphogenetic protein 7</i>
BTBR	<i>Black and tan brachyury</i>
BTBR ^{ob/ob}	<i>Black and tan brachyury obese</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CETEC	Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CPE	Centro de Pesquisa Experimental
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTM-MO	Célula-tronco mesenquimal da medula óssea
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DRD	Doença renal diabética
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF-23	<i>Fibroblast growth factor-23</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e eosina
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen</i>

HO-1	Heme oxigenase-1
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ	Interferon-gama
IIEPAE	Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
MBG	Membrana basal glomerular
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
Nox	NADPH oxidase
Nox4	NADPH oxidase 4
O ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
PD-L2	<i>Programmed cell death ligand 2</i>
PGE2	Prostaglandina E2
PKC	<i>Protein kinase C</i>
RAGEs	<i>Receptor for advanced glycation end-products</i>
RC	Restrição calórica
RNA _m	RNA mensageiro
RPM	<i>Rotations per minute</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i>
Sca-1	<i>Stem cell antigen-1</i>
SFB	Soro fetal bovino
SGLT1	<i>Sodium-glucose co-transporter 1</i>
SGLT2	<i>Sodium-glucose co-transporter 2</i>
SGPP	Sistema Gerenciador de Projeto de Pesquisa
SOD	Superóxido dismutase
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRPC6	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily C member 6</i>
Tx	Transplante de gordura
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WT-1	<i>Wilms' tumour-1</i>

Resumo

Introdução: A doença renal diabética é uma das complicações do *diabetes mellitus* e é caracterizada pela perda da função renal e proteinúria progressivas. A hiperglicemia crônica e ação da angiotensina II promovem o estresse oxidativo no podócito, afetando sua arquitetura e função. A menor ativação do eixo renoprotetor composto pela enzima conversora de angiotensina 2/angiotensina (1-7)/receptor Mas e o direcionamento para o eixo composto pela enzima conversora de angiotensina/angiotensina II/receptor de angiotensina 1 causa o aumento de espécies reativas de oxigênio através da modulação da NADPH oxidase 4 e, assim, a reorganização do citoesqueleto dessas células através do aumento do influxo de cálcio intracelular pelo canal catiônico potencial de receptor transitório, subfamília C, membro 6. A terapia convencional baseada em mudança nos hábitos de vida e em medicações apresenta a capacidade de retardar e reduzir a progressão da doença, porém são necessárias abordagens complementares que visem à reparação das estruturas danificadas. Nesse sentido, a terapia com células-tronco mesenquimais se configura como uma estratégia para a restauração da função renal prejudicada. **Objetivos:** Avaliar o potencial terapêutico da terapia convencional em associação a células-tronco mesenquimais para retardar a progressão da doença renal diabética. **Métodos:** Utilizamos no modelo murino pré-clínico de diabetes tipo 2 e doença renal diabética BTBR^{ob/ob} em diferentes condições experimentais nas quais testamos a terapia convencional utilizada na clínica (sendo essa abordagem tanto medicamentosa, com inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2, quanto na mudança dos hábitos de vida, representada pela restrição calórica) em associação ou não a administração de células-tronco mesenquimais da medula óssea. Nesse animal, avaliamos ganho de peso, glicemia, glicosúria, natriurese, morfometria da área glomerular e de ilhotas pancreáticas, expansão mesangial, proteinúria e taxa de filtração glomerular, e expressão gênica de marcadores podocitários (sinaptopodina, α -actinina-4, nefrina e *Wilms' tumour-1*), de componentes da via angiotensina II/NADPH oxidase 4/ canal catiônico potencial de receptor transitório, subfamília C, membro 6; do sistema renina-angiotensina-aldosterona (enzima conversora de angiotensina e enzima conversora de angiotensina 2), além de fatores renoprotetores (fator de crescimento de hepatócito e proteína Klotho). Em adição, também avaliamos o potencial de reversibilidade do fenótipo da doença nesse modelo através da metodologia do transplante de gordura e,

assim, utilizamos essa estratégia como comparação às abordagens terapêuticas propostas. **Resultados:** Observamos potencial elevado para o controle glicêmico com a terapia combinada em comparação à monoterapia com a medicação e ao Grupo BTBR^{ob/ob}, além de diminuição da progressão da expansão mesangial e da albuminúria. Ademais, também constatamos que essa abordagem promove maior aumento da enzima conversora de angiotensina 2, indicando o direcionamento para o eixo da enzima conversora de angiotensina 2/angiotensina (1-7)/receptor Mas, levando ao menor estresse oxidativo tecidual, manutenção da expressão de fatores renoprotetores e preservação do número de podócitos e da expressão de seus marcadores. **Conclusões:** A estratégia terapêutica da associação da terapia convencional a células-tronco mesenquimais apresenta maior potencial renoprotetor, com preservação da estrutura e função de podócitos.

Descritores: Nefropatias diabéticas; Células-tronco mesenquimais; Proteínas Klotho; Estresse oxidativo

1 INTRODUÇÃO

1.1 Incidência e prevalência do *diabetes mellitus*

O *diabetes mellitus* (DM) é uma desordem metabólica associada à hiperglicemia crônica resultante da resistência dos tecidos à insulina e/ou deficiência na sua secreção. Atualmente, é considerada uma doença epidêmica com alta mortalidade e morbidade com expectativa de aumento do número de casos nas próximas décadas, sendo uma das emergências de saúde global de mais rápido crescimento no século XXI, segundo a Confederação Internacional do Diabetes.⁽¹⁾

Em 2021, havia cerca de 537 milhões de indivíduos diabéticos, o que representa 10,5% da população mundial, e devido às mudanças no estilo de vida e ao envelhecimento populacional, estima-se que sua prevalência aumente para 783 milhões de pessoas convivendo com a doença até 2045.⁽¹⁾

O DM representa um grande desafio para os serviços de saúde, uma vez que o diabético corre o risco de desenvolver complicações debilitantes e fatais, havendo a maior necessidade de cuidados médicos, diminuição da qualidade de vida e morte prematura. Estima-se que 11,8% das mortes em adultos abaixo de 60 anos de idade estiveram associadas ao DM e suas complicações, em 2021.⁽¹⁾ O Brasil, por exemplo, é o sexto país com maior número de adultos afetados pela doença e o terceiro com maiores gastos com saúde relacionados ao DM.⁽¹⁾

1.2 Doença renal diabética

Uma vez que a prevalência do DM aumenta, ocorre também maior incidência de suas complicações. Dentre elas, estão as complicações macrovasculares, sendo elas a doença arterial coronariana, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, acidente vascular encefálico e doença vascular periférica, e microvasculares, as quais atingem vasos de menor calibre, sendo elas a retinopatia, neuropatia periférica e doença renal diabética (DRD). Além disso, o DM está associado ao maior risco de infecções, desenvolvimento de câncer e deficiências cognitivas e funcionais.⁽²⁾

A DRD é uma condição progressiva que se desenvolve em 30 a 40% dos pacientes e representa a principal causa de insuficiência renal crônica no mundo, estágio em que as únicas opções terapêuticas são a diálise e o transplante renal.⁽¹⁾ É uma doença multifatorial caracterizada pela redução da taxa de filtração glomerular (TFG) em associação ou não à excreção urinária de albumina, sendo ambas preditoras independentes da evolução da doença renal e do risco de mortalidade⁽³⁾ (Figura 1).

				Categorias de albuminúria		
				A1	A2	A3
				Normal	Moderadamente aumentada (microalbuminúria)	Muito aumentada (macroalbuminúria)
				< 30 mg/g	30 mg/g – 299 mg/g	≥ 300 mg/g
Categorias de TFG (mL/min/1,73m ²)	G1	Normal ou alta	≥ 90			
	G2	Levemente diminuída	60-90			
	G3a	Leve/moderadamente diminuída	45-59			
	G3b	Moderadamente diminuída	30-44			
	G4	Muito diminuída	15-29			
	G5	Falência renal	< 15			

	Risco baixo	Risco intermediário	Risco alto
			Risco muito alto

Fonte: Traduzido de Sá JR, Rangel EB, Canani LH, Bauer AC, Escott GM, Zelmanovitz T, et al. The 2021-2022 position of Brazilian Diabetes Society on diabetic kidney disease (DKD) management: an evidence-based guideline to clinical practice. Screening and treatment of hyperglycemia, arterial hypertension, and dyslipidemia in the patient with DKD. *Diabetol Metab Syndr.* 2022;14(1):81. Figure 1, Stages of chronic kidney disease according to glomerular filtration rate (GFR) and albuminuria levels and risk rating for progression to end-stage kidney disease.

Figura 1. Estágios da doença renal crônica de acordo com a taxa de filtração glomerular e níveis de albuminúria e classificação de risco para progressão da doença renal de estágio terminal

1.3 Fisiopatologia

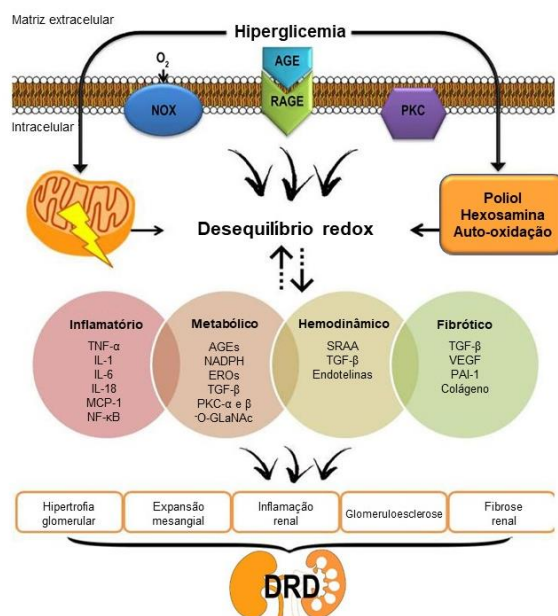
A hiperglicemia é o principal fator responsável pelo desenvolvimento da DRD. O aumento da glicose causa um estado de glicotoxicidade por meio do aumento acelerado de produtos de glicação avançada (AGEs – *advanced glycation end-product*), formados a partir da reação não enzimática de redução de macromoléculas que as torna altamente reativas. AGEs presentes na circulação sanguínea se ligam aos seus

receptores (RAGEs – *receptor for advanced glycation end-products*) na membrana plasmática de células endoteliais e, junto da ação da NADPH oxidase 4 (Nox4) e proteína quinase C (PKC – *protein kinase C*), também ativadas pela hiperglicemia, promovem a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).

As EROs abrangem um grupo de moléculas derivadas do oxigênio molecular, que são formadas por reações de redução-oxidação (redox) ou por excitação de elétrons. Geradas como subprodutos naturais do metabolismo celular, sendo os principais tipos o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), as ERO são altamente reativas e sua ação causa alterações pós-translacionais de estruturas proteicas, lipídicas e do DNA. Assim, em condições fisiológicas, esses compostos atuam como mensageiros secundários em cascatas de sinalização de diversos processos celulares e, nesse sentido, são fundamentais para a homeostase celular.⁽⁴⁾

O metabolismo celular é caracterizado por estados estacionários com oscilações entre eles como mecanismo de adaptação a alterações ambientais. Nesse sentido, para manter os níveis de EROs em concentrações fisiológicas, a célula predispõe de diferentes estratégias para controlar a sua produção e disponibilidade. O H_2O_2 , por exemplo, leva a alterações reversíveis em alvos proteicos quando em níveis estacionários, porém as modificações se tornam permanentes quando o H_2O_2 está em excesso. Portanto, de forma a evitar o acúmulo desses compostos, há mecanismos de compartimentalização de geração de EROS e defesa antioxidante por meio de compostos de baixa massa molecular, como vitaminas, micronutrientes e cofatores, e, principalmente, através da ação de enzimas, sendo alguns exemplos a superóxido dismutase (SOD), peroxirredoxinas, glutathione peroxidase e heme oxygenase-1 (HO-1).⁽⁴⁻⁶⁾

Entretanto, condições estressoras, como a hiperglicemia, acarretam um estado de estresse oxidativo, isto é, o desbalanço entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante da célula.⁽⁵⁾ Dessa maneira, o estresse oxidativo promovido pela hiperglicemia crônica está relacionado a diversos processos inflamatórios, metabólicos, hemodinâmicos e fibróticos que contribuem para a progressão da DRD (Figura 2).



Fonte: Adaptado de Amorim RG, Guedes GD, Vasconcelos SM, Santos JC. Doença renal do diabetes: cross-linking entre hiperglicemia, desequilíbrio redox e inflamação. Arq Bras Cardiol. 2019;112(5):577-87. Figura 3 – Mediadores de lesão renal induzidos por hiperglicemia crônica via desequilíbrio redox e inflamação na patogênese da DRD; p. 585.

Figura 2. Mediadores da lesão renal induzida por hiperglicemia crônica via desequilíbrio redox e inflamação na patogênese da doença renal diabética

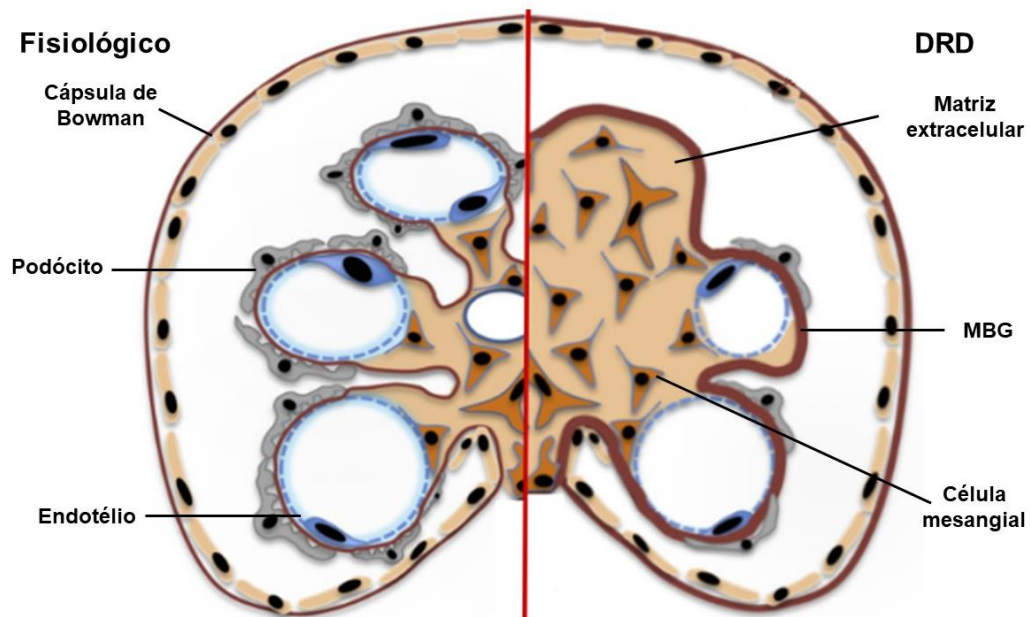
Ainda, o desenvolvimento da DRD, assim como outras patologias renais agudas e crônicas, relaciona-se à redução da secreção e ação de fatores renoprotetores, tais como o fator de crescimento de hepatócito (HGF – *hepatocyte growth factor*) e a proteína Klotho, considerados biomarcadores de progressão da doença.⁽⁷⁻¹¹⁾ O HGF é uma proteína que desempenha um papel crucial em vários processos fisiológicos do corpo humano. No rim, sua ação estimula a angiogênese e reparo e regeneração tecidual por meio de seu efeito antifibrótico e antiapoptótico.⁽⁷⁾

O Klotho, também chamado de α -Klotho por sua vez, possui duas isoformas: uma transmembrana ancorada à membrana plasmática, e uma isoforma solúvel. A primeira é amplamente expressa no tecido renal e está envolvida no metabolismo do fosfato, pois atua como correceptora do fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF-23 – *fibroblast growth factor-23*); e na modulação do paratormônio e síntese de vitamina D.⁽⁸⁾

Já a isoforma secretada, por sua vez, é originada a partir da clivagem da porção extracelular da proteína transmembrana, e está presente na circulação sistêmica, atuando como um fator com ação tanto renal quanto extrarrenal. Assim como a proteína ancorada à membrana, o Klotho solúvel realiza as funções dependentes de FGF-23, porém agindo de forma parácrina e endócrina. Contudo, essa isoforma também apresenta funções independente de FGF-23, tais como ação antioxidante, antiapoptótica, antissenescente, entre outras.⁽⁹⁾

1.4 Podócitos

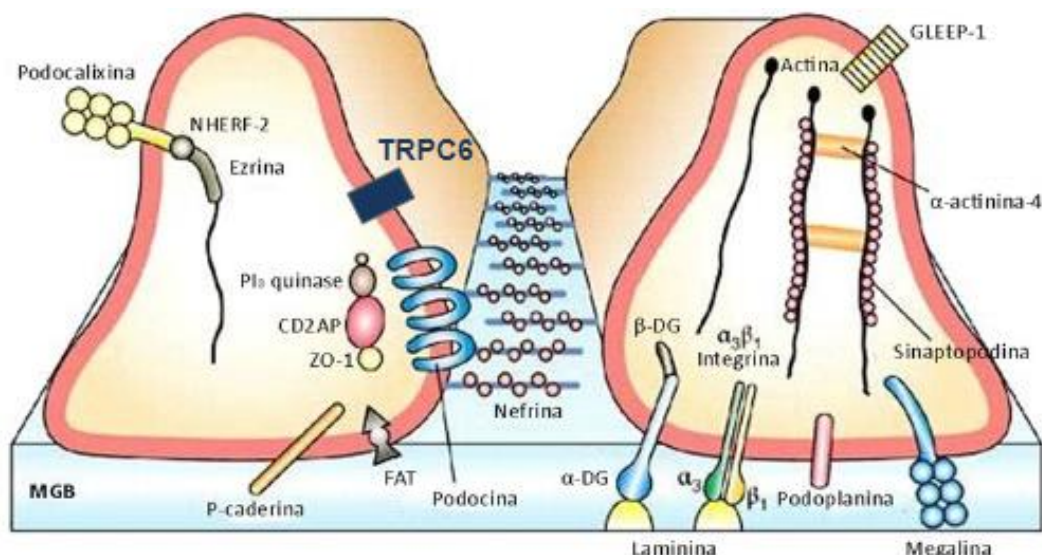
A barreira de filtração glomerular é a estrutura responsável pela permeabilidade seletiva durante a filtração do sangue no glomérulo, de forma a impedir a excreção de proteínas na urina. É composta por três camadas, sendo elas: o endotélio fenestrado e seu revestimento de glicocálix composto por proteoglicanos; a membrana basal glomerular (MBG) e células mesangiais, cuja função é garantir suporte estrutural aos capilares glomerulares e manutenção da matriz mesangial; e, por fim, os podócitos compõem a camada visceral. Na DRD, no entanto, essa estrutura sofre uma série de alterações: espessamento da MGB; expansão mesangial decorrente da proliferação de células mesangiais; e a perda de podócitos (Figura 3).



Fonte: Adaptado de Gnudi L, Coward RJ, Long DA. Diabetic nephropathy: perspective on novel molecular mechanisms. Trends Endocrinol Metab. 2016;27(11):820-30. Figure 1, Schematic structure of normal and diabetic glomeruli; p. 821.

Figura 3. Barreira de filtração glomerular e alteração de seus componentes em condição fisiológica e na doença renal diabética

Os podócitos são células terminalmente diferenciadas e especializadas cuja estrutura está diretamente relacionada à sua função na manutenção da barreira de filtração glomerular. Sua estrutura consiste em um corpo celular e protusões citoplasmáticas que se estendem de pedicelos primários a numerosos processos podocitários. Estes circundam os capilares glomerulares, além de formarem junções célula-célula com processos podocitários adjacentes de células vizinhas, criando fendas diafragmáticas.



Fonte: Adaptado de Meyrier A. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. Nat Clin Pract Nephrol. 2005;1(1):44-54. Figure 1, Artist's view of the arrangement of the podocyte foot process and slit diaphragm proteins. Space restrictions prevent all molecules from being shown. A more detailed representation can be found in references 1, 3 and 60. CD2AP, CD2-associated protein; DG, dystroglycan; FAT, mammalian homolog of *Drosophila* fat protocadherin; GBM, glomerular basement membrane; GLEPP-1, glomerular epithelial protein-1; NHERF-2, Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-2; ZO-1, zona occludens-1 protein.

Figura 4. Esquema do complexo proteico da fenda diafragmática

A fenda diafragmática, por sua vez, é um complexo proteico composto por componentes estruturais de diferentes tipos de junções celular, como junção de oclusão, adesão, *gap junctions* e neuronais (Figura 4). Nesse sentido, uma proteína expressa nessa região é a nefrina, responsável pela sinalização celular e manutenção da fenda por meio da interação com podócitos adjacentes.⁽¹²⁾ Sendo assim, tais componentes atuam na filtração de macromoléculas, ancoram o podócito à MBG, conectam a fenda ao citoesqueleto e integram o complexo de sinalização celular que integra os sinais intra e extracelulares que regulam a plasticidade dos pedicelos. Dessa forma, permitem que os podócitos executem as funções de regulação da permeabilidade glomerular, suporte estrutural aos capilares glomerulares, remodelamento da MBG e endocitose de proteínas filtradas.⁽¹²⁾

O citoesqueleto é responsável pela arquitetura dos podócitos. Ele é uma estrutura dinâmica composta por fibras contráteis e proteínas associadas, como a sinaptopodina, e α -actinina-4, as quais atuam na estabilização das fibras de actina e aderência da célula à MBG,⁽¹³⁾ respectivamente; e desempenha um papel essencial na preservação da integridade do podócito contra alterações patológicas no microambiente glomerular por meio da integração dos seus componentes estruturais.⁽¹²⁾ Os processos

podocitários são formados por fibras de actina e microtúbulos e dependem do citoesqueleto para participar da barreira de filtração através das interações célula-célula e célula-matriz. Nesse sentido, a função do podócito está diretamente ligada ao influxo adequado do cálcio intracelular e uma das proteínas principais para isso é o canal catiônico potencial de receptor transitório, subfamília C, membro 6 (TRPC6 – *transient receptor potential cation channel subfamily C member 6*).

O TRPC6 é uma proteína de membrana localizada na fenda diafragmática e participa de um complexo de sinalização com a nefrina, α -actinin-4, entre outras proteínas essenciais para a função podocitária.⁽¹²⁾ Sua ativação ocorre a partir de um estímulo, porém condições patológicas causam a hiperativação do canal e, conseqüentemente, o influxo excessivo de cálcio. Um exemplo é a angiotensina II (Ang II), cuja ação promove o aumento da atividade do TRPC6, além de elevar sua expressão.⁽¹⁴⁾

1.5 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

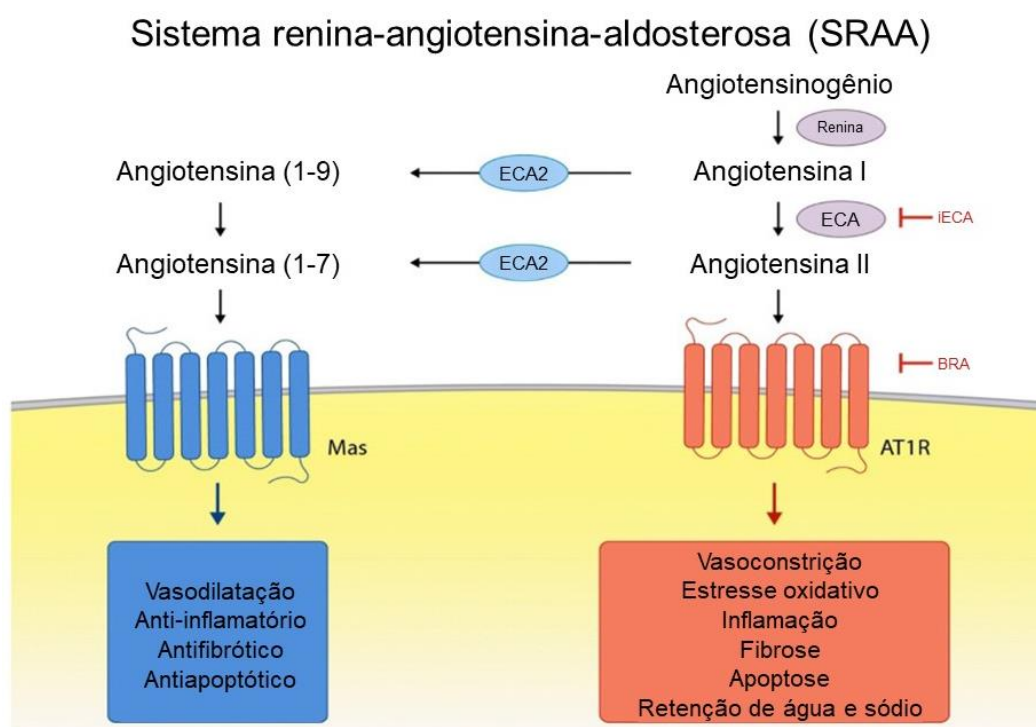
O SRAA é uma via de sinalização que atua como um regulador homeostático do fluxo sanguíneo sistêmico e local, pressão sanguínea, natriurese e respostas tróficas a uma ampla gama de estímulos.⁽¹⁵⁾

A ativação do sistema ocorre com a liberação de renina pela mácula densa nos rins mediante baixa concentração intratubular de sódio e estimulação nervosa simpática. A renina, por sua vez, converte o angiotensinogênio em angiotensina I no fígado. A partir de então, a angiotensina pode ser clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em Ang II, ou convertida a angiotensina (1-7) [Ang (1-7)] pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2)⁽¹⁵⁾ (Figura 5).

O eixo principal do SRAA é composto pela ECA/Ang II/receptores AT1 e AT2. A Ang II pode promover diferentes efeitos de acordo com o tipo de receptor, por exemplo, a ligação ao receptor AT1 estimula os efeitos clássicos da Ang II, que incluem aumento do estresse oxidativo, vasoconstrição, inflamação, fibrose e a retenção de água e sódio através do estímulo à liberação de aldosterona pelo córtex adrenal e liberação de hormônio antidiurético;⁽¹⁵⁾ enquanto a ligação do receptor AT2 promove efeitos opostos.⁽¹⁶⁾

Em contraposição, o outro eixo é composto pela via ECA2/Ang (1-7)/receptor Mas. A ECA2 atua na conversão de Ang I e Ang II a angiotensina (1-9) [Ang (1-9)] e Ang (1-7), respectivamente. Sua ação promove a atenuação dos efeitos da Ang II, uma vez que a cataboliza para a produção de a Ang (1-7), a qual se liga ao receptor Mas na membrana e promove vasodilatação, ação anti-inflamatória, antifibrótica e antiapoptótica e, portanto, exerce efeitos renoprotetores.^(15,16)

O DM, no entanto, está associado aos desbalanço ECA/ECA2 glomerular e tubular,⁽¹⁷⁾ em que há maior ativação do eixo ECA/Ang II/AT1. Dessa forma, a desregulação da ativação do SRAA representa um processo hemodinâmico que gera dano renal severo, uma vez que está associado aos efeitos deletérios da ação da Ang II/AT1, com exacerbada inflamação, fibrose, apoptose e estresse oxidativo.



Fonte: Traduzido de Beyerstedt S, Casaro EB, Rangel ÉB. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40(5):905-919. Figure 2, Renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS): ACE/ACE2 balance, pathophysiological mechanisms, and the impact of the RAAS blockers (ACEi and ARBs). ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARBs, angiotensin receptor blockers; p. 907.

Figura 5. Esquema do sistema renina-angiotensina-aldosterona e efeitos associados a ativação dos eixos ECA/Ang II/AT1 e ECA2/Ang (1-7)/Mas

1.6 Via Ang II/Nox4/TRPC6

Na DRD, a arquitetura do podócito é comprometida pela ação acentuada da Ang II.^(18,19) O aumento da ativação de SRAA estimulada pela hiperglicemia aumenta os níveis locais de Ang II, a qual através da ligação ao seu receptor *angiotensin II type 1 receptor* (AT1R), tem ação deletéria no podócito por promover o estresse oxidativo. A sinalização Ang II-AT1R promove a produção de H_2O_2 pela Nox4, uma isoforma da NADPH oxidase (Nox) bastante expressa no córtex que representa a principal fonte geradora de EROs no rim.⁽¹⁴⁾

O H_2O_2 , por sua vez, atua como um mensageiro secundário da célula e sua sinalização ativa o TRPC6, uma proteína presente na fenda diafragmática cuja ação resulta na reorganização do citoesqueleto tanto através do influxo de cálcio quanto de forma cálcio-independente. Ainda, o aumento do cálcio intracelular resulta também na fosforilação e ativação da calcineurina, a qual promove a translocação do fator de transcrição *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) e o aumento da expressão de TRPC6.⁽¹⁴⁾ Assim, tem-se uma regulação positiva persistente mediada pela sinalização Ang II/Nox4/TRPC6 (Figura 6).

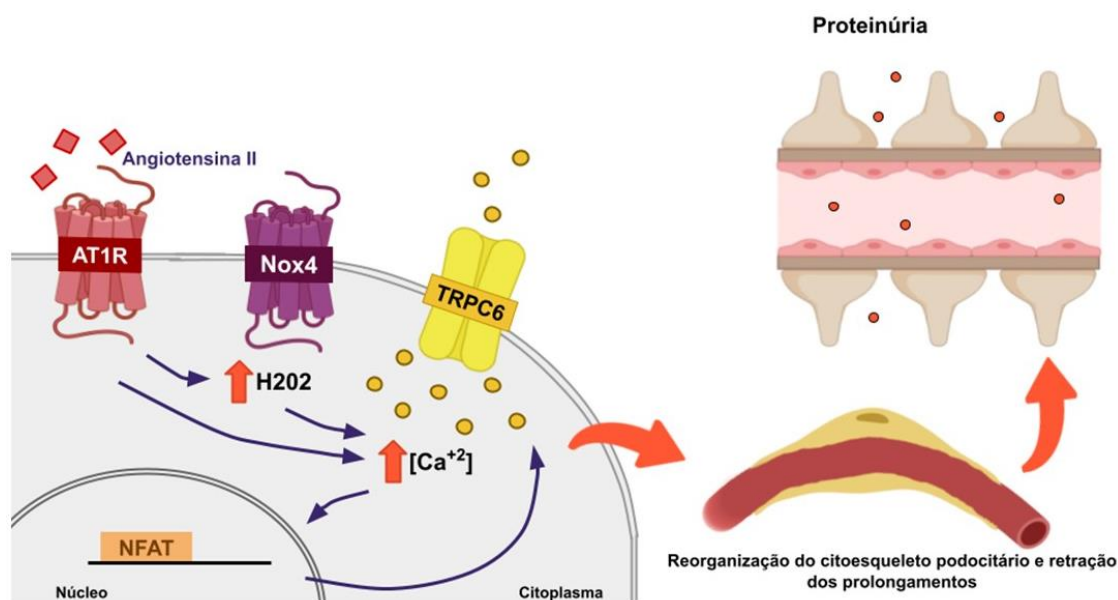


Figura 6. Esquema representativo da ativação da via Ang II/Nox4/TRPC6 e seu efeito deletério sobre a arquitetura do podócito e proteinúria. A ação da AngII através do receptor AT1R promove a produção de peróxido de hidrogênio pela Nox4. O H_2O_2 , por sua vez, ativa o canal TRPC6 e o influxo de cálcio. Como estrutura cálcio-dependente, ocorre a reorganização do citoesqueleto e, como consequência, a quebra da barreira de filtração glomerular

1.7 Tratamento convencional da doença renal diabética

Como mencionado, a fisiopatologia da DRD é composta por diferentes fatores que contribuem para o seu aparecimento e desenvolvimento. Sendo assim, não é apenas um processo envolvido no desenvolvimento da DRD e, portanto, é necessária a associação de diferentes abordagens terapêuticas para retardar ou prevenir sua progressão.

Nesse sentido, o tratamento aplicado na prática clínica atual consiste na combinação de mudanças dos hábitos de vida, como alteração dos hábitos alimentares e prática de exercícios físicos, perda de peso, interrupção do tabagismo, controle glicêmico e da pressão arterial, e terapia medicamentosa.⁽²⁰⁾

1.7.1 Tratamento medicamentoso

A terapia medicamentosa padrão-ouro atualmente consiste na associação dos bloqueadores do SRAA e inibidores do cotransportador de sódio e glicose 2 (SGLT2).

O bloqueio do SRAA ocorre pela utilização de fármacos inibidores da ECA e bloqueio do receptor AT1 (Figura 7). A utilização dessa classe de medicamentos reduz a pressão arterial sistêmica e também atua na atenuação da ação renal da Ang II, diminuindo a pressão intraglomerular e proteinúria.⁽²¹⁾ Todavia, apenas a utilização de bloqueadores do SRAA não impede por completo a progressão da doença. Por conta disso, recentemente foi adotado à prática o uso dos inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2 (iSGLT2).⁽²⁰⁾

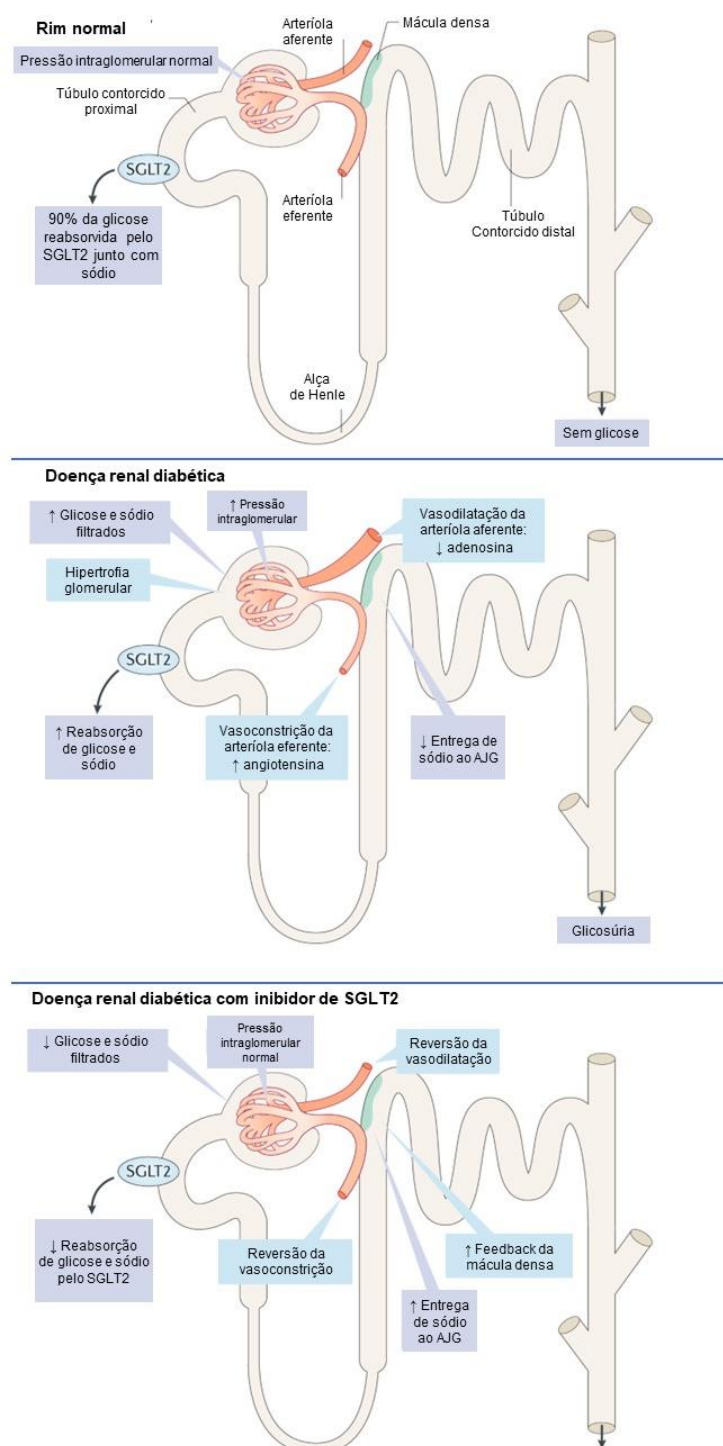
O processo de reabsorção da glicose ocorre no túbulo proximal, o qual expressa dois cotransportadores que realizam essa função, sendo eles o cotransportador de sódio-glicose (SGLT) 1 e 2. O SGLT2 faz o cotransporte de uma molécula de sódio para cada glicose internalizada, e é responsável por cerca de 90% da reabsorção de glicose.⁽²¹⁾ Desse modo, em condições fisiológicas, praticamente toda a glicose filtrada é captada e menos de 1% é excretada na urina.^(21,22)

Na DRD, todavia, a expressão dos cotransportadores está aumentada como forma de potencializar a reabsorção tubular em resposta à hiperglicemia.^(21,23) Todavia, esse mecanismo tem um impacto profundo sobre a ativação local do SRAA.

Isso ocorre, pois, o aumento da captação de glicose e, conseqüentemente, de sódio no túbulo proximal levam menores concentrações do íon à macula densa.

A mácula densa do aparelho justaglomerular, por sua vez, tem um papel central na regulação da TFG e pressão glomerular por meio do mecanismo de *feedback* túbuloglomerular (Figura 7). Em resposta à baixa concentração de sódio, a mácula densa secreta renina, levando ao aumento de Ang II intrarrenal, resultando na vasoconstrição da arteríola eferente. Além disso, a ativação da mácula densa também promove a redução da produção de adenosina, um nucleosídeo responsável pela vasoconstrição da arteríola aferente. Sendo assim, a ação da Ang II em associação à hiperglicemia induz alterações morfológicas e funcionais, tais como a hiperfiltração decorrente da vasodilatação da arteríola aferente, o aumento da pressão intraglomerular, expansão mesangial, espessamento da MBG, fibrose túbulo-intersticial e, principalmente, o dano podocitário induzido pelo estresse oxidativo, que compromete a barreira de filtração glomerular e leva à alteração da TGF e proteinúria.⁽²¹⁾

Nesse sentido, a inibição do SGLT2 impede a absorção de glicose e sódio e, assim, aumenta a concentração do íon que chega ao aparelho justaglomerular, reduzindo, assim, a hipertensão glomerular. Portanto, os iSGLT2 atuam tanto no controle glicêmico através do aumento da glicosúria, quanto na diminuição da pressão arterial, por meio do aumento da natriurese.⁽²¹⁾ De fato, estudos pré-clínicos e ensaios clínicos mostraram a capacidade dos iSGLT2 em retardar e reduzir a progressão da DRD através de mecanismos hemodinâmico e não-hemodinâmicos.⁽²⁴⁻²⁶⁾



Fonte: Traduzido de DeFronzo RA, Reeves WB, Awad AS. Pathophysiology of diabetic kidney disease: impact of SGLT2 inhibitors. Nat Rev Nephrol. 2021;17(5):319-334. Figure 3, The effect of *diabetes mellitus* and SGLT2 inhibitors on tubuloglomerular feedback; p. 323.

Figura 7. Esquema representativo do *feedback* túbuloglomeular em condições fisiológicas, na doença renal diabética e com a administração de iSGLT2. SGLT2, cotransportador de sódio e glicose 2. AJG, aparelho juxtaglomerular

1.7.2 Ação hemodinâmica do inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2

O uso de iSGLT2 também está associado à proteção cardiovascular. Como descrito, a inibição de SGLT2 promove a diminuição no volume de líquido intersticial e plasmático decorrente da natriurese, reduzindo a pressão arterial. Sendo assim, a menor ativação da mácula densa leva ao desbalanço de ECA/ECA2 que desvia a ativação do SRAA para o eixo ECA2/Ang (1-7)/Mas e seus efeitos protetores.^(15,16)

Ademais, a utilização dessa medicação também está associada a efeitos hemodinâmicos através da modulação de Klotho. Evidências recentes mostram que a terapia com iSGLT2, assim como inibidores do SRAA,⁽⁹⁾ promove o aumento dos níveis extracelulares dessa proteína.^(27,28) O Klotho, por sua vez, atua como modulador de canais de cálcio renais e antagonista do SRAA, enquanto condições deletérias, como aumento de Ang II, microambiente pró-inflamatório e proteinúria, reduzem a sua expressão.⁽⁸⁾

Além disso, os efeitos na pressão arterial também podem ser explicados pela menor ativação do sistema nervoso simpático. Isso ocorre, pois, o rim exige uma grande demanda energética, principalmente no túbulo proximal, necessária para manutenção dos transportadores. Nesse sentido, demanda alto aporte de oxigênio, porém o aumento da filtração e processos de reabsorção eleva também o consumo de oxigênio, levando a um estado de hipóxia tubular no DM.⁽²¹⁾

Assim, devido à maior demanda por oxigenação, ocorre o aumento da atividade nervosa simpática em resposta à atividade nervosa da arteríola aferente. Como resultado, gera a elevação da frequência cardíaca, retenção de fluídos e vasoconstrição sistêmica, efeitos que contribuem para o aumento da pressão arterial e sobrecarga cardíaca. A administração de iSGLT2, no entanto, ocorre a redução da demanda energética e de oxigênio, reduzindo, assim, a sobrecarga do sistema cardiovascular.⁽²⁹⁾

1.7.3 Ação não-hemodinâmica do inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2

Além disso, a inibição do SGLT2 apresenta também efeitos renoprotetores de forma independente da sua ação hemodinâmica. A utilização de iSGLT2 atenua o estado pró-inflamatório induzido pela hiperglicemia com diminuição reportada de, por exemplo, interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de

necrose tumoral alfa (TNF- α – *tumor necrosis factor alpha*), interferon-gama (IFN- γ), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1 – *monocyte chemoattractant protein-1*) além de reduzir infiltrados inflamatórios.^(21,30,31) Ademais, foi observado em modelos pré-clínicos, como efeito secundário a esse, a capacidade antifibrótica do uso de iSGLT2. A medicação reduz a deposição de matriz mesangial, fibrose intersticial e induz a ativação de macrófagos M2, com fenótipo reparador.⁽³⁰⁾

Os iSGLT2 também apresentam a capacidade de redução do estresse oxidativo glomerular e tubular.⁽²¹⁾ Além disto, o uso desses fármacos apresenta ação protetora em podócitos. Essas células expressam SGLT2 e sua quantidade aumenta no cenário de glicotoxicidade induzido por AGEs.⁽³²⁾ Sendo assim, a inibição do cotransportador previne a perda dos pedicelos, descolamento dessas células e apoptose, através do aumento do processo de autofagia, modulação do metabolismo energético e diminuição da ação da Ang II.^(21,31)

Ainda, é possível citar novamente a importância da ação dos iSGLT2 para a preservação da expressão de Klotho, de modo a manter a função podocitária. Os podócitos expressam Klotho e sua desregulação na hiperglicemia está associada à diminuição de sinaptopodina e desarranjo das fibras de actina. Todavia, o restabelecimento dos níveis de Klotho impede o aumento de TRPC6, assim, preserva o citoesqueleto podocitário e atenua proteinúria, evidenciando, portanto, a importância de terapias que mantenham os níveis de Klotho para a conservação da arquitetura dessas células.⁽¹⁰⁾

Contudo, apesar da abordagem convencional atuar sobre muitos processos envolvidos no desenvolvimento e progressão da DRD, ela não apresenta a capacidade de regeneração das estruturas celulares lesadas e a consequente recuperação da função renal. Nesse sentido, é necessária a investigação de estratégias adicionais como forma de preencher essa lacuna que o tratamento convencional é incapaz de preencher e, além disso, visando maior impacto no combate à progressão da DRD.

1.8 Células-tronco mesenquimais

Nesse contexto, a terapia com células-tronco mesenquimais (CTMs) é uma estratégia promissora. Essas células apresentam uma série de características de interesse para a medicina regenerativa.

Essa população celular é definida como células-tronco por possuírem capacidade de aderência ao plástico, diferenciação *in vitro* em adipócito, condrócito e osteócito; e expressão dos marcadores de membrana (CD – *cluster of differentiation*) CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105, e ausência de CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 ou *human leukocyte antigen* (HLA-DR).⁽³³⁾ As CTMs apresentam ampla distribuição em nichos perivasculares e podem ser derivadas e expandidas em cultura a partir de diferentes órgãos e tecidos, sendo frequentemente obtidas da medula óssea (CTM-MO), tecido adiposo e do cordão umbilical.⁽³⁴⁾

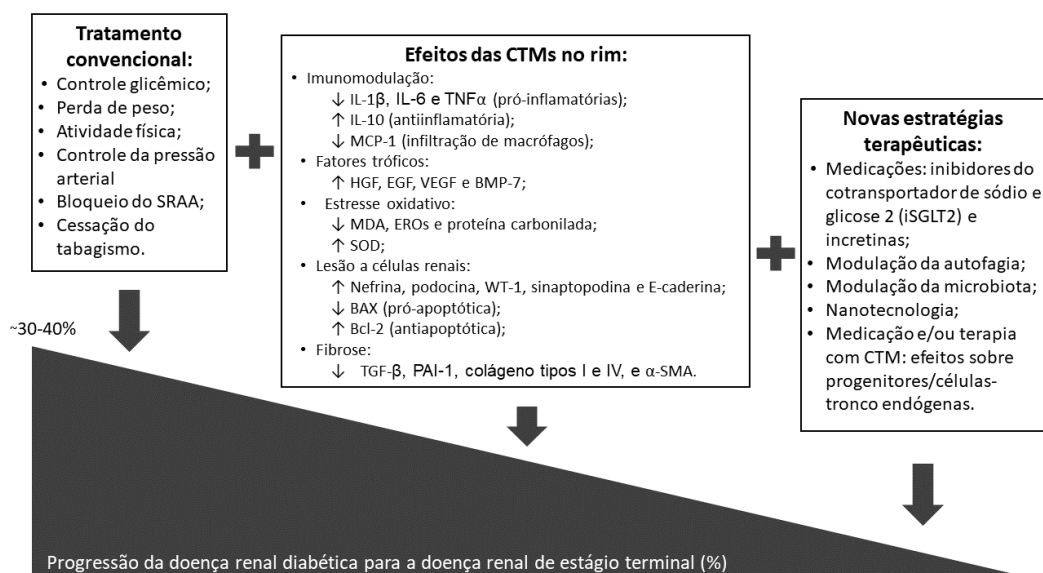
Apesar de apresentarem morfologia similar e perfil de expressão de marcadores de superfície similar, as células provenientes de diferentes origens não possuem as mesmas propriedades funcionais.⁽³⁴⁾ CTMs-MO, por exemplo, apresentam maior capacidade de diferenciação em linhagem osteogênica e adipogênica em relação à condrogênica. Apesar disso, a eficácia de diferenciação de CTMs *in vivo* é baixa, sendo assim, entende-se que seu potencial terapêutico para reparação tecidual e regeneração se dá através de seu secretoma, isto é, o conjunto de proteínas solúveis e vesículas extracelulares secretadas pelas células, as quais podem conter citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, proteases, microRNAs, mRNA, DNA e até mesma organelas.^(8,34) Dessa forma, essas células promovem efeitos parácrinos, quando atingem células vizinhas, e também endócrinas, atuando em outros órgãos.

Dentre os fatores secretados por elas, pode-citar a citocina anti-inflamatória IL-10 e a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO); fatores tróficos, como HGF, fator de crescimento epidérmico (EGF – *epidermal growth factor*), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF – *vascular endothelial growth factor*) e proteína óssea morfogenética 7 (BMP-7 – *bone morphogenetic protein 7*); e fatores antioxidantes, tal como a SOD e HO-1.^(6,8) Em relação a condições de estresse oxidativo, CTMs são capazes de adaptações nesse ambiente de forma a torná-las tolerantes ação de EROs e, assim, preservar suas funções. Por exemplo, em hipóxia, isto é, um estado de baixa tensão de oxigênio, as CTMs aumentam a expressão de fatores antiapoptóticos, enzimas

antioxidantes e fatores responsivos à hipóxia que levam ao aumento de VEGF, estimulando a angiogênese e, assim, o aumento da perfusão tecidual e maior aporte de oxigênio.^(6,35)

Além disso, quando expostas a um microambiente pró-inflamatório, como ocorre na DM e DRD, essas células adquirem um fenótipo imunossupressor, no qual há o aumento da expressão do fator de crescimento transformante beta (TGF- β – *transforming growth factor beta*),IDO, óxido nítrico (NO – *nitric oxide*), prostaglandina E2 (PGE2), redução da proliferação de linfócitos T através da secreção do ligante de morte programada 1 (PD-L1 – *programmed cell death ligand 1*) e do ligante de morte programada 2 (PD-L2 – *programmed cell death ligand 2*), estímulo a células T regulatórias e polarização para macrófagos M2.^(8,36,37) Sendo assim, não promovem resposta inflamatória, o que as torna de grande interesse para transplantes alogênicos.

De fato, a utilização de CTMs se mostra uma estratégia terapêutica potencial na DRD (Figura 8). Essas células apresentam tropismo a tecidos danificados e, em modelos pré-clínicos, estudos mostraram a migração de CTMs para o rins após a injúria renal.⁽³⁸⁾ A utilização dessa terapia na DRD demonstrou redução da expansão mesangial e do estresse oxidativo, diminuição da proteinúria, e preservação da função renal e marcadores podocitários, tais como nefrina e podocina.^(8,39)



Fonte: Traduzido de Paulini J, Higuti E, Bastos RM, Gomes SA, Rangel  B. Mesenchymal stem cells as therapeutic candidates for halting the progression of diabetic nephropathy. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9521629. Figure 1, Current treatment to prevent DN, MSC-based therapeutic approaches, and perspectives to halt the progression of DN; p. 9.

Figura 8. Tratamento convencional da doença renal diabética e terapia baseadas em células-tronco mesenquimais como estratégia para diminuição da progressão da doença

Embora a literatura relate o potencial terapêutico das CTMs para doenças renais, ainda há desafios a serem superados para o emprego dessa abordagem na prática clínica. Essas dificuldades incluem: a condição dos doadores; os diferentes potenciais entre os tecidos de origem das CTMs, como descrito anteriormente; a definição da via de administração; a quantidade de doses; a compreensão da interação entre as CTMs e as células hospedeiras; entre outras.

Primeiramente, as condições prévias à sua obtenção exercem grande influência sobre o potencial terapêutico das CTMs. Um ponto de discussão é o transplante de células autólogas ou alogênicas. Isso porque a terapia com CTMs autólogas é de grande interesse e traz vantagens para o paciente, pois essas células estão prontamente disponíveis. A terapia se baseia na extração do paciente, expansão *in vitro* e injeção de volta no paciente. Contudo, embora as CTMs autólogas possam ser a escolha mais segura para contornar uma resposta imune indesejada, fatores como comorbidades (por exemplo, DM, doença renal crônica e hipertensão) e envelhecimento podem prejudicar as propriedades terapêuticas das células.⁽³⁴⁾

Tais condições estão associadas a alteração para microambientes pró-oxidativos e inflamatórios, modificações no nicho das CTMs que impactam adversamente em sua funcionalidade, potência e interação com outras células.⁽⁴⁰⁾ No contexto da DM, o ambiente hiperglicêmico pode impactar negativamente a funcionalidade devido ao desenvolvimento de memória metabólica, isto é, um processo no qual a hipometilação em promotores gênicos leva à desregulação da expressão gênica e implica na persistência de complicações relacionadas ao DM mesmo no retorno a condições normoglicêmicas.⁽³⁴⁾ Em pacientes com DM do tipo 1 recém diagnosticados, por exemplo, CTMs-MO apresentam suas propriedades preservadas, como morfologia, potencial de diferenciação e perfil imunomodulatório, enquanto células de pacientes em estágios tardios da doença possuem tais características prejudicadas.⁽³⁴⁾ Ademais, estudos com CTMs extraídas tanto de modelos pré-clínicos quanto de pacientes com DM do tipo 2 demonstram grande impacto da doença, uma vez que as células demandam maior tempo para expansão *in vitro*, maior senescência, apresentam redução da capacidade angiogênica e elevação do perfil pró-inflamatório.^(34,41)

Nesse sentido, o transplante de CTMs alogênicas obtidas de doadores saudáveis possui maior potencial para garantir a eficiência da terapia no hospedeiro. Apesar da preocupação com a rejeição do enxerto, essas células

apresentam capacidade imunossupressora, como descrito, e, de fato, a literatura atual mostra baixa incidência de reações imunes reportadas.⁽³⁴⁾

Outro ponto a ser considerado é a via de administração dessas células. A DM é uma doença sistêmica e, portanto, o tratamento da DRD como também de suas demais complicações através da entrega de CTMs por via sistêmica é de grande interesse, sendo exemplos a rota intravenosa e interarterial. Nesse sentido, a via intravenosa é amplamente usada na clínica, porém devido ao grande tamanho das CTMs e à anatomia do tecido pulmonar, ocorre o aprisionamento da maioria das células infundidas em sua microvasculatura. Assim sendo, essa via apresenta limitação para o *homing*/migração das células.^(34,38,42)

A via interarterial, por outro lado, apresenta maior biodisponibilidade para a entrega da terapia celular por evitar a barreira pulmonar. Para efeito sistêmico, é possível citar a administração intracarótida, intracardíaca e intra-aórtica. Todavia, essa estratégia também eleva o risco para o desenvolvimento de trombos em demais microvasculaturas, como no cérebro onde pode ocasionar infarto cerebral.⁽⁴²⁾ Já a administração interarterial local, como a infusão nas artérias renais, apresenta-se como uma forma de contornar essas complicações e ainda possui potencial terapêutico para a injúria renal.⁽³⁴⁾ No entanto, a via intrarterial, de forma geral, é invasiva e demanda o uso de contraste para verificação da correta canulação da artéria, tornando-se mais um agravante para injúria renal;⁽⁴³⁾ portanto, não apresenta ampla aplicação na clínica.

Ademais, vias de administração locais no rim, como a intraparenquimal, possuem efeito benéfico para o tratamento de doenças, mas novamente possui baixo potencial translacional para a clínica.⁽³⁴⁾ Entretanto, como comentado previamente, a terapêutica das CTMs ocorre por via indireta através do seu secretoma, ou seja, pela ação de fatores solúveis secretados por elas que atuam de forma parácrina e endócrina.⁽⁸⁾ Sendo assim, a administração em locais ricamente vascularizados possui grande potencial, tendo como exemplo a injeção intraperitoneal.

Por fim, é necessária ainda maior investigação dos mecanismos renoprotetores dessas células e sua interação com o tecido hospedeiro na DRD. Para tanto, é de extrema importância a utilização de modelos adequados. Atualmente, a maioria dos estudos utilizam modelos pré-clínicos de DM tipo 1 ou de DM tipo 2 que possuem apenas parte das alterações da doença.^(34,38)

Nesse sentido, o modelo mais robusto para a avaliação tanto da terapia celular quanto de demais intervenções na DM tipo 2 e DRD é o camundongo

black and tan brachyury obese (BTBR^{ob/ob}), *tufted*. Esse modelo apresenta características que se assemelham às encontradas na doença humanas e que se desenvolvem de forma tempo-dependente.^(44,45) Portanto, sua utilização permite o estudo dos mecanismos envolvidos no surgimento e progressão da doença, assim como a investigação de estratégias terapêuticas e análise de seus potenciais limitações.

A terapia celular com células-tronco mesenquimais da medula óssea possui o potencial de modular a sinalização da via Ang II/Nox4/TRPC6 em podócitos e, assim, preservar seu citoesqueleto, garantindo a manutenção de sua estrutura e função (Figura 9).

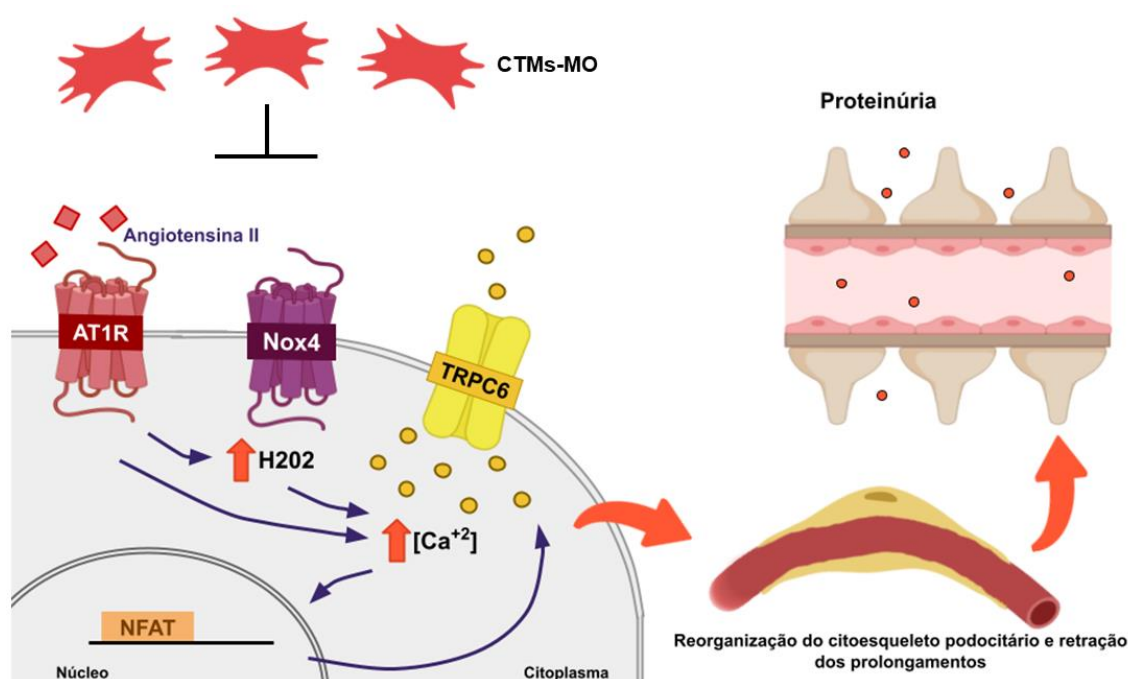


Figura 9. Esquema representativo da hipótese do trabalho. A utilização de CTMs-MO é uma estratégia para a redução da ativação da via AngII/Nox4/TRPC6, como forma de preservar a arquitetura do citoesqueleto do podócito e sua função na barreira de filtração glomerular

1.9 Objetivo

1. Avaliar o potencial terapêutico da combinação da terapia convencional e CTMs-MO em animais BTBR^{ob/ob}, por meio da análise de: ganho de peso, glicemia capilar de jejum, TFG, albuminúria, morfologia glomerular, expansão mesangial, número de podócitos, estresse oxidativo tecidual, e expressão gênica de Klotho e HGF, de marcadores podocitários, do sistema renina-angiotensina-aldosterona e da via Ang II/Nox4/TRPC6.

2 MÉTODOS

2.1 Local do estudo

O estudo foi realizado no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE). As intervenções *in vivo* e coletas das amostras teciduais foram realizadas no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC), no qual os animais foram mantidos em ambiente *specific pathogen free* (SPF) com controle interno de umidade, temperatura, ruído, luz e pressão.

2.2 Aspectos éticos e legais

O projeto teve seu início somente após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 4450-20, protocolado no Sistema Gerenciador de Projeto de Pesquisa (SGPP).

Ademais, o estudo também utilizou amostras de animais do repositório do grupo de pesquisa, provenientes de projetos também aprovados pelo CEUA, sob os números 3309-18 (animais com transplante de gordura [Tx]) e 3129-17 (animais Rosa26-mtmg doadores de medula óssea para coleta de CTMs e animais BTBR *wild-type*).

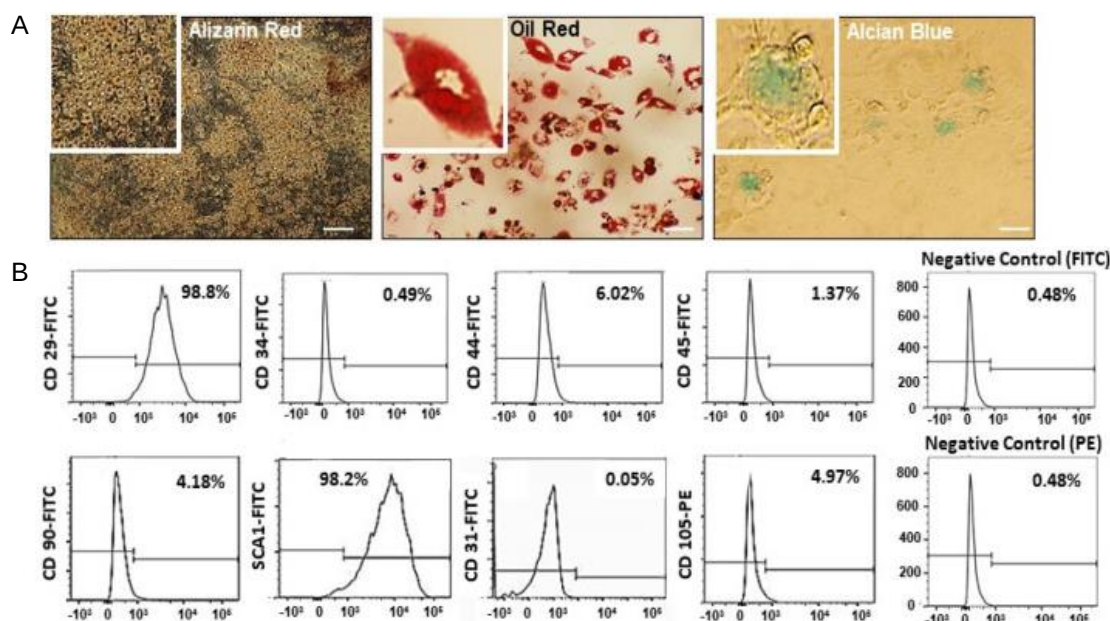
2.3 Cultura primária de CTMs-MO

As CTMs-MO utilizadas nesse estudo foram obtidas em extrações realizadas e caracterizadas em projeto prévio, ou seja, anterior ao início deste estudo.⁽³⁹⁾ As células foram extraídas através de *flush* da medula óssea femoral e tibial de um *pool* de camundongos machos, de 6 a 8 semanas de idade, da linhagem Rosa26/mTmG (Jackson Laboratories, JAX). Os animais foram anestesiados previamente por inalação de isoflurano (Cristália) seguida de eutanásia por deslocamento cervical. O procedimento do *flush* ocorre da seguinte maneira: injeta-se salina na medula óssea tibial e femoral e o material obtido é coletado e colocado em cultura para a seleção das células-tronco

mesenquimais. Seleciona-se as células através de passagens progressivas para em seguida serem caracterizadas e utilizadas em experimentos. As células medulares obtidas foram cultivadas *in vitro*, em meio *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM)/F12 (Ham)1:1 (Gibco, EUA) suplementado em 20% com soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil) e 1% de penicilina e estreptomicina (Invitrogen, EUA).

Em passagem 7-10, as CTMs-MO foram caracterizadas por seu fenótipo de morfologia semelhante a fibroblasto, capacidade de aderência ao plástico, capacidade multipotente, e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Constatou-se a capacidade de diferenciação CTMs-MO obtidas nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. Para tanto, realizou-se a diferenciação nestes tipos celulares em meio de cultura com 10% SFB em adição a reagentes específicos: osteogênica (10^{-7} M dexametasona, 0,2mM ácido ascórbico e 10mM β -glicerol-fosfato), durante 4 semanas; adipogênica (1 μ M dexametasona, 0,5 μ M 1-metil-3-isobutilxantine, 10 μ g/mL insulina, e 1 μ M indometacina), por 2 semanas; e condrogênica (6,25 μ g/mL insulina, 5 μ g/mL ácido ascórbico e 10ng/mL TGF- β), durante 3 semanas. Em seguida, verificou-se a diferenciação por meio da coloração por *alcian blue*, *oil red* e *alizarin red* para confirmação da diferenciação, respectivamente, em condrócito, adipócito e osteócito (Figura 10A).

Por fim, as CTMs-MO extraídas cumpriram com os requisitos para a definição como CTM por meio da expressão de marcadores da linhagem mesenquimal (CD29 e Sca-1 – *stem cell antigen-1*) e a não expressão de marcadores da linhagem hematopoiética (CD34 e CD45) e endotelial (CD31) (Figura 10B).



(A) Diferenciação das células em passagem 10 em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas e coradas com *alizarin red*, *oil red* e *alcian blue*, respectivamente. (B) Análise por citometria de fluxo para imunofenotipagem das CTMs em passagens 7 a 8, sendo elas positivas para CD 29 (98,8%), SCA-1 (98,2%), CD 44 (6,02%), CD 90 (4,18%) e CD 105 (4,97%) e negativas para CD34 (0,49%), CD 45 (1,37%) e CD 31 (0,05%).

Fonte: Adaptado de Sávio-Silva C, Soinski-Sousa PE, Simplicio-Filho A, Bastos RM, Beyerstedt S, Rangel ÉB. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in a pre-clinical model of diabetic kidney disease and obesity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):1546. Figure 1, Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) isolated from mTmG mice; p. 3.

Figura 10. Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea isoladas de camundongos Rosa26/mTmG

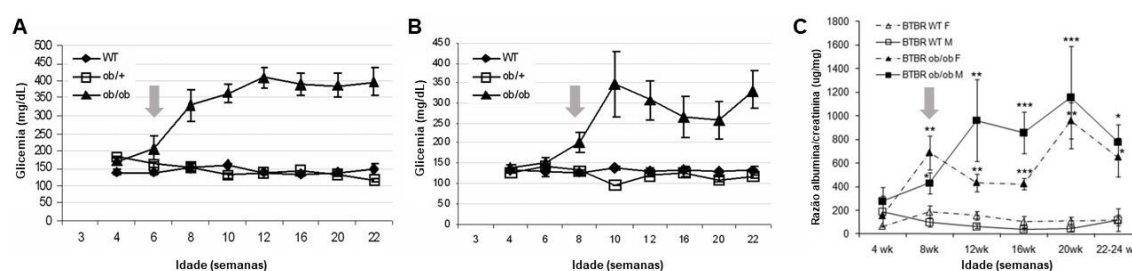
2.4 Grupos e delineamento experimental *in vivo*

2.4.1 BTBR^{ob/ob}

Utilizamos o camundongo BTBR.Cg-Lepob/WiscJ (JAX stock #004824)⁽⁴⁶⁾ como modelo *in vivo* para o estudo da DRD. Esse animal é homozigoto para a mutação *knockout* do gene da leptina (Lep^{ob}), portanto, é identificado como BTBR^{ob/ob}.

A leptina é um hormônio sintetizado, principalmente, pelo tecido adiposo branco e está envolvida no controle de diversas funções fisiológicas, como crescimento, metabolismo e reprodução. A leptina atua como um sinal aferente no ciclo de *feedback* negativo para o hipotálamo, que inibe a ingestão de alimentos, sendo conhecida como hormônio da saciedade; além atuar na homeostase energética e a termogênese e regulação da massa de tecido adiposo.^(46,47)

A mutação Lep^{ob} nesses animais está, portanto, associada ao desenvolvimento de obesidade devido à hiperfagia. Ainda, o $BTBR^{ob/ob}$ é um modelo de DM tipo 2, com início da doença a partir de seis semanas de idade nos machos (Figura 11A) e oito semanas nas fêmeas (Figura 11B) e apresentando hiperglicemia grave e progressiva ao longo do tempo. Além disso, os animais homozigotos também apresentam resistência à insulina, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e infertilidade.⁽⁴⁴⁾



(A) Níveis glicêmicos de animais $BTBR^{ob/ob}$ e *wild-type* machos, estando o início da hiperglicemia indicada pela seta. (B) Níveis glicêmicos de animais $BTBR^{ob/ob}$ e *wild-type* fêmeas, estando o início da hiperglicemia indicada pela seta. (C) Razão albuminúria/creatinúria de indivíduos $BTBR^{ob/ob}$ e *wild-type* machos e fêmeas, estando o início da proteinúria nos animais $BTBR^{ob/ob}$ indicado pela seta.

Fonte: Hudkins KL, Pichaiwong W, Wietecha T, Kowalewska J, Banas MC, Spencer MW, et al. *BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol. 2010;21(9):1533-42. Figure 1. *BTBR ob/ob mice have markedly increased albuminuria*; p. 1535.

Figura 11. Glicemia e proteinúria de animais $BTBR^{ob/ob}$ machos e fêmeas em comparação a animais $BTBR$ *wild-type*

Com relação às modificações renais, os camundongos $BTBR^{ob/ob}$ apresentam proteinúria de maneira tempo-dependente, podendo-se observar o aumento significativo da albuminúria em relação ao $BTBR$ *wild-type* a partir de oito semanas de idade (Figura 11C). Outras características também estão presentes nesse modelo, como hipertrofia glomerular, acúmulo de matriz mesangial, espessamento da MBG, hialinose arteriolar focal, mesangiólise, fibrose intersticial de leve intensidade, e perda de podócitos. Portanto, o $BTBR^{ob/ob}$ é o modelo pré-clínico mais robusto para o estudo da DRD por apresentar características iniciais da doença em humanos.^(44,45)

Ainda, esse modelo apresenta o potencial de reversão da DRD com o restabelecimento dos níveis de leptina. Isto é, a administração de leptina em camundongos $BTBR^{ob/ob}$ reverte as alterações estruturais e funcionais decorrentes da doença.^(26,45)

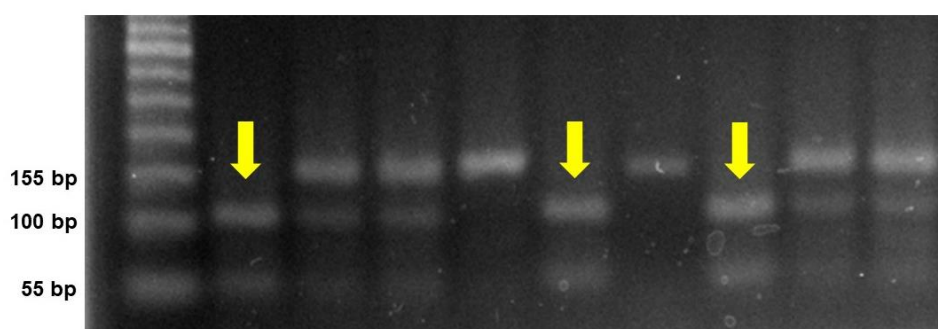
2.4.2 Genotipagem

Os animais BTBR^{ob/ob} são identificados pelo fenótipo e seu genótipo é confirmado pela genotipagem para o alelo do gene da leptina. O processo da genotipagem ocorre da seguinte forma: coleta-se um fragmento da cauda do animal e o DNA é extraído por meio de um processo de lise com solução de 25mM NaOH/0,2Mm-Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*), por uma hora em incubação a 98°C, sob agitação a 300 (*rotations per minute*) RPM. Em seguida, o processo é interrompido com a adição de solução 40mM Tris-HCl pH 5,5 e centrifugação a 10.000 RPM a 4°C durante 10 minutos. Então, é realizada a reação de *polymerase chain reaction* (PCR) com MasterMix (ThermoScientific), água e os seguintes *primers* (Sigma-Aldrich):

IMR1151 TGTCCAAGATGGACCAGACTCACAGGTTCTACCTGGTCTGAG

IMR1152 ACTGGTCTGAGGCAGGGAGCATGACCAGACTCCGTCCCTCGT

Em seguida, é feito o processo de digestão com enzima de restrição, Ddel (Promega, EUA), durante uma hora a 37°C. Por fim, realiza-se a corrida das amostras em gel de agarose 3% junto com padrão de pares de base (pb), DNA-ladder de 50pb (ThermoFisher), e a imagem é obtida em um fotodocumentador. O genótipo é determinado pelo tamanho das bandas expressas e vistas no gel: bandas de 55 e 100pb representam o animal mutante (BTBR^{ob/ob}); bandas de 55, 100 e 155pb representam o animal heterozigoto; e apenas a banda de 155pb representa o animal BTBR selvagem ou *wild-type* (Figura 12).



Setas indicando o genótipo mutante (ob/ob).

Figura 12. Genotipagem de animais BTBR^{ob/ob}

2.4.3 Manuseio

Realizamos um projeto piloto para avaliar a segurança do uso do iSGLT2 empagliflozina em animais BTBR^{ob/ob} (SGPP 4315-20) e pudemos refinar os cuidados e manuseio no biotério. Como resultado, estabelecemos a prática do preenchimento diário de um *checklist* (Anexo 1) que avalia diferentes parâmetros do animal e da gaiola em que é mantido, sendo alguns deles:

- **Troca e umidade da caixa e desobstrução do camundongo:** o animal é BTBR^{ob/ob} poliúrico e apresenta glicosúria elevada, características que são aumentadas com a administração de iSGLT2. Portanto, os animais utilizados no projeto foram mantidos em gaiolas individuais, que foram trocadas frequentemente quando a umidade atingia mais de 50% da maravalha. Além disso, por ser obeso, o animal tem dificuldade para realizar a higiene da região geniturinária, o que contribui para a sedimentação de urina e obstrução da uretra, o que pode dificultar a micção e aumentar o desenvolvimento de infecções no trato urinário. Nesse sentido, realizou-se a desobstrução por meio da retirada do sedimento através da apalpação da região.

- **Reidratação com ringer lactato:** por conta da poliúria, o animal desidrata e necessita de reposição eletrolítica. Nesses casos, realizou-se por via subcutânea no dorso do animal a injeção de 1mL de ringer-lactato, uma solução que possui em sua composição sódio, potássio, cloreto e cálcio.

Além disso, realizamos também a urinálise por meio da fita de análise Combur¹⁰ Test M (Roche). Observamos, principalmente após o início do tratamento com iSGLT2, alteração do pH, presença de nitrito e leucócitos, parâmetros que indicam infecção urinária. Por isso, estabelecemos a adição de antibiótico na água do bebedouro na semana de início do tratamento com iSGLT2. A urinálise na semana seguinte mostrou retorno aos parâmetros normais.

2.4.4 Grupos e delineamento experimental

Os animais utilizados no projeto foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo BTBR^{ob/ob};
- Grupo BTBR^{ob/ob} + Tx;

- Grupo BTBR^{ob/ob} + iSGLT2;
- Grupo BTBR^{ob/ob} + iSGLT2 + restrição calórica (RC) + veículo (salina);
- Grupo BTBR^{ob/ob} + iSGLT2 + RC + CTMs-MO.

O camundongo é um modelo progressivo de DRD.⁽⁴⁴⁾ Sendo assim, investigamos o potencial de terapias experimentais em dois *time-points*: um *time-point* intermediário de quatorze e quinze semanas de idade; e um *time-point* tardio para análise das alterações mais crônicas da doença, em dezoito a vinte semanas de idade. Assim, o projeto foi delineado alocando 6 animais por grupo, sendo o número amostral de $6 \times 5 \times 2 = 60$ animais. Todavia, como visto, o animal apresenta maior chance do desenvolvimento de complicações, tais como infecção geniturinária e desidratação. Portanto, esses fatores foram considerados no cálculo do número amostral e, por conta disso, atribuiu-se um coeficiente de atrito de 20%, adicionando $60 + 20\% = 72$ animais.

Ao final do acompanhamento dos animais, a eutanásia foi realizada por sobrecarga por via inalatória do anestésico isoflurano (Isoforine[®], Cristália) e, em seguida, realizou-se a perfusão com soro fisiológico. Para tanto, o soro foi injetado com fluxo constante no ventrículo esquerdo e o átrio direito foi pinçado para saída do volume perfundido. Por fim, rins e pâncreas foram coletados.

2.4.5 Grupo experimental: inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2

O início do tratamento com iSGLT2 foi iniciado entre cinco e seis semanas de idade, período em que o animal começa a desenvolver DM (Figura 11A). Para tanto, os animais receberam ração *ad libitum* contendo o iSGLT2 empagliflozina (Jardiance[®], Boehringer Ingelheim) na dose de 25mg por quilograma de ração até o final do acompanhamento.

2.4.6 Grupo experimental: inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2 + restrição calórica

A RC foi utilizada como estratégia complementar ao tratamento com empagliflozina. A intervenção de RC foi utilizada como forma de mimetizar a mudança

dos hábitos alimentares que já ocorre na prática clínica e, além disso, já foi demonstrado que apresenta benefícios para a redução da progressão da DRD no BTBR^{ob/ob}.⁽²⁴⁾ Para tanto, o cálculo da RC se baseou no consumo de ração do Grupo iSGLT2 sem restrição. Desse modo, utilizou-se RC de 30% em relação ao valor médio diário consumido pelo grupo sem restrição, isto é, os animais em restrição receberam 70% da quantidade de ração consumida pelos animais do Grupo iSGLT2.

Ao início do projeto, o animal recebia a quantidade de ração calculada para uma semana, porém observamos que era consumida completamente em um dia. Portanto, estabelecemos a reposição diária da quantidade calculada para apenas um dia. Ademais, também estipulamos o condicionamento do animal para a RC em quatro a cinco semanas de idade, período ainda sem iSGLT2, para acostumá-lo com a menor quantidade de ração antes do recebimento da ração contendo a medicação.

Ademais, com 8 a 10 semanas de idade, os animais alocados neste grupo receberam duas doses de injeção intraperitoneal com 500µL de solução de cloreto de sódio 0,9% (veículo) após a assepsia do local da aplicação com solução alcoólica de clorexidina a 0,5% (Riohex[®], Rioquímica, Brasil).

2.4.7 Grupo experimental: inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2 + restrição calórica + CTMs-MO

Em associação ao tratamento com iSGLT2 e RC, os animais receberam terapia com CTMs-MO. Estabeleceu-se a administração de duas doses de $1,2 \times 10^6$ células, entre oito e dez semanas de idade. Esse *time-point* foi escolhido pois é o período em que o animal apresenta elevação significativa da proteinúria (Figura 11C).

A preparação da injeção ocorreu no fluxo laminar do laboratório de histologia do CETEC. Foi realizado o rápido descongelamento e avaliação da viabilidade celular por azul de tripan ($\geq 75\%$) e as células foram ressuspensas em 500µL de solução de cloreto de sódio 0,9%. Em seguida, foi feita a assepsia do local da injeção com solução alcoólica de clorexidina a 0,5% e as células foram administradas por via intraperitoneal.

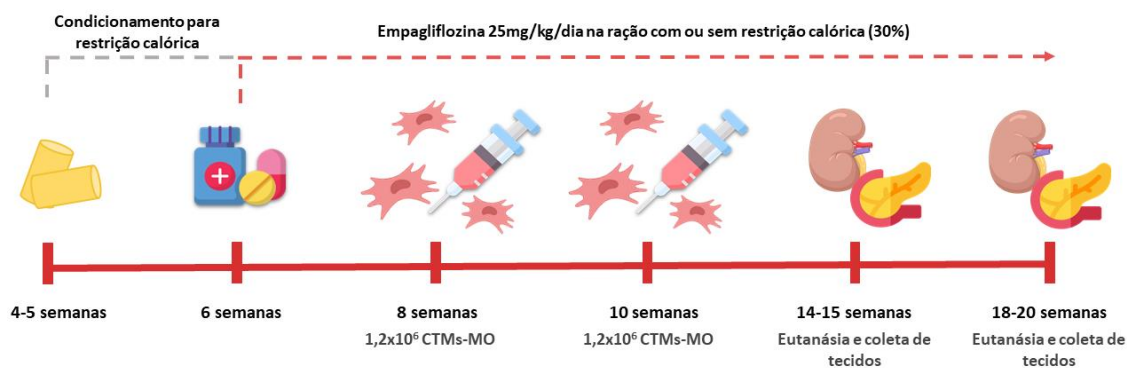


Figura 13. Delineamento experimental *in vivo*

2.4.8 Grupo experimental: transplante de gordura

A cirurgia do transplante de gordura (Tx) é uma prática rotineira em nosso grupo, tendo sido padronizada durante o projeto “O transplante de gordura como estratégia para restaurar a fertilidade dos camundongos BTBR^{ob/ob} e aumentar o pool destes animais no biotério”, desenvolvido sob o SGPP 3309-18. Esse estudo se baseou nos 4R’s da pesquisa (*reduction, replacement, responsibility and refinement*), com o objetivo aumentar a disponibilidade de animais BTBR^{ob/ob} usados nos projetos do grupo.

O animal BTBR^{ob/ob} é homozigoto recessivo e o cruzamento de animais BTBR heterozigotos (BTBR^{ob/+}) gera cerca de 25% da prole com o genótipo ob/ob. Com a metodologia do Tx, buscamos restaurar os níveis de leptina e, assim, reverter a fertilidade desse animal e aumentar o número de camundongos BTBR^{ob/ob} nascidos, 50% da prole se a fêmea ou o macho BTBR^{ob/ob} transplantado com gordura for cruzado com animais BTBR heterozigotos. Como observamos em dados não publicados do nosso grupo, o procedimento é efetivo e reverte também os efeitos crônicos da hiperglicemia nesse modelo, como as alterações da DRD.

O procedimento é realizado no centro cirúrgico destinado a procedimentos com roedores do CETEC, e os dados da cirurgia e acompanhamento pós-cirúrgico são registrados na ficha de Tx (Anexo 3). Primeiramente, a sala é preparada para a cirurgia (Figura 14A). Utiliza-se campo cirúrgico autoclavado, os instrumentos são esterilizados no equipamento Germinator (Animalab, Polônia) e monta-se o circuito da máquina de anestesia Somnosuite® Low-Flow Anesthesia System (Kent Scientific, EUA). Nesse sentido, pesa-se o animal receptor em uma balança semi-analítica antes do início da cirurgia para programar o fluxo de anestésico da máquina de anestesia.

Para a obtenção da gordura, são utilizados animais BTBR *wild-type* e heterozigotos, cujos genótipos são previamente confirmados por genotipagem. Os doadores são submetidos a eutanásia por overdose anestésica com isoflurano (Cristália, Brasil) de 2,5 a 5% e, posteriormente, são submetidos a deslocamento cervical. Antes da coleta de tecido, é realizada a assepsia dos locais de coleta com clorexidina a 0,5% (Figura 14B). Em seguida, a gordura inguinal (branca) (Figura 14C) e a gordura interescapular (marrom) (Figura 14D) são removidas, transferidas para um tubo de 3mL e mantidas em isquemia fria. É utilizado um *pool* de 8 a 12 doadores para cada receptor até totalizar um volume final de gordura em gramas de 12-15% em relação ao peso do doador. Atingida a quantidade necessária, verificada em uma balança semi-analítica, a gordura é limpa para a remoção de quaisquer pelos remanescentes (Figura 14E), homogeneizada apenas uma vez, sendo passada na seringa de 3mL com uma agulha de 16-gauge, e a injeção já pronta é mantida no gelo até o momento da aplicação (Figura 14F).

Como receptor, é utilizado um camundongo BTBR^{ob/ob} entre 4 a 5 semanas de idade. O animal então é submetido à ventilação por máscara facial (Figura 14G) e anestesia com uma dose de ataque de isoflurano a 5% e, posteriormente, mantido, durante a cirurgia, com uma dose de 2-3% do anestésico inalatório. Então, é realizada a assepsia com clorexidina a 2% (Riohex®, Rioquímica, Brasil) do dorso do animal, posicionado em decúbito ventral. Em seguida, injeta-se um volume 100-200µL por infusão de cada tipo de gordura em regiões próximas aos locais de coleta. Isto é, aplica-se a gordura marrom na região anterior do dorso do animal, perto da região interescapular (Figura 14H), enquanto a gordura branca é injetada na região posterior (Figura 14I).

Ao final da cirurgia, o animal é retirado da máscara facial e recebe analgesia com cloridrato de tramadol na dose de 40mg/kg por via intramuscular (Figura 14J). Para tanto, o volume é calculado por meio da seguinte fórmula: $\frac{\text{peso do receptor(g)} \times 40}{\text{dose estoque}}$.

Por fim, o animal é colocado em uma gaiola limpa sozinho, para acompanhamento pós-cirúrgico. No dia posterior, é feita novamente a analgesia com cloridrato de tramadol (Cristália) na dose de 40mg/kg por via intramuscular e a assepsia do dorso com clorexidina a 2%, de modo a garantir a limpeza do sítio operatório.



(A) Preparação do centro cirúrgico. (B) Assepsia dos locais de coleta de gordura em animais doadores. (C) Coleta da gordura branca inguinal. (D) Coleta da gordura marrom interescapular (E) Limpeza dos tecidos coletados para retiradas de pelos. (F) Preparação das injeções mantidas em isquemia fria. (G) Animal receptor é submetido à anestesia por máscara facial. (H) Administração da gordura marrom próximo à região interescapular. (I) Injeção da gordura branca na região posterior do dorso do receptor. (J) Analgesia por administração intramuscular.

Figura 14. Procedimento cirúrgico do transplante de gordura

Como mencionado, um dos objetivos da metodologia do transplante é reverter a fertilidade do camundongo BTBR^{ob/ob} e, assim, aumentar a quantidade de animais nascidos com esse genótipo. Por conta disso, após o animal se recuperar da cirurgia, é colocada uma fêmea na gaiola, criando-se assim uma matriz.

Sendo assim, diferente dos demais grupos experimentais, o animal que realizou Tx não foi mantido isolado na gaiola. Portanto, não foi possível realizar o controle do consumo de ração deste grupo. Todavia, as demais coletas e intervenções, as quais foram registradas na ficha de acompanhamento do animal (Anexo 2), tais como peso, glicemia de jejum, gaiola metabólica e plasma, foram realizadas normalmente.

2.4.9 Glicemia capilar de jejum

Os animais ficaram em jejum por 6 horas para a coleta de dados sobre glicemia, que foi aferida quinzenalmente a partir de 6 semanas de idade através do aparelho Accu-Chek (Roche-Basiléia, Suíça). Com base em estudos anteriores, animais BTBR *wild-type* apresentam glicemia capilar de jejum até 200mg/dL,^(39,44,45,48) portanto consideramos valores acima deste como diagnóstico de DM em nossos animais BTBR^{ob/ob}.

2.4.10 Análise bioquímica urinária

Para realizar a coleta de urina, o animal foi mantido em gaiola metabólica com acesso à água e ração durante 6 horas. A gaiola metabólica é um equipamento que separa as fezes da urina, impedindo a contaminação para análise bioquímica. Sendo assim, a coleta foi realizada nos seguintes *time-points*: 5-6, 8, 10, 14 e 18-20 semanas de idade.

Realizamos análise bioquímica de creatinina, albumina e glicose, e eletrolítica de sódio. Nesse sentido, creatinúria, glicosúria e natriurese foram avaliadas pelo analisador bioquímico automático Cobas Advantage Blood Glucose Monitor® (Roche, Suíça), enquanto a albuminúria foi quantificada usando um kit de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) específico para albumina murina (ab108792, Abcam, EUA).

2.4.11 Creatinina sérica

A coleta de plasma foi realizada nos seguintes *time-points*: 5, 8, 10, 14 e 18-20 semanas de idade. A creatinina sérica foi quantificada pelo analisador bioquímico automático Cobas® (Roche, Suíça).

2.4.12 Avaliação histológica

Após a eutanásia, uma porção de tecido renal dos camundongos foi imediatamente fixada em formol 4%, por 24 a 48 horas. Em seguida, os tecidos foram processados em álcool nas crescentes concentrações: 70, 80, 95 e 100% e xilol, sendo por fim imersos em parafina. Ao fim, foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 3,5µm em micrótomo e fixados em lâminas para microscopia. Para as análises, foi utilizado o microscópio IX-51 (Olympus Life Science, EUA) e o *software* CellSens Dimension (Olympus Life Science, EUA).

2.4.13 Hematoxilina e eosina

A coloração com hematoxilina e eosina (HE) foi realizada em secções de rim e pâncreas para análise da morfometria de glomérulos e ilhotas pancreáticas, respectivamente.

2.4.14 Ácido periódico de Schiff

Essa coloração identifica os glicosaminoglicanos presentes na matriz mesangial e, portanto, foi utilizada para a avaliação da expansão mesangial.

2.4.15 Imuno-histoquímica

O processo de peroxidação lipídica é uma cascata de reações resultantes da ação dos radicais livres sobre os lipídios de membranas celulares. Sendo assim, realizamos a análise do estresse oxidativo tecidual por meio de imuno-histoquímica (IHQ) com o anticorpo para o marcador de peroxidação lipídica 4-Hidroxinonenal (4-HNE – *anti-4 hydroxynonenal rabbit polyclonal*, ab46545, Abcam, EUA)^(39,48) e o kit *EnVision FLEX High pH kit* (K8000, DAKO, EUA).

Além disso, essa metodologia também foi utilizada como forma de quantificação do número de podócitos. Nesse sentido, avaliamos esse parâmetro utilizando a marcação para a proteína *Wilms' tumour-1* (WT-1), cuja expressão nuclear em podócitos é amplamente utilizada como estratégia para mensuração de podócitos.^(39,44,45,48) Para tanto, utilizamos o anticorpo anti-WT1 (anti-WT1; #sc-192—Santa Cruz Biotechnology, EUA) para contagem de podócitos em 30 glomérulos por animal.

2.5 Avaliação da expressão gênica

A expressão de diferentes genes foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR – *quantitative real time polymerase chain reaction*). Amostras de

tecido renal foram estocados em solução RNA Later (Sigma-Aldrich, Merck, Alemanha) a -80°C, de modo a evitar degradação do material. Em seguida, extraímos o RNA total de porções corticais e realizamos a purificação em colunas do *kit RNease mini kit* (QIAGEN, Alemanha). O RNA obtido foi, então, quantificado no equipamento Nanodrop (ThermoFisher Scientific, EUA) e utilizado em concentração de 10ng/μL para a síntese de *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA), por meio do *kit* de transcrição reversa *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, EUA).

Para a realização da PCR, foram utilizados 2μL do cDNA e 18μL de *TaqMan™ Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, EUA) e sondas Taqman (ThermoFisher Scientific, EUA) (Tabela 1), totalizando 20μL de volume final para cada reação. Cada amostra foi analisada em duplicata no equipamento QuantStudio 6 real-time PCR System (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições de ciclagem e temperatura: 50°C por 2min, 95°C por 10min, e 40 repetições do ciclo de 95°C por 20s e 60°C por 1min.

Como gene *housekeeping* para controle endógeno, utilizamos a betaglucuronidase (GUSB, Mm01197698_m1 - Taqman Endogenous Control – ThermoFisher Scientific, EUA). As sondas utilizadas para a avaliação da expressão dos genes de interesse estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Genes avaliados por RT-qPCR e suas respectivas sondas

Gene	Sonda
Kl	Mm00502002_m1 - Kl - Taqman
Nphs1	Mm01176615_g1 - Nphs1 - Taqman
Actn4	Mm00502489_m1 - Actn4 - Taqman
Synpo2	Mm03809162_m1 - Synpo2 - Taqman
Nox4	Mm01317080_m1 - Nox4 - Taqman
Trpc6	Mm01176083_m1 - TRPC6 - Taqman
Ace2	Mm01159003_m1 - Ace2 - Taqman
Ace	Mm00802048_m1 - Ace- Taqman
WT1	Mm01337048_m1 - WT1 - Taqman
Hgf	Mm01135184_m1 - Hgf - Taqman

2.6 Avaliação dos resultados

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ou erro padrão da média. Primeiramente, realizamos a análise estatística por teste de

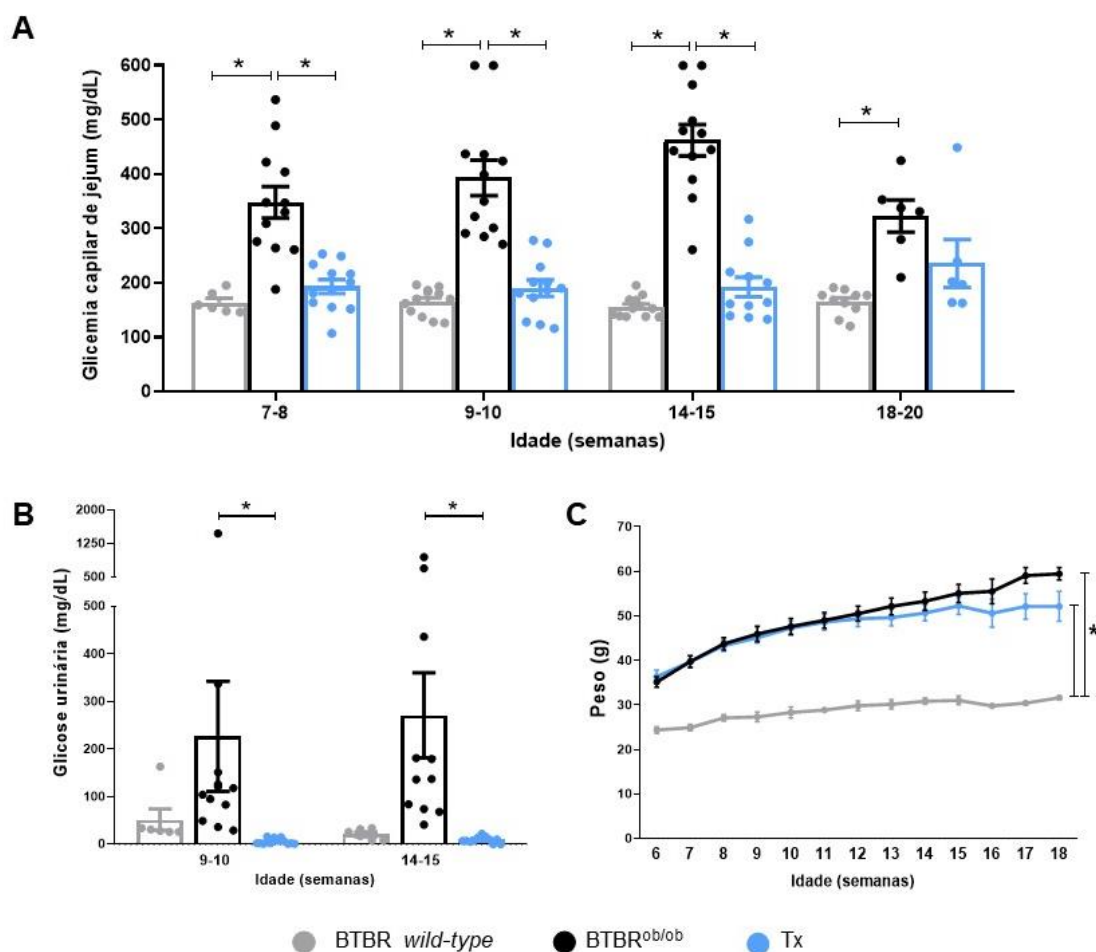
normalidade Shapiro-Wilk. Em seguida, caso houvesse normalidade na distribuição das amostras, foi feita análise de variância (ANOVA – *analysis of variance*) *one-way* para análises de uma variável, seguida de pós-teste de Tukey. Em caso de medidas repetidas ao longo do tempo, foi feita ANOVA *two-way* ou teste de modelo misto, sendo este para quando havia diferenças no número de observações em medidas repetidas; sendo feita a correção de Geisser Greenhouse's épsilon para não esfericidade quando aplicável. Para múltiplas comparações, foi feito o pós-teste de Tukey. Em caso de não normalidade na distribuição das médias amostrais, usamos teste de Kruskal-Wallis ou teste múltiplo com correção de Dunn para comparações múltiplas. A análise estatística foi feita usando o *software* GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, EUA), sendo considerados estatisticamente significantes valores- $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Transplante de gordura como grupo comparável ao animal BTBR *wild-type*

Observa-se que os valores de glicemia capilar de jejum dos grupos Tx e BTBR *wild-type* foram menores em comparação à glicemia do animal BTBR^{ob/ob} nos *time-points* de 8 a 15 semanas, porém não foram diferentes entre si nessas mesmas idades. Contudo, em 20 semanas, apenas o animal *wild-type* apresentou valores de glicemias menores que o Grupo BTBR^{ob/ob}, enquanto não obtivemos diferença significativa entre os grupos Tx e BTBR^{ob/ob} (Figura 15A).

Além disso, em relação à glicosúria, os animais Tx e *wild-type* apresentaram valores menores do que os animais BTBR^{ob/ob}, porém não diferiram entre si (Figura 15B). Ademais, analisando o parâmetro peso, obtivemos que o grupo *wild-type* apresentou ganho de peso ao longo do tempo menor do que os animais dos grupos Tx e BTBR^{ob/ob}, enquanto estes não diferiram entre si (Figura 15C).



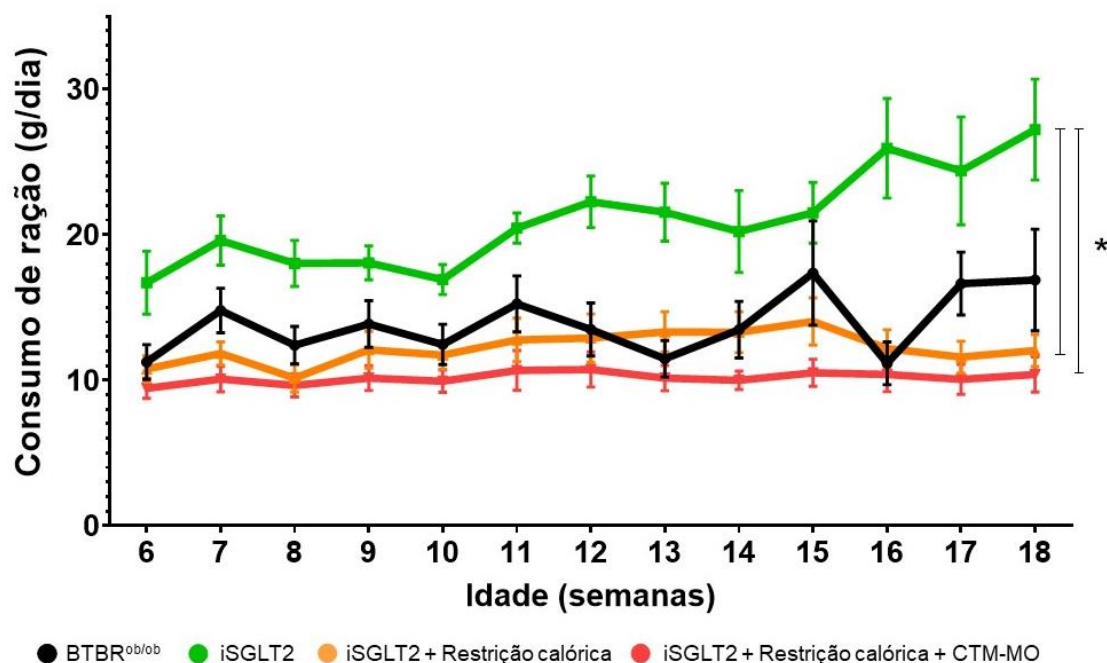
(A) Valores de glicemia capilar de jejum ao longo do tempo. (B) Glicose urinária. (C) Variação do peso em gramas ao longo do tempo. $n=6-12$; $*p<0,05$; média $\pm$ desvio padrão da média; modelo de efeito misto, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

Figura 15. Comparação de dados funcionais de animais BTBR^{ob/ob}, Tx e BTBR *wild-type*

3.2 Consumo de ração

Realizamos a análise do consumo de ração como forma de calcular a quantidade de ração a ser dada para os grupos com RC (Figura 16). Dessa forma, pudemos observar o padrão de consumo dos grupos experimentais ao longo do tempo de acompanhamento, com exceção do Grupo Tx. Como mencionado, esse animal foi mantido em casal, uma vez que foi utilizado também como matriz para geração de animais BTBR^{ob/ob} para o estudo.

Em comparação ao grupo que recebeu apenas iSGLT2, os animais iSGLT2 + RC e animais iSGLT2 + RC + CTM-MO apresentaram consumo reduzido, como planejado no delineamento experimental.

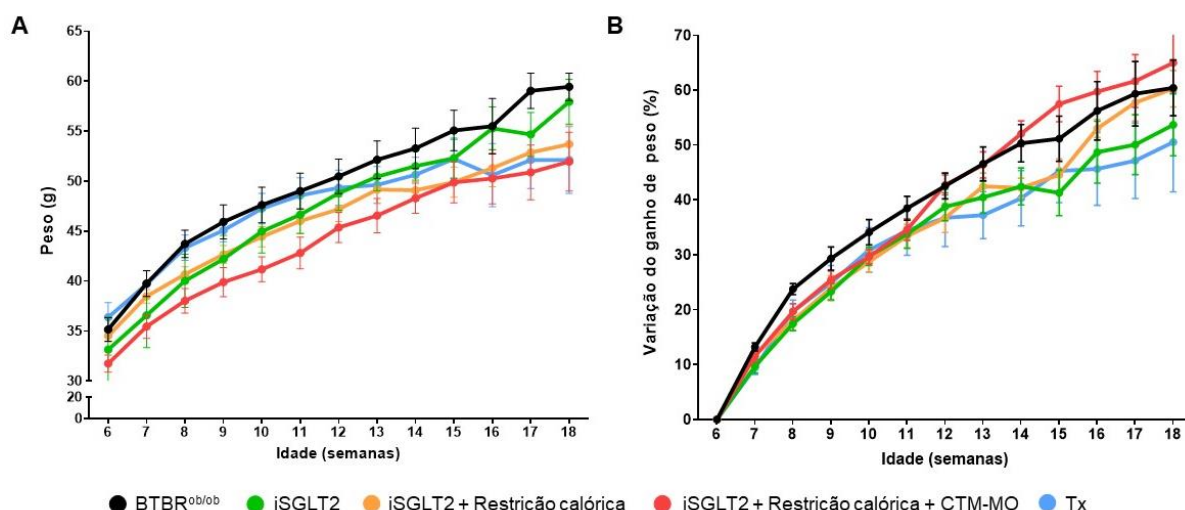


n=9-12. *p<0,05; média ± desvio padrão da média. Modelo de efeito misto, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

Figura 16. Consumo de ração ao longo do tempo dos animais BTBR *wild-type*, BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC e iSGLT2 + RC + CTMs-MO

3.3 Variação do peso

Como forma de avaliar o impacto das estratégias terapêuticas sobre a obesidade dos animais, analisamos os valores de peso ao longo do tempo. Com relação à análise desse parâmetro em gramas (Figura 17A), não pudemos obter diferenças significativas no ganho de peso. Ainda, na análise da variação de peso em porcentagem em relação ao início do acompanhamento (Figura 17B), novamente não obtivemos relevância estatística.



(A) Variação do ganho de peso em gramas ao longo do tempo. (B) Variação do ganho de peso em porcentagem em relação ao início do acompanhamento. $n=6-12$; média $\pm$ desvio padrão da média. **Figura 17.** Variação do ganho de peso ao longo do tempo dos animais BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx

3.4 Glicemia de jejum

Com o objetivo de analisar o impacto das abordagens terapêuticas, avaliamos a variação da glicemia capilar de jejum ao longo do tempo (Tabela 2). Sendo assim, observamos que no início do acompanhamento, com 5 a 6 semanas de idade, o grupo iSGLT2 + RC + CTMs-MO apresentou valores de glicemia menores em comparação aos grupos BTBR^{ob/ob} e iSGLT2, como possível resultado do condicionamento com quantidade reduzida de ração antes da exposição ao iSGLT2.

Já nos *time-points* de 7 e 8 semanas, observamos redução significativa da glicemia apenas no Grupo Tx em relação ao BTBR^{ob/ob}. Enquanto que, com 9 a 10 semanas de idade, identificamos a redução dos níveis glicêmicos do Tx em comparação a todos os demais grupos experimentais.

Contudo, foi possível constatar a eficácia da terapia com CTMs-MO sobre o controle glicêmico a partir de 11 a 12 semanas de idade, tendo sua glicemia reduzida em relação ao BTBR^{ob/ob}, observando-se também que o Tx manteve valores abaixo dos identificados no grupo sem intervenção.

Porém, com 14 a 15 semanas de idade, período em que observamos o pico de glicemia no BTBR^{ob/ob}, pudemos identificar que todas as abordagens terapêuticas testadas até o momento resultaram na redução significativa da glicemia: iSGLT2; iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx. Ainda nesse *time-point*, também

podemos observar diminuição da glicemia dos grupos iSGLT2 + RC + CTMs-MO e Tx em relação aos animais que receberam apenas o iSGLT2. Todavia, esse efeito sobre a glicemia tanto das intervenções convencionais quanto da terapia celular não foi obtido nos *time-points* mais tardios de 16 a 20 semanas, período em que constatamos apenas a eficácia do Tx para a redução da glicemia em comparação ao BTBR^{ob/ob}.

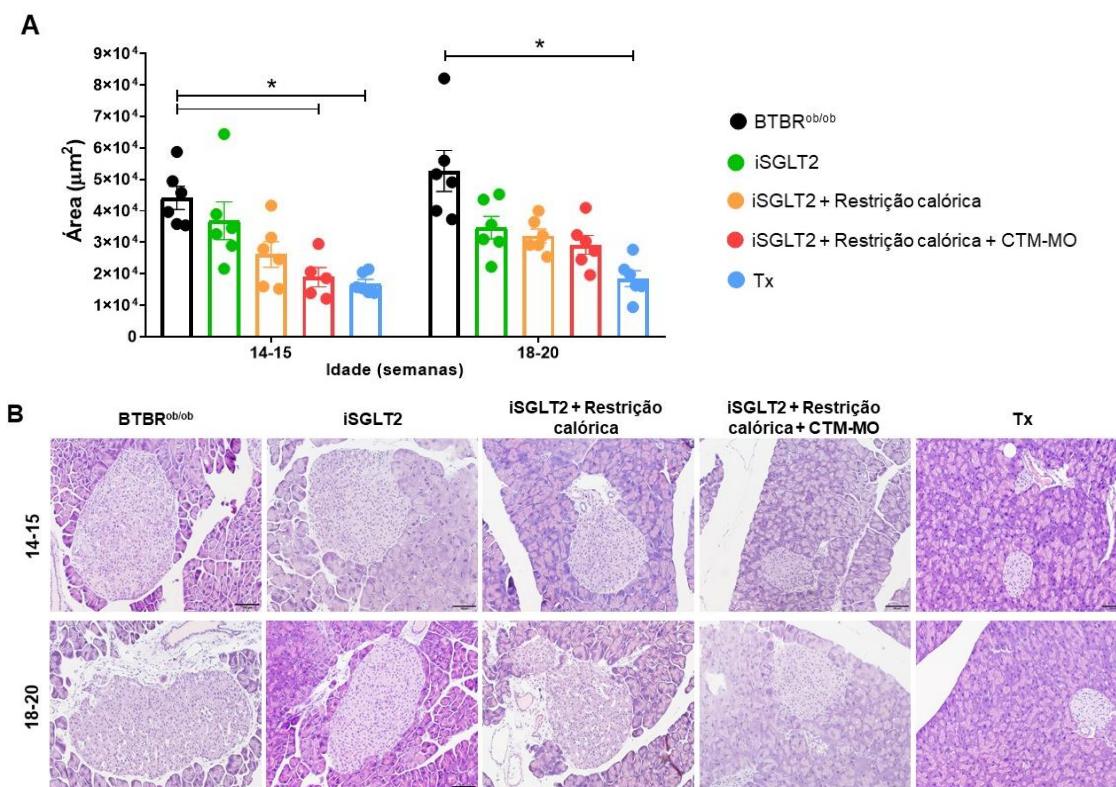
Tabela 2. Variação da glicemia capilar de jejum ao longo do tempo dos grupos BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTM-MO, e Tx

Idades (semanas)	BTBR ^{ob/ob}	iSGLT2	iSGLT2 + RC	iSGLT2 + RC + CTM-MO	Tx
5-6	261 (±103,5)	253,4 (±99,1)	164,3 (±38,9)	144,6 (±29) ^{a,b}	180,8 (±64,3)
7-8	347,9 (±100,7)	254,3 (±76,1)	243,4 (±44,1)	245,9 (±55,1) ^a	193,1 (±43,8) ^a
9-10	393 (±113,9)	282 (±79,3)	282,8 (±82,7)	289,1 (±87,9)	189,8 (±52,7) ^{a,b,c,d}
11-12	377 (±108)	275,6 (±114,8)	270,6 (±83,9)	230,5 (±80,1) ^a	212,3 (±41,3) ^a
14-15	464,8 (±103,8)	343,3 (±71,9) ^a	277,8 (±81,9) ^a	203,8 (±76,7) ^{a,b}	187 (±59,9) ^{a,b}
16-17	361,5 (±76,2)	288,8 (±84,8)	285,8 (±124,8)	219,2 (±76,6)	198,8 (±88) ^a
18-20	322,8 (±72,5)	287,8 (±94,9)	300,6 (±85,2)	266,2 (±115,2)	192,8 (±31,7) ^a

Valores de glicemia em mg/dL por *time-point* dos grupos experimentais BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTM-MO, e Tx. n=9-12. ^a p<0,05 *versus* BTBR^{ob/ob}, ^b p<0,05 *versus* iSGLT2, ^c p<0,05 *versus* iSGLT2 + RC, ^d p<0,05 *versus* iSGLT2 + RC + CTM-MO; média ± desvio padrão. Modelo de efeito misto, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

3.5 Morfometria das ilhotas pancreáticas

Como forma de avaliar o impacto das intervenções sobre a hipertrofia das ilhotas pancreáticas, realizamos a morfometria dessas estruturas (Figura 18A). Identificamos redução significativa da área das ilhotas pancreáticas nos grupos Tx e com associação da terapia celular em relação ao grupo controle sem intervenção em 14 a 15 semanas de idade, condizente com a histologia (Figura 18B). Já no *time-point* mais tardio, observamos apenas significância entre os grupos Tx e BTBR^{ob/ob}, enquanto os demais grupos apresentaram apenas o potencial de diminuição desse parâmetro em relação ao controle.

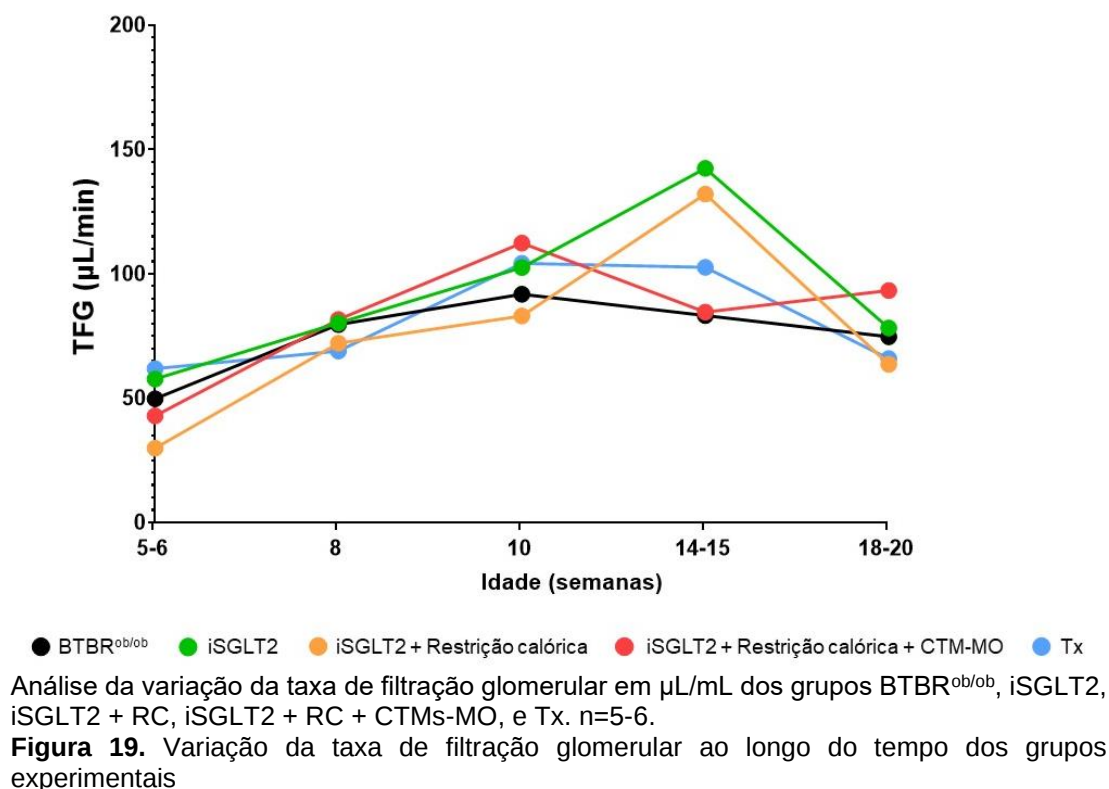


(A) Quantificação da área glomerular em μm^2 . (B) Imagens representativas da histologia das ilhotas pancreáticas dos grupos BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2+ RC + CTMs-MO, e Tx, de 14 a 15 semanas e 18 a 20 semanas de idade, corados com HE. Imagens em aumento de 20X. n=5-6; *p<0,05; média $\pm$ desvio padrão da média. Modelo de efeito misto, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

Figura 18. Avaliação da área das ilhotas pancreáticas em 14-15 e 18-20 semanas de idade dos grupos BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx

3.6 Taxa de filtração glomerular

Realizamos a análise da variação da TFG longo do tempo nos grupos experimentais como forma de avaliar o efeito das intervenções na hiperfiltração glomerular. Todavia, não identificamos diferenças entre os grupos em nenhum dos *time-points* analisados (Figura 19).



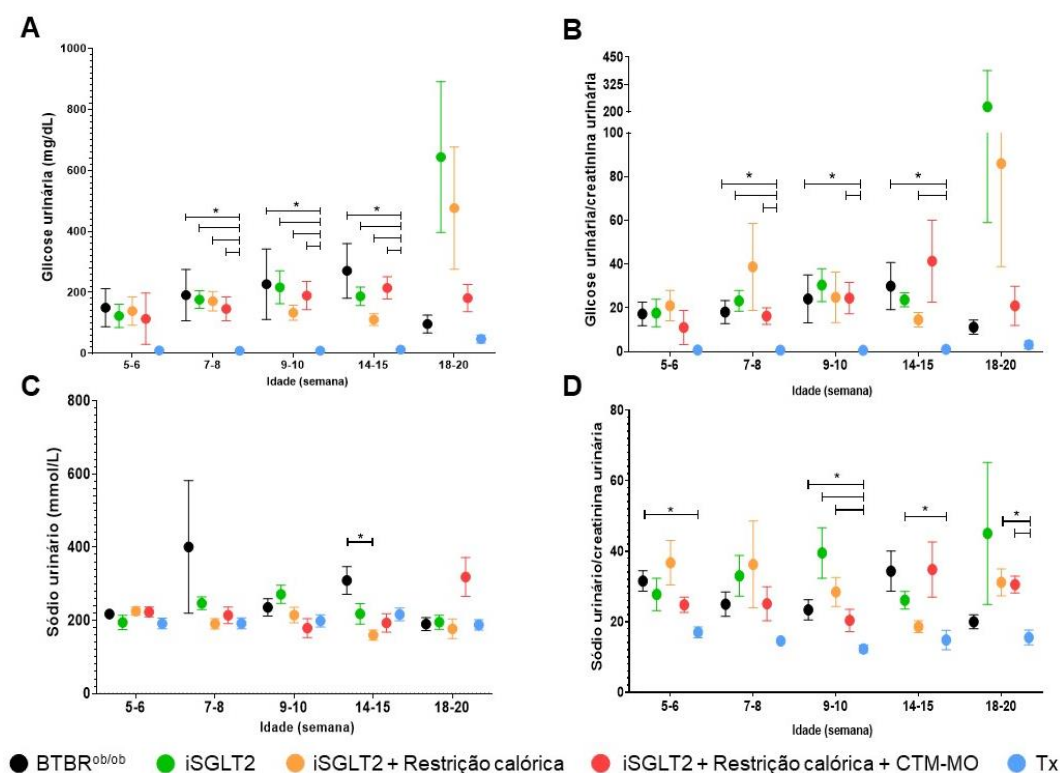
3.7 Glicose e sódio urinários

O mecanismo de ação dos iSGLT2 é a inibição da reabsorção renal de glicose e, como consequência, de sódio, levando assim ao aumento da glicosúria e da natriurese. Portanto, avaliamos esses parâmetros como forma de avaliar a eficácia do tratamento.

Primeiramente, na avaliação da glicosúria entre os grupos experimentais em valores absolutos, identificamos níveis estatisticamente reduzidos nos animais Tx em comparação a todos os demais grupos nos *time-points* de 7 a 15 semanas de idade. Porém, não observamos diferenças entre animais BTBR^{ob/ob} e expostos ao iSGLT2 (Figura 20A).

Contudo, a glicosúria é uma medida que pode sofrer a interferência de diversos fatores, tais como massa muscular e função renal. Nesse sentido, normalizamos os valores de glicose urinária pela creatinúria como estratégia de retirar essa influência e medir a glicosúria de forma mais precisa. Sendo assim, obtivemos novamente valores significativamente reduzida nos animais transplantado em relação a diferentes grupos experimentais de 7 a 15 semanas de idade (Figura 20B).

Em seguida, analisamos a natriurese em valores absolutos e observamos diferença estatística apenas entre os grupos BTBR^{ob/ob} e iSGLT2 + RC no *time-point* de 14-15 semanas (Figura 20C). Com o objetivo de obter uma análise mais precisa, normalizamos novamente esse parâmetro pela creatinúria. Dessa forma, constatamos que o Grupo Tx apresentou menor excreção de sódio em comparação ao BTBR^{ob/ob} no *time-point* de 5-6 e 9-10 semanas de idade; em relação à monoterapia com iSGLT2 em 9-10 e 14-15 semanas; em comparação ao Grupo iSGLT2 + RC em 9-10 e 18-20 semanas; e também em relação ao grupo tratado com a terapia celular no *time-point* de 18-20 semanas. Ademais, foi possível notar um aumento visual da natriurese com a terapia com iSGLT2 em alguns *time-points*, apesar de não significativo (Figura 20D).



(A) Glicosúria em mg/dL. (B) Glicosúria normalizada pela creatinúria. (C) Natriurese em mmol/L. (D) Natriurese normalizada pela creatinúria. n=9-12; *p<0,05; média ± desvio padrão da média. Modelo de efeito misto, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

Figura 20. Níveis de glicosúria e natriurese ao longo do tempo dos grupos BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx

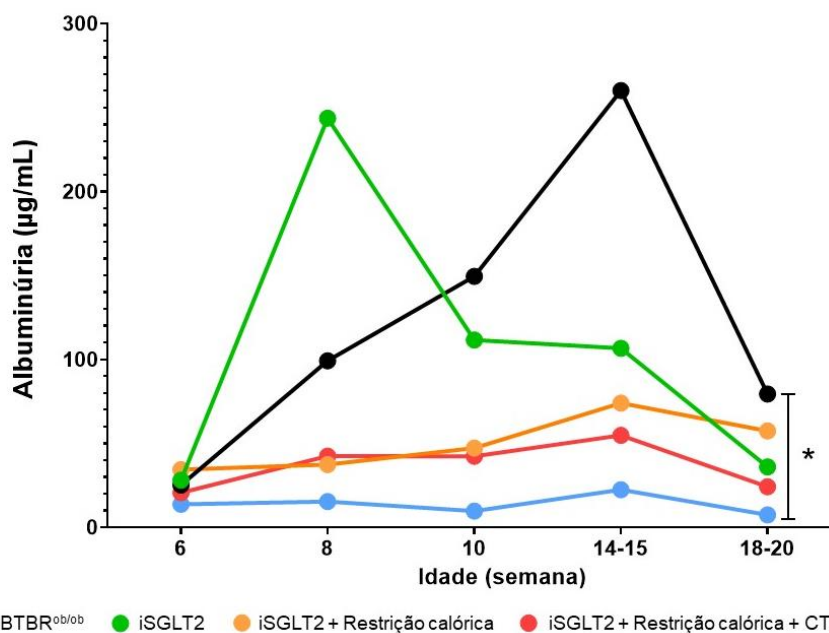
3.8 Albuminúria

Como estratégia para analisar o impacto das estratégias sobre a função podocitária, e consequentemente, sobre a manutenção da barreira de filtração glomerular, realizamos a quantificação da albuminúria ao longo do tempo.

O camundongo BTBR^{ob/ob} apresenta o início da proteinúria com 8 semanas de idade, como descrito anteriormente.⁽⁴⁴⁾ Sendo assim, a partir desse *time-point* é possível observar que esse modelo apresenta um padrão progressivo de aumento dos níveis de albuminúria até 14 a 15 semanas de idade, período em que identificamos o pico da albuminúria, e posterior declínio até 18 a 20 semanas, comportamento semelhante ao mostrado em um estudo anterior de nosso grupo.⁽³⁹⁾

O grupo que realizou o Tx, por sua vez, apresentou progressão reduzida da albuminúria ao longo de todo o acompanhamento em relação ao Grupo BTBR^{ob/ob}. Nos demais grupos, entretanto, não identificamos significância nos níveis de albuminúria em comparação ao controle sem intervenção.

Todavia, foi possível constatar que as abordagens terapêuticas avaliadas possuem o potencial para a redução da progressão desse parâmetro, visto que não apresentaram o pico de albuminúria observado no BTBR^{ob/ob}. Com a monoterapia com iSGLT2, é possível observar um padrão de redução dos níveis de albuminúria ao longo do tempo, enquanto a associação de RC e, principalmente, de CTMs-MO se mostraram estratégias para a menor variação da albuminúria, seguindo um comportamento semelhante ao Grupo Tx.

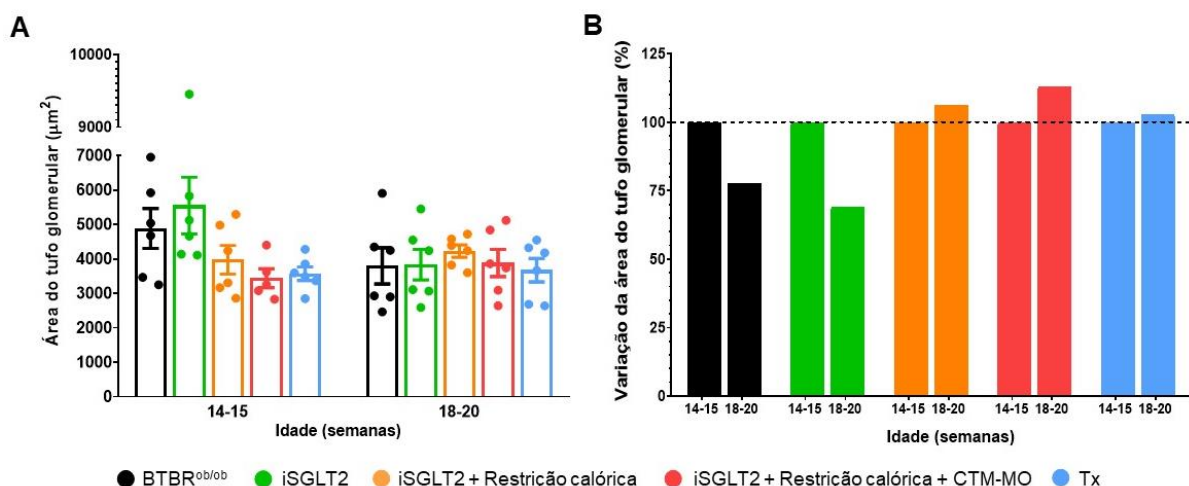


Análise da variação dos níveis de albuminúria em µg/mL dos animais BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx. n=5-6; *p<0,05; média ± desvio padrão da média. Modelo de efeito misto, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

Figura 21. Avaliação da progressão da albuminúria ao longo do tempo nos grupos experimentais

3.9 Análise histológica glomerular

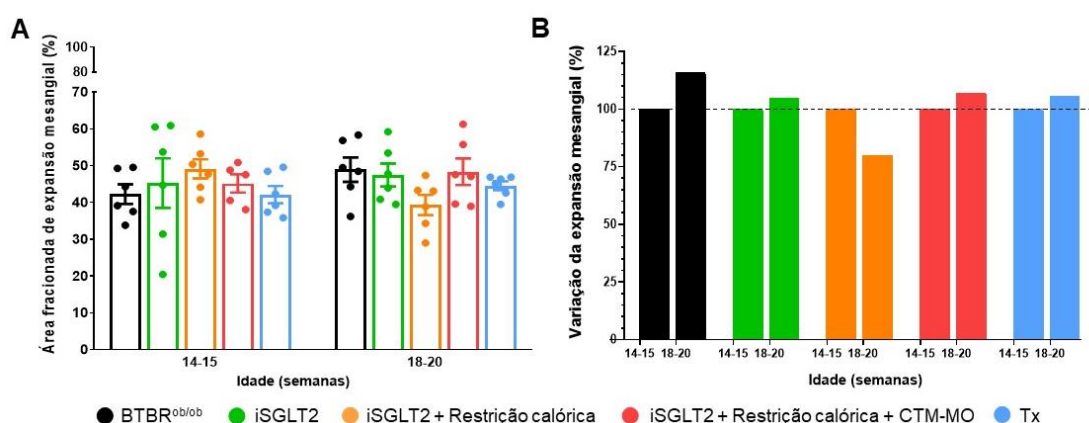
Como análise da morfometria dos glomérulos, realizamos a quantificação da área glomerular nos grupos experimentais. Não observamos diferença estatística entre os grupos tanto em 14 a 15 quanto em 18 a 20 semanas de idade (Figura 20A). Contudo, quando avaliamos esse parâmetro no *time-point* tardio da DRD em comparação aos valores obtidos com 14 a 15 semanas (Figura 20B), verificamos que os grupos BTBR^{ob/ob}, e iSGLT2 apresentaram redução da área glomerular de, aproximadamente, 22 e 31%, respectivamente, enquanto os demais grupos mostraram aumento, sendo essa elevação de cerca de 6,3% nos animais iSGLT2 + RC, 12,9% no iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e 2,8% no Tx.



(A) Quantificação da área glomerular em μm^2 . (B) Variação da área glomerular em porcentagem em relação a 14 a 15 semanas de idade. n=4-6.

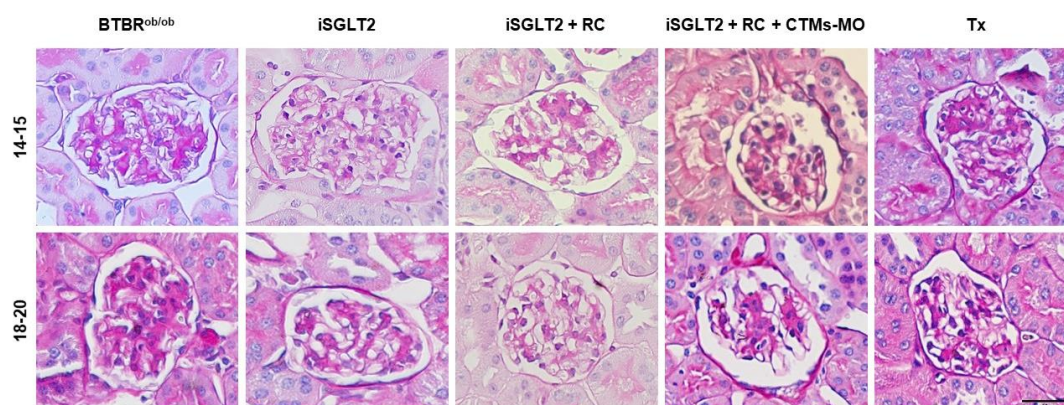
Figura 22. Avaliação da área glomerular em 14-15 e 18-20 semanas de idades dos grupos BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx

Já em relação à expansão mesangial, novamente não constatamos diferenças significativas entre os grupos experimentais em ambos os *time-points* (Figura 21A). Porém, quando comparamos a variação desse parâmetro em 18 a 20 semanas de idade em relação a 14 e 15 semanas (Figura 21B), obtivemos maior aumento da expansão mesangial no Grupo BTBR^{ob/ob} (15,8%), enquanto nos demais animais observamos atenuação do aumento desse parâmetro (iSGLT2, 4,7%; iSGLT2 + RC + CTMs-MO, 7,1%; e Tx, 5,8%), e redução de 20% no Grupo iSGLT2 + RC; condizente com a histologia (Figura 22).



(A) Quantificação da área glomerular em porcentagem. (B) Variação da área glomerular em porcentagem em relação a 14 a 15 semanas de idade. n=5-6.

Figura 23. Avaliação da expansão mesangial em 14-15 e 18-20 semanas de idades dos grupos BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx



Imagens representativas da histologia glomerular dos grupos experimentais através da coloração com ácido periódico de Schiff. Imagens em aumento de 40x.

Figura 24. Deposição de matriz mesangial nos animais BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2+ RC + CTMs-MO, e Tx, de 14 a 15 semanas e 18 a 20 semanas de idade

3.10 Expressão gênica

Realizamos a análise da expressão gênica (*fold change*) tecidual cortical de diferentes marcadores em relação ao animal BTBR^{ob/ob}.

Para a avaliar do impacto das abordagens sobre a expressão de marcadores podocitários, primeiramente avaliamos a expressão de WT-1 (Figura 25A). Identificamos que os grupos experimentais apresentaram níveis diminuídos da expressão gênica de WT-1 em relação ao grupo sem intervenção com 14 a 15 semanas de idade, porém, no *time-point* mais tardio, observamos o aumento da expressão no grupo com terapia associada, com maior potencial de elevação na combinação com a terapia celular. Este achado indica maior preservação dos podócitos nos grupos tratados.

Já na análise da expressão do gene *nphs1*, que codifica a nefrina, uma proteína responsável pela manutenção da estrutura e função da fenda diafragmática, constatamos níveis reduzidos em comparação com o BTBR^{ob/ob} em ambos os *time-points* (Figura 25B). Entretanto, na expressão do gene que codifica a sinaptopodina, uma proteína presente no citoesqueleto podocitário, observamos elevação da expressão nos grupos com a medicação e na combinação com a terapia celular em 14 a 15 semanas, sendo a terapia associada à administração de CTMs-MO efetiva para a manutenção do aumento desse aumento até 18 a 20 semanas, enquanto o Grupo iSGLT2 se iguala aos níveis de expressão do BTBR^{ob/ob} (Figura 25C).

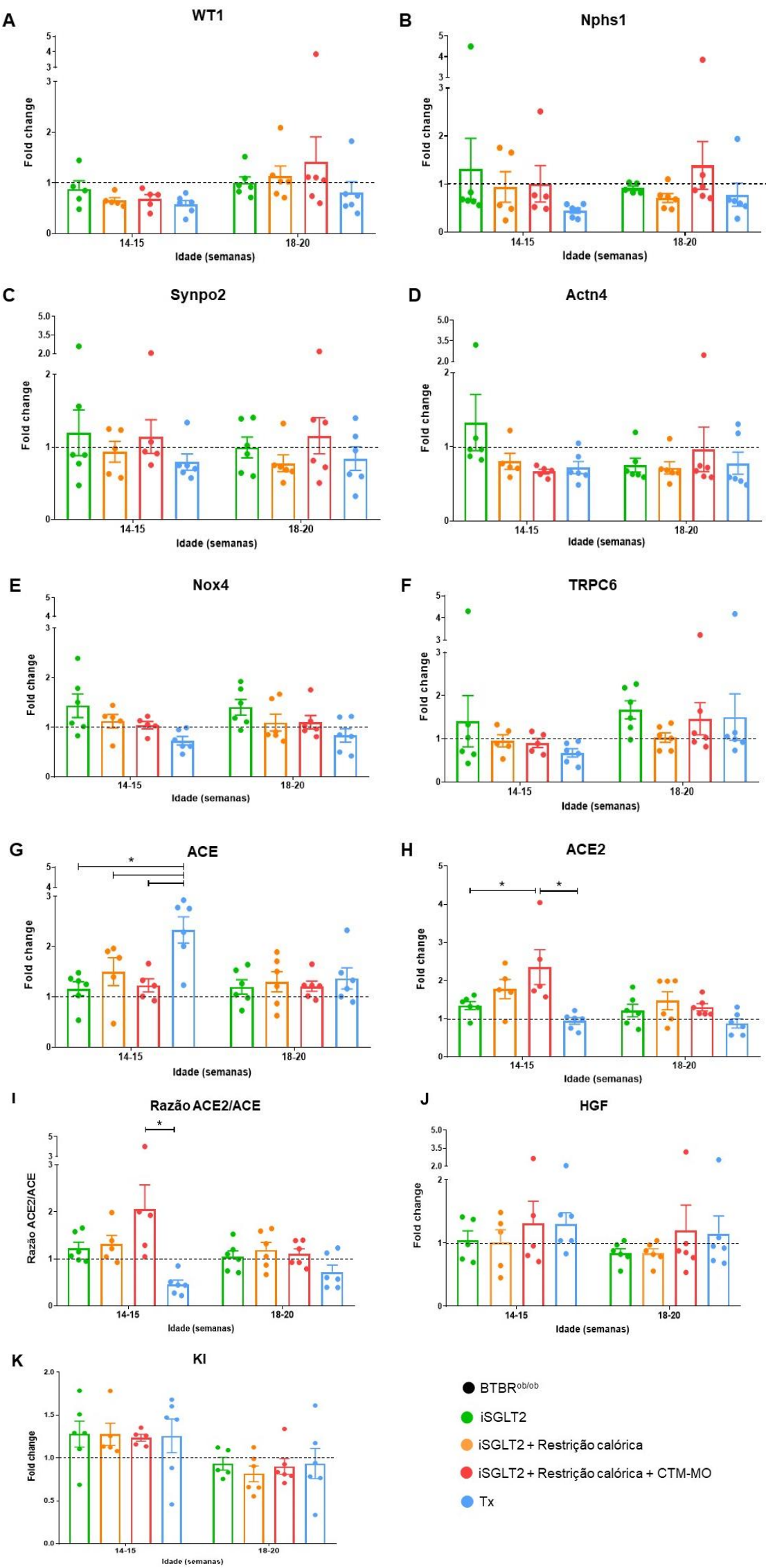
Em relação à expressão de α -actinina-4, outra proteína do citoesqueleto, verificamos aumento no Grupo iSGLT2 em 14 a 15 semanas em

comparação ao BTBR^{ob/ob}, porém reduzida no *time-point* mais tardio e nos demais grupos experimentais (Figura 25D).

Com relação à expressão dos componentes da via Ang II/Nox4/TRPC6, observamos que o grupo em monoterapia com iSGLT2 apresenta expressão gênica aumentada de Nox4 em ambos os *time-points* em comparação com o animal BTBR^{ob/ob}, enquanto os animais Tx e os que receberam a associação de intervenções apresentaram, respectivamente, expressão reduzida e expressão equivalente em comparação ao grupo não tratado (Figura 25E). Já em relação à expressão gênica de TRPC6 notamos um comportamento semelhante, porém com aumento dos níveis nos grupos iSGLT2, iSGLT2 + RC + CTM-MO e Tx quando comparados ao BTBR^{ob/ob} (Figura 25F).

Ademais, investigamos também a expressão dos genes ace e ace2, que codificam ECA e ECA2, respectivamente, e, assim, avaliar a ativação do SRAA intra-renal. Nesse sentido, identificamos o aumento de ECA em todas as abordagens, tendo obtido significância entre o Tx e os demais grupos experimentais (Figura 25G). Na expressão de ECA2, no entanto, o Tx se mostrou reduzido em comparação ao animal diabético BTBR^{ob/ob}. Entretanto, observamos também que os animais que recebem a intervenção com iSGLT2 possuem maior expressão de ECA2, sendo a combinação com CTMs-MO mais efetiva em comparação à monoterapia em 14 a 15 semanas, mantendo-se elevado em relação ao BTBR^{ob/ob} até 18 a 20 semanas de idade (Figura 25G). Nesse sentido, a razão entre a expressão de ECA2 e ECA indica o direcionamento para a via renoprotetora ECA2/Ang (1-7)/Mas com a terapia celular (Figura 25I).

Por fim, analisamos a expressão gênica de fatores renoprotetores. Com relação à expressão de HGF, identificamos que a adição da terapia celular promoveu o aumento da transcrição desse fator em comparação ao animal sem intervenção até 18 a 20 semanas de idade, apresentando um comportamento semelhante ao Grupo Tx, enquanto a monoterapia e associação apenas à RC não apresentou esse potencial (Figura 25J). Na expressão de Klotho, no entanto, observamos o aumento a nível de RNA mensageiro em todos os grupos tratamento quando comparados ao BTBR^{ob/ob} em 14 a 15 semanas idade, porém identificamos níveis reduzidos no *time-point* mais tardio (Figura 25K).

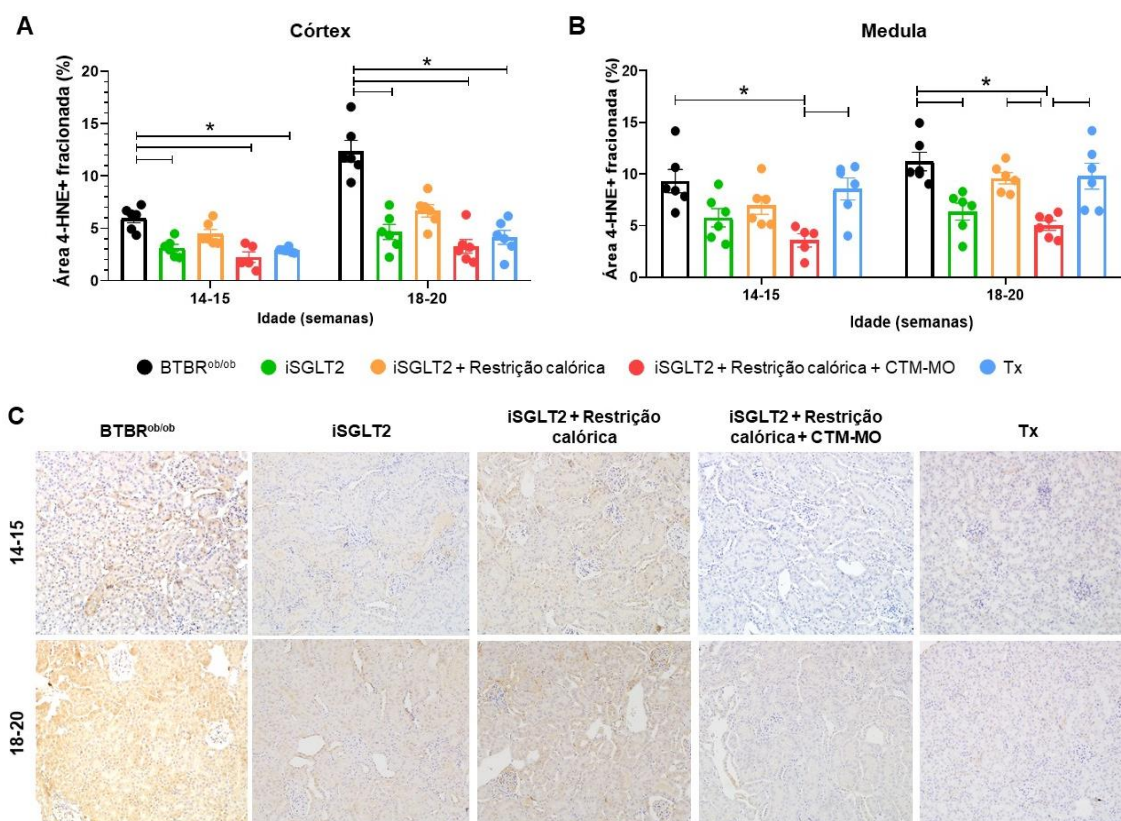


(A) Expressão gênica de WT1. (B) Expressão gênica de Nphs1. (C) Expressão gênica de Synpo2. (D) Expressão gênica de Actn4. (E) Expressão gênica de Nox4. (F) Expressão gênica de TRPC6. (G) Expressão gênica de Ace. (H) Expressão gênica de Ace2. (I) Razão entre a expressão de ECA2 e ECA. (J) Expressão gênica de HGF. (K) Expressão gênica de Klotho. n=5-6*; p<0,05; média ± desvio padrão da média. Modelo de efeito misto, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

Figura 25. Expressão gênica de marcadores podocitários e renoprotetores e componentes da via Ang II/Nox 4/TRPC6 e ECA2 e Klotho nos grupos experimentais em relação ao BTBR^{ob/ob} nos time-points de 14 a 15 semanas e 18 a 20 semanas de idade

3.11 Peroxidação lipídica

Realizamos a análise do estresse oxidativo tecidual cortical e tecidual por meio de peroxidação lipídica pelo marcador 4-HNE. Sendo assim, obtivemos redução dos níveis de peroxidação lipídica no córtex de animais tratados com iSGLT2 em monoterapia, na associação à terapia celular e Tx em ambos os períodos de acompanhamento em comparação ao controle sem intervenção (Figura 26A), condizente com o observado na histologia (Figura 26C). Contudo, na análise da porção medular, o grupo tratado com o Tx não apresentou diferença da marcação de 4-HNE com os animais BTBR^{ob/ob}. Ademais, com 14 a 15 semanas, pudemos observar redução do estresse oxidativo medular no grupo tratado com a terapia celular em relação ao controle e ao Tx, enquanto que em 18 a 20 semanas essa redução ainda foi possível identificar esse potencial das CTMs-MO, além de também termos obtido significância tanto desse grupo em relação à associação com RC, e do grupo com monoterapia em comparação ao controle (Figura 26B).

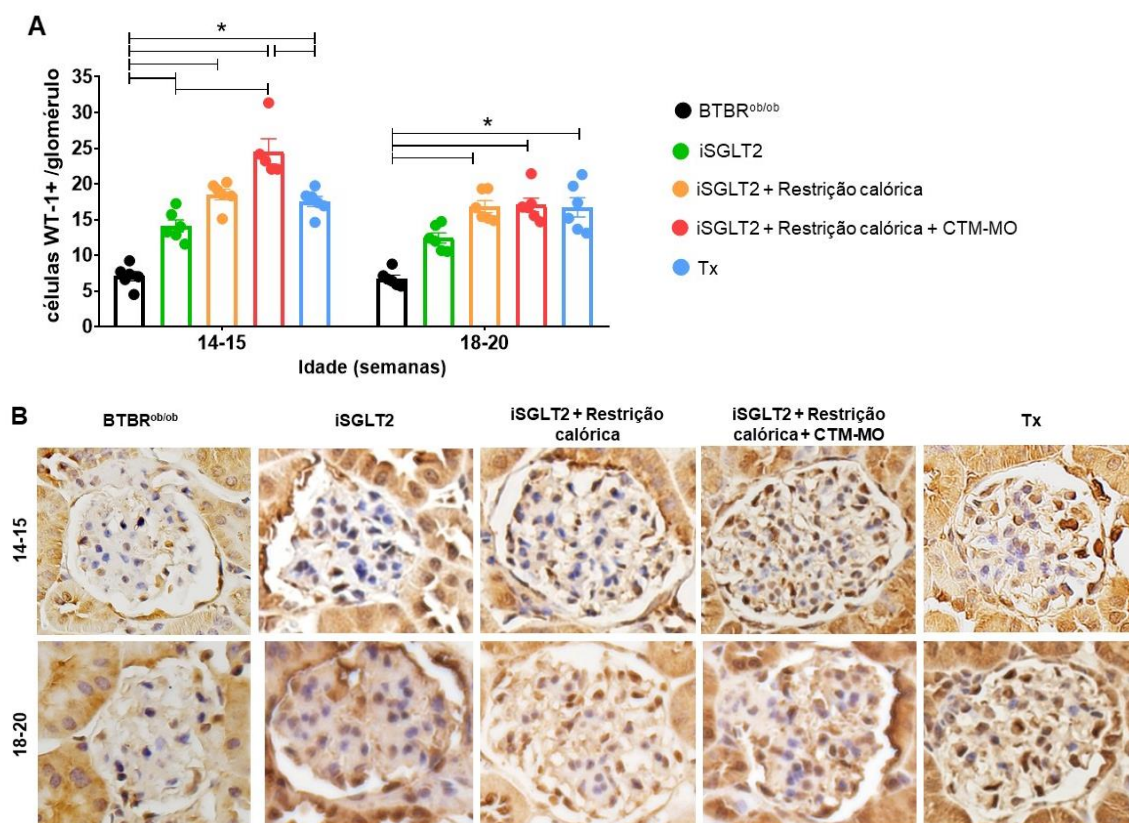


(A) Quantificação da área fracionada cortical marcada por 4-HNE. (B) Quantificação da área fracionada medular marcada por 4-HNE. (C) Imagens representativas da peroxidação lipídica cortical dos grupos BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e Tx, de 14 a 15 semanas e 18 a 20 semanas de idade. Imagens em aumento de 20X. n=5-6; *p<0,05; média $\pm$ desvio padrão da média. Modelo de efeito misto, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

Figura 26. Avaliação do estresse oxidativo através da peroxidação lipídica pelo marcador 4-HNE nos grupos experimentais

3.12 Quantificação de podócitos

A quantificação do número de podócitos é essencial para avaliar o potencial das terapias na preservação dessas células. Portanto, realizamos essa mensuração através da marcação de células positivas para WT-1 por glomérulo e obtivemos, 14 a 15 semanas de idade, significância entre os diferentes grupos experimentais: iSGLT2 e BTBR^{ob/ob}; iSGLT2 + RC e BTBR^{ob/ob}; iSGLT2 + RC + CTMs-MO, e BTBR^{ob/ob}; Tx e BTBR^{ob/ob}; iSGLT2 + RC + CTMs-MO e Tx; e, por fim, entre iSGLT2 + RC + CTMs-MO e monoterapia com iSGLT2. Ainda, no *time-point* mais tardio, observamos diferença estatística, em comparação ao controle sem intervenção, nos grupos iSGLT2 + RC, iSGLT2 + RC + CTMs-MO e Tx (Figura 27A); sendo a mensuração condizente com o observado na histologia (Figura 27B).



(A) Quantificação do número de podócitos por meio da marcação de WT-1. (B) Imagens representativas da quantificação de podócitos dos grupos BTBR^{ob/ob}, iSGLT2, iSGLT2 + RC, iSGLT2+ RC + CTMs-MO, e Tx, de 14 a 15 semanas e 18 a 20 semanas de idade. Imagens em aumento de 20X. n=5-6; *p<0,05; média ± desvio padrão da média. Modelo de efeito misto, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

Figura 27. Mensuração da quantidade de podócitos nos grupos experimentais através da marcação de *Wilms' tumour-1*

4 DISCUSSÃO

Frente ao cenário epidêmico da prevalência de DM e a previsão de amplo aumento dos casos para as próximas décadas, há a necessidade da investigação e implementação de novas estratégias terapêuticas para a atenuação do desenvolvimento e progressão de suas complicações.

Nesse sentido, utilizamos o animal BTBR^{ob/ob} por ser o modelo mais robusto para o estudo de DM e DRD. Apesar da classificação dos estágios da doença em humanos não poder ser aplicada em camundongos, esse modelo apresenta alterações semelhantes às vistas nos estágios iniciais da doença, tais como hiperglicemia, proteinúria, hipertrofia glomerular, expansão mesangial, mesangiólise e perda de podócitos como forma de avaliar a eficácia de novas terapias.^(44,45)

Nesse sentido, utilizamos o BTBR^{ob/ob} como forma de investigar o impacto de diferentes abordagens no surgimento e progressão da DRD, sendo elas a exposição à medicação de empagliflozina, mudança nos hábitos de vida, representada pela RC, e terapia com CTMs-MO alogênicas. Em relação ao uso da terapia celular, nosso grupo já havia reportado o potencial das CTMs para o tratamento da DRD em monoterapia nesse modelo. Porém, este é o primeiro trabalho que buscou investigar o potencial da combinação de práticas já adotados na prática clínica com a terapia celular no animal BTBR^{ob/ob}.

Sendo assim, delineamos o estudo de forma a apresentar seu potencial translacional para seres humanos. Primeiramente, utilizamos o iSGLT2 na dose de 25mg e administrado por via oral na ração, sendo ambas empregadas de forma a mimetizar a clínica.⁽²⁰⁾ Além disso, a escolha da infusão de CTMs por via intraperitoneal novamente seguiu esse princípio.

Por ser menos invasiva, a administração intraperitoneal possui maior potencial em seres humanos. Porém, sua capacidade em garantir o tropismo das células para o tecido renal ainda é controversa. Em estudos pré-clínicos, com heterogeneidade de que variaram de modelos murinos a suínos, alguns trabalhos não identificaram CTMs nos rins após a infusão, enquanto parte obteve resultados positivos que divergiram de detecção em apenas órgãos abdominais à distribuição sistêmica após alguns dias.⁽³⁸⁾

Entretanto, é importante ressaltar a capacidade endócrina dessas células. Esse trabalho buscou investigar o potencial do secretoma das CTMs em

sinergismo a outras estratégias terapêuticas da DRD. Sendo assim, também avaliamos a validade da via intraperitoneal para este propósito e, apesar de não termos empregado metodologias para a averiguar a biodistribuição das células, observamos resultados promissores que indicam a efetividade da via escolhida.

Todavia, vale pontuar que o animal BTBR^{ob/ob} é obeso e possui grande quantidade de gordura subcutânea e inguinal no local de administração. Portanto, não descartamos a possibilidade de as CTMs terem sido infundidas e permanecido na gordura branca. Porém, o tecido adiposo é ricamente vascularizado e, sendo assim, há o potencial da manutenção da ação endócrinas dessas células.⁽⁴⁹⁾

Ademais, o camundongo BTBR^{ob/ob} é um modelo já bem estabelecido de reversão da DRD através da administração de leptina,^(26,45) e, sendo um modelo permissivo para a reversão, permite investigar os mecanismos subjacentes às limitações dos tratamentos para DRD. Nesse sentido, como forma de comparação às intervenções propostas, utilizamos a metodologia do Tx para restauração dos níveis de leptina e, conseqüentemente, reversão do fenótipo diabético.

Para tanto, comparamos os resultados funcionais obtidos nesses animais, como ganho de peso, glicemia capilar de jejum e glicosúria, em relação aos dados de animais BTBR^{ob/ob} sem intervenção e BTBR *wild-type*, isto é, comparação com animais diabéticos e não diabéticos.

A leptina atua no controle do peso corporal tanto através da sua ação no sistema nervoso central, por meio do estímulo à síntese de neuropeptídeos redutores do apetite e inibição de neuropeptídeos estimulantes do apetite no hipotálamo,^(50,51) quanto sua ação periférica, sendo exemplos o controle do esvaziamento gástrico que contribui para a saciedade e a ativação da termogênese através do aumento da atividade nervosa simpática no tecido adiposo marrom.^(46,51) Nesse sentido, estudos que utilizaram a administração exógena desse hormônio no camundongo BTBR^{ob/ob} mostraram a redução do ganho de peso.^(26,45) Tal efeito, no entanto, não foi observado em nosso estudo.

Isso decorre do efeito dose-dependente da leptina.^(52,53) Sendo assim, apesar de não termos avaliado os valores de leptina plasmática nos animais, é possível que a metodologia do Tx não restabeleça os níveis séricos necessários para restaurar a saciedade e o controle de peso, assim como os trabalhos com o hormônio exógeno demonstram. Entretanto, a leptina possui ação sobre a glicemia independente da sua

influência sobre o peso corporal, visto que a administração mesmo em doses baixas, que não afetam a ingestão calórica, resultam na redução dos níveis de glicose circulante.⁽⁵⁴⁾

De fato, obtivemos o controle glicêmico esperado com a metodologia do Tx. Observamos níveis de glicemia e glicosúria semelhantes aos apresentados por animais BTBR *wild-type*, tendo ambos os grupos tais parâmetros reduzidos em comparação ao BTBR^{ob/ob}.

A leptina atua em processos como sensibilidade à insulina, captação de glicose e síntese de glicogênio na musculatura esquelética, fígado, tecido adiposo e pâncreas, por meio de diferentes mecanismos.⁽⁵⁵⁾ Como exemplo, há evidências de que a leptina mimetiza o efeito da insulina através de vias de sinalização associadas ao transporte de glicose em células musculares.⁽⁵⁵⁾ Além disso, a leptina também apresenta ação inibitória sobre a produção e secreção de insulina pelas células-β pancreáticas,⁽⁵⁴⁾ mecanismo que reduz a hiperinsulinemia, redução da resistência periférica à insulina e potencialmente contribui para a preservação da morfologia da ilhota pancreática, vista tanto em nossos resultados quanto já descrita na literatura.⁽⁴⁵⁾

Em relação aos parâmetros renais, obtivemos em animais do Grupo Tx redução da albuminúria, atenuação da expansão mesangial, diminuição do estresse oxidativo cortical e preservação do número de podócitos em comparação ao Grupo BTBR^{ob/ob}, achados condizentes com estudos que utilizaram o restabelecimento dos níveis de leptina para a reversão da doença.^(26,45) Portanto, o animal Tx representa um animal com a doença revertida, porém ainda com o *background* da obesidade; e, sendo assim, utilizamos esse grupo como controle funcional para a redução da progressão da DRD.

A obesidade, de fato, foi uma condição em que não pudemos observar alterações durante o acompanhamento dos grupos experimentais. Não foi possível identificar o efeito das estratégias estudadas sobre o ganho de peso, tanto em valores absolutos quanto na análise da variação em relação ao início do acompanhamento.

Contudo, a constância desse parâmetro pode ser explicada pelo mecanismo de ação do iSGLT2, visto que o grupo que recebeu a monoterapia com a medicação apresentou ingesta elevada de ração. Estima-se que, em seres humanos, o aumento da glicosúria equivale a um déficit calórico de 3600 calorias, ou 450 gramas, em um período de 14 a 15 dias de exposição ao inibidor.⁽²²⁾ De fato, em um primeiro momento, estudos mostraram que o uso de iSGLT2 leva a uma pequena perda de peso, porém logo ocorre o aumento da ingestão calórica, possivelmente como um mecanismo

compensatório.⁽²⁴⁾ Nesse sentido, esse efeito combinado à falta da inibição da saciedade pelo *knockout* de leptina leva ao aumento da hiperfagia nos animais BTBR^{ob/ob}.⁽²³⁾

Nesse cenário, há a perspectiva da associação de iSGLT2 a outras medicações que atuam no controle da saciedade do peso corporal, sendo um exemplo a classe dos agonistas do receptor de GLP-1 (*Glucagon-like peptide-1*). O GLP-1 é um hormônio amplamente expresso no intestino que apresenta um impacto positivo sobre a homeostase energética e de glicose. Por meio do estímulo à secreção de insulina dependente de glicose e inibição da secreção de glucagon, além de reduzir o esvaziamento gástrico, a ação desse hormônio resulta na diminuição da ingestão calórica e, assim, controle do peso corporal.⁽⁵⁶⁾ Nesse sentido, a utilização de agonistas do receptor do GLP-1 apresenta potencial de proteção cardiovascular, levando à redução da pressão arterial sistêmica e preservação da função cardíaca; além de efeitos renoprotetores, com diminuição da albuminúria e alteração na TFG.^(56,57)

Além disso, utiliza-se na clínica também para o tratamento de DM e DRD a combinação dos iSGLT2 com a metformina, um fármaco que apresenta ação hipoglicemiante através da redução da absorção intestinal de glicose, diminuição da gliconeogênese hepática, e melhora da resistência periférica à insulina.^(20,58) Neste trabalho, no entanto, com objetivo de investigar a associação dos iSGLT2 com a terapia celular, obtivemos redução dos níveis glicêmicos tanto com o iSGLT2 em monoterapia quanto em combinação às demais abordagens avaliadas.

Notou-se redução da glicemia entre o Grupo BTBR^{ob/ob} e a monoterapia com iSGLT2 em 14 a 15 semanas de idade, período em que ocorreu o pico de hiperglicemia do BTBR^{ob/ob} em nosso estudo. No entanto, vimos que a associação de tratamentos e terapia celular, abordagem representada pelo Grupo iSGLT2 + RC + CTM-MO, apresentou a capacidade de potencializar o controle glicêmico, visto que observou-se o efeito sobre a glicemia em um *time-point* anterior, com 11 a 12 semanas de idade, em níveis semelhantes ao Grupo Tx.

Nesse sentido, o mecanismo pelo qual as CTMs promovem a melhora na glicemia ocorre através do aumento da sensibilidade da insulina. A infusão dessa terapia induz o aumento da função das células-β pancreáticas, com maior secreção de insulina, ao mesmo tempo que modulam a expressão e disponibilidade de transportadores de glicose na membrana plasmática, como o aumento da expressão de GLUT4 na musculatura esquelética, tecido adiposo e fígado; levando, assim, à redução da resistência periférica à insulina.⁽⁵⁹⁾

Ademais, identificamos o efeito tempo-dependente da terapia celular. Administramos as CTMs-MO com 8 a 10 semanas de idade, portanto, o efeito das células mesenquimais na glicemia se manteve até duas a quatro semanas após a injeção. Todavia, o efeito não se sustentou e não foi identificado nos *time-points* mais tardios, a partir de 16 semanas. Isso ocorre devido ao curto tempo de viabilidade dessas células no organismo após a administração. Nesse sentido, a literatura diverge sobre seu período de permanência, sendo possível detectá-las de 24 horas a 14 dias pós infusão.⁽⁶⁰⁻⁶²⁾

Em outros modelos de DM, a terapia com CTMs-MO demonstrou potencial de redução da glicemia,⁽⁶³⁾ porém evidenciam a necessidade de uma maior quantidade de doses para a manutenção do efeito hipoglicemiante.^(59,64) Todavia, apesar de uma série de artigos reportar o potencial da terapia com CTMs, um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa não obteve o mesmo resultado no BTBR^{ob/ob} com as células em monoterapia,⁽³⁹⁾ pois, por ser um modelo grave da doença, apenas uma única abordagem terapêutica não foi suficiente para o controle da hiperglicemia crônica.

Já em relação à análise dos parâmetros renais, não identificamos redução da hiperfiltração em nenhum grupo experimental, porém é possível que sejam necessários maiores períodos de acompanhamento nesses animais para a avaliação do efeito das intervenções sobre a TFG. No estudo clínico EMPA-REG, por exemplo, a empagliflozina se mostrou efetiva para a redução do risco de progressão para doença renal de estágio terminal, todavia identificou-se a preservação da TFG apenas a partir de 18 meses após o início da medicação.⁽²⁵⁾

Além disso, é importante considerar o impacto da obesidade sobre a TFG e a falta de alteração nesse parâmetro pelas intervenções aplicadas. A obesidade, de fato, é uma condição associada à hiperfiltração como uma resposta compensatória ao aumento das demandas metabólicas associadas ao excesso de peso corporal.⁽⁶⁵⁾

Com relação à excreção de glicose e sódio, no entanto, não observamos um efeito significativo sobre esses parâmetros das abordagens tanto em monoterapia quanto na associação de estratégias quando comparadas aos animais BTBR^{ob/ob}. Uma vez que mecanismo de ação dos iSGLT2 se dá com a inibição desse cotransportador, ocorre o aumento da excreção de glicose e sódio.⁽²¹⁾ Em seres humanos, no entanto, a variação nesses parâmetros também não é identificada.⁽⁶⁶⁾ Contudo, já estão descritos na literatura mecanismos que podem explicar o porquê de não haver o aumento esperado da glicosúria e natriurese com a inibição do SGLT2.

A empagliflozina, iSGLT2 empregado no estudo, apresenta 2500 vezes maior seletividade para o SGLT2 em relação ao *sodium-glucose co-transporter 1* (SGLT1), sendo o iSGLT2 mais potente em relação aos demais fármacos existentes atualmente.⁽⁶⁷⁾ Em condições fisiológicas, o SGLT1 atua abaixo de sua capacidade de reabsorção de glicose devido à sua posição mais distal no túbulo proximal, isto é, após grande parte da glicose ter sido captada pelo SGLT2. Sendo assim, devido à inibição do SGLT2 e baixa afinidade da medicação ao SGLT1, esse cotransportador aumenta sua porcentagem de absorção de 10-20% para 30-40%.⁽²²⁾ Além disso, é importante considerar também o efeito da hipertrofia renal, uma vez que indivíduos diabéticos apresentam as estruturas renais hipertrofiadas e, como consequência, o aumento da expressão dos transportadores.⁽²¹⁾ Nesse sentido, no BTBR^{ob/ob}, ocorre a diminuição do SGLT2 e o aumento da expressão de SGLT1 ao longo do tempo,⁽⁴⁸⁾ sendo essa elevação do SGLT1 mais acentuada quando no tratamento com a empagliflozina.^(23,26)

Com relação à análise histológica renal, não obtivemos significância no dado da área glomerular em valores absolutos entre os grupos. Porém, em 14 a 15 semanas de idade, é possível observar um potencial aumento desse parâmetro no tratamento com iSGLT2 em monoterapia, enquanto nos grupos em associação com RC com ou sem terapia celular é possível notar potencial atenuação da hipertrofia glomerular em comparação aos animais BTBR^{ob/ob}, seguindo um comportamento semelhante ao Grupo Tx. Com 18 a 20 semanas, no entanto, todos os grupos apresentaram valores semelhantes.

Entretanto, as evidências do efeito do iSGLT2 na hipertrofia glomerular no modelo BTBR^{ob/ob} são contraditórias. Enquanto a utilização de empagliflozina demonstrou alteração na área glomerular em um estudo,⁽²³⁾ a exposição a outro fármaco da mesma classe, ipragliflozina, não apresentou ação sobre a hipertrofia em outro trabalho.⁽²⁴⁾ Em ambos estudos, no entanto, observou-se redução da albuminúria.

De fato, constatamos a redução da progressão da albuminúria ao longo do tempo na monoterapia com iSGLT2, porém com maior potencial quando em combinação à RC e terapia celular. É possível associar esta observação à progressão da expansão mesangial em nossos grupos tratamento. Na análise dos valores brutos, novamente não obtivemos diferença estatística. Porém, quando avaliamos a porcentagem de variação no *time-point* tardio em relação a 14 a 15 semanas, constatamos o aumento de cerca de 16% desse parâmetro no Grupo BTBR^{ob/ob},

enquanto os demais grupos apresentaram atenuação da expansão mesangial, seguindo resultados semelhantes aos demonstrados em demais estudos.^(24,26,34)

O efeito benéfico das terapias sobre os parâmetros mencionados associa-se à expressão dos fatores renoprotetores HGF e Klotho. A sinalização mediada pelo HGF apresenta efeitos antifibróticos por meio da supressão de TGF- β e ativação de macrófagos M2.^(7,68) Observamos que a expressão gênica desse fator nos grupos iSGLT2 com ou sem RC se mostrou equivalente e reduzida em comparação ao Grupo BTBR^{ob/ob} nos *time-points* de 14 a 15 semanas e 18 a 20 semanas de idade, respectivamente. Todavia, quando associada à terapia celular, nossa abordagem resultou no aumento da expressão de HGF em ambos os períodos de acompanhamento, apresentando nível de expressão semelhante ao Grupo Tx.

O HGF é expresso no rim em células epiteliais, mesangiais e endoteliais. Em lesões renais agudas, esse fator se apresenta aumentado como mecanismo compensatório de promoção de reparo, porém sua expressão reduz ao longo do tempo, assim como é observado na progressão de doenças crônicas.^(11,69) Contudo, CTMs também apresentam ampla expressão desse fator, portanto a administração de HGF exógeno se mostra uma estratégia eficaz para a redução da progressão da DRD.^(8,70)

Já o Klotho, é comumente descrito como a proteína do envelhecimento. Isso porque animais *knock-out* para o gene do Klotho apresentam alterações relacionadas à idade em humanos, tal como redução da expectativa de vida, fibrose renal e calcificação vascular.⁽⁸⁾ De fato, observamos a redução de sua expressão gênica entre os períodos analisados. Todavia, em nosso *time-point* intermediário de 14 a 15 semanas de idade, identificamos o aumento dos níveis de Klotho nos grupos com intervenção em comparação ao Grupo BTBR^{ob/ob}, indicando a modulação da expressão de Klotho com o tratamento.

Já em relação ao SRAA, o sistema se apresenta aumentado no DM devido ao efeito crônico da hiperglicemia e é comum que pacientes diabéticos também apresentem hipertensão arterial sistêmica.⁽²¹⁾ Porém, devido ao *knock-out* de leptina, o BTBR^{ob/ob} é hipotenso em relação ao animal *wild-type*.^(24,44,45)

A leptina promove o aumento da atividade simpática tanto no sistema nervoso quanto no rim através da ativação do eixo ECA/Ang-II/AT1R do sistema renina-angiotensina, promovendo o aumento da pressão arterial.⁽⁷¹⁾ O grupo experimental que

recebeu o tratamento para restauração de leptina, de fato, apresentou expressão gênica cortical aumentada em cerca de duas vezes em comparação ao BTBR^{ob/ob}.

Contudo, apesar de hipotenso, foi demonstrado que a administração do bloqueador do SRAA nesse modelo atenua os efeitos da DRD, indicando, portanto, que nestes animais deva ocorrer ativação local de Ang II e hipertensão glomerular.⁽²³⁾ Sendo assim, investigamos a expressão gênica de ECA e ECA2 nos demais grupos intervenção como forma de identificar a modulação do SRAA. Os grupos com iSGLT2 com ou sem combinação às demais estratégias apresentaram elevação da expressão de ambos os genes em relação ao Grupo BTBR^{ob/ob} nos dois períodos analisados, indicando maior ativação de ambos os eixos do sistema. Todavia, é possível que este achado esteja relacionado ao tempo de exposição à medicação, sendo necessário maior tempo de acompanhamento para redução da ativação do SRAA.⁽⁷²⁾

A ação da ang (1-7) atenua o efeito deletério em podócitos expostos a altas concentrações de glicose.⁽⁷³⁾ Portanto, terapias que elevem a ativação do eixo ECA2/Ang (1-7)/Mas são potenciais abordagens para retardar a progressão da DRD. Sendo assim, a associação com as CTMs-MO, se mostrou mais efetiva para a expressão de ECA2, uma vez que apresentou aumento do marcador em comparação ao Grupo BTBR^{ob/ob} e também à monoterapia com a medicação. De fato, a abordagem da RC está associado à maior expressão de ECA2 e seus níveis séricos,⁽⁷⁴⁾ e a adição dos efeitos imunomodulatórios da terapia celular mostra sinergismo para potencializar a ativação do eixo ECA2/Ang (1-7)/Mas.⁽⁷⁵⁾

O reestabelecimento do *feedback* túbulo-glomerular mediado pela medicação promove o equilíbrio da ativação do SRAA no glomérulo e a redução de efeitos deletérios, como o acúmulo de EROs que levam ao estresse oxidativo.^(21,24,26) Nesse sentido, através da análise de marcação de peroxidação lipídica, identificamos a redução do estresse oxidativo tanto cortical quanto medular em comparação ao Grupo BTBR^{ob/ob} sem intervenção.

O mecanismo principal pelo qual a inibição do SGLT2 exerce tal efeito não foi totalmente elucidado, porém há estudos que sustentam a atuação do fármaco de diferentes maneiras. Uma delas se dá pela modulação da produção de radicais livres através da redução da expressão de Nox4,⁽⁷⁶⁾ apesar de não termos obtido dado semelhante de expressão gênica cortical. No entanto, a literatura também sugere sua ação na diminuição da expressão e atividade de outras enzimas associadas à geração

de EROs, como óxido nítrico sintase endotelial e xantina oxidase, e promoção de mecanismos antioxidantes.^(76,77)

Além disso, evidências também indicam o efeito dos iSGLT2 sobre a recuperação da função mitocondrial.⁽²¹⁾ A disfunção desta organela está fortemente relacionada à patogênese da DRD devido à hiperglicemia gerar um estado de alteração e acúmulo de substratos do ciclo de Krebs e desacoplamento da cadeia de fosforilação oxidativa com geração de EROs, causando a depleção de ATP, estresse oxidativo e mudanças bioenergéticas mitocondriais.⁽⁷⁷⁾ Ainda, outro provável mecanismo ocorre através da supressão das respostas inflamatórias em diversas vias.⁽⁷⁶⁾

Quando em associação à terapia com CTMs-MO, no entanto, observamos um efeito semelhante ao da monoterapia. Esse achado pode ser explicado pelos possíveis mecanismos antioxidantes mediados pelos iSGLT2 citados anteriormente. As CTMs-MO adquirem o fenótipo imunossupressor quando expostas a um microambiente pró-inflamatório,⁽⁸⁾ uma condição potencialmente atenuada devido à ação do fármaco. Além disso, um estudo prévio do nosso grupo demonstrou que a administração apenas de CTMs-MO não foi eficaz na diminuição do processo de peroxidação lipídica nos animais BTBR^{ob/ob}, apesar de possuir o potencial para a restauração da função mitocondrial.⁽³⁹⁾

Inesperadamente, o Grupo Tx apresentou níveis de peroxidação lipídica medular semelhante ao BTBR^{ob/ob}. Na análise cortical, é possível associar a redução do estresse oxidativo à menor expressão de Nox4 em comparação ao animal sem intervenção. Na porção medular, no entanto, não realizamos essa mensuração. Todavia, isso pode ser explicado pela fisiologia tubular e pela manutenção do fenótipo obeso nesses animais. Os túbulos, principais estruturas encontradas na medula, possuem alta demanda energética e, por essa razão, apresentam grande quantidade de mitocôndrias.⁽⁷⁸⁾ Além disso, o rim apresenta uma disparidade compartimental no aporte de oxigênio, uma vez que o córtex possui maior perfusão que a medula, a qual recebe apenas cerca de 10% do fluxo sanguíneo renal e sendo, portanto, uma região suscetível a condições de hipóxia.^(79,80) Nesse sentido, a obesidade impõe uma demanda metabólica ainda maior e, portanto, está associada à disfunção mitocondrial e maior inclinação ao acúmulo de EROs.⁽⁸¹⁾

Assim como a obesidade, a DRD é uma condição em que ocorre a redução da perfusão sanguínea oxigenação renal.⁽⁸²⁾ O dano aos capilares glomerulares e constrição da arteríola aferente estão relacionados à restrição do fluxo sanguíneo

glomerular e dos seguimentos renais posteriores.⁽⁸³⁾ Nesse sentido, o tratamento com iSGLT2 e o consequente restabelecimento do *feedback* túbulo-glomerular estão relacionados à melhora na oxigenação renal e função mitocondrial.⁽⁸⁴⁾ Assim, em nossos resultados, observou-se que os grupos expostos à medicação demonstram redução do estresse oxidativo tecidual em contraposição aos animais não tratados, tal qual o Grupo Tx.

O estresse oxidativo cortical, por sua vez, é danoso ao podócito. Sendo assim, terapias com potencial antioxidante apresentam efeito benéfico para a preservação da arquitetura e função dessas células.⁽²⁶⁾ Desse modo, averiguamos a expressão de marcadores podocitários. Observamos em nossos resultados que o Grupo Tx apresenta preservação no número de podócitos e de sua função, porém identificamos maior expressão gênica dos marcadores nos animais BTBR^{ob/ob}. Essa elevação, no entanto, pode estar associada à hipertrofia glomerular e tubular, características da DRD.⁽²¹⁾

Com relação à expressão gênica de nefrina e α -actinina-4, proteínas responsáveis pela manutenção da fenda diafragmática e da arquitetura do citoesqueleto podocitário, respectivamente, está reduzida em ambos os *time-points* nos grupos tratamento em relação aos animais BTBR^{ob/ob}. Todavia, a elevação dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) já foi reportada na DRD, portanto, requer investigação também dos níveis proteicos e constatação da localização correta nas diversas células.⁽⁸⁵⁾

Ademais, a dinâmica do citoesqueleto do podócito e, como consequência, da manutenção dos pedicelos é dependente de Rho GTPases, em particular as RhoA e Rac1/Cdc42. As Rac1/Cdc42 estão associadas à motilidade, enquanto a RhoA é responsável pela formação das fibras de actina contráteis. No entanto, a quantidade de RhoA e, portanto, a sinalização mediada por essa proteína são controladas pela degradação protossomal por ubiquitinação de RhoA promovida pela proteína Smurf-1.⁽⁸⁶⁾

A sinaptopodina é amplamente expressa nos pedicelos e atua como reguladora positiva de Rho GTPase. Essa proteína compete com Smurf-1 pelo sítio de ligação de RhoA e, dessa maneira, impede a degradação de RhoA. Sendo assim, a sinaptopodina está associada à preservação da quantidade total de RhoA, cuja predominância está associada à estabilidade e manutenção dos pedicelos, e à menor atividade de Rac/Cdc42, cuja ação promove instabilidade e a retração dos prolongamentos podocitários.⁽⁸⁶⁾ Portanto, a ação da sinaptopodina é essencial para

manutenção da função do podócito e sua expressão está inversamente correlacionada à proteinúria.⁽⁸⁷⁾

Nesse sentido, com 14 a 15 semanas de idade, observamos que animais tratados com iSGLT2 apresentam maior expressão de sinaptopodina em relação ao grupo sem intervenção, resultado consistente com a literatura,⁽³¹⁾ porém apenas o grupo que recebeu a associação com a terapia celular permaneceu com expressão elevada até 18 a 20 semanas. A manutenção da arquitetura podocitária com o uso de iSGLT2 em combinação às CTMs-MO é condizente com estudos que mostram que o aumento da expressão de SGLT2 está associado à transição epitélio-mesenquimal nessa células e, portanto, relacionado à desorganização do citoesqueleto.⁽⁸⁸⁾ Além disso, nota-se a redução dos níveis de expressão de TRPC6 nos grupos tratados com CTM-MO em comparação com o Grupo BTBR^{ob/ob} em 14 a 15 semanas de idade. Tal observação pode ser explicada pelo fato da expressão de sinaptopodina limitar a expressão do TRPC6 na membrana do podócito, isto é, o aumento de sinaptopodina está associado à menor presença do canal de Ca²⁺.⁽⁸⁹⁾ Sendo assim, é possível que a redução da quantidade de TRPC6 mediada pela sinaptopodina limite também o influxo de Ca²⁺ intracelular, reduzindo a translocação de NFAT e, como consequência, a diminuição do *feedback* positivo da expressão gênica de TRPC6. Portanto, o aumento de sinaptopodina indica maior preservação dos pedicelos e função podocitária.

A expressão de Nox4, contudo, apresentou-se aumentada na abordagem com a terapia medicamentosa em relação ao Grupo BTBR^{ob/ob}. Essa é a principal isoforma da Nox expressa no tecido renal e sua atividade está relacionada aos processos de sobrevivência celular, porém sua expressão está aumentada em resposta à hiperglicemia e essa elevação está associada aos efeitos deletérios no podócito.⁽⁹⁰⁾ No entanto, era esperada a diminuição da sua expressão no tratamento com iSGLT2 em combinação a outras estratégias, como já descrito na literatura, uma vez que constatamos melhora nos níveis glicêmicos com essa abordagem.

Por fim, a análise da expressão do marcador nuclear podócitos WT-1 nos relevou a menor expressão gênica nos grupos tratamento em comparação ao Grupo BTBR^{ob/ob} com 14 a 15 semanas, enquanto sua expressão se mostrou aumentada apenas na associação da medicação com a RC e terapia celular. Todavia, a nível proteico por meio de imuno-histoquímica, identificamos a maior quantidade de podócitos nos grupos tratamento em relação ao grupo sem intervenção, sendo mais acentuada na combinação de estratégias.

De fato, estudos anteriores mostraram que tanto iSGLT2 quanto a restrição em monoterapia promovem adaptações celulares que permitem a manutenção de podócitos no modelo de DRD.^(24,26) Porém, nosso estudo identificou que o sinergismo da combinação dos tratamentos potencializou a preservação do número de podócitos, visto que a adição da terapia celular apresentou um efeito protetor superior à monoterapia com iSGLT2.

Sendo assim, com base em nossos resultados, pudemos evidenciar o potencial efeito renoprotetor superior da associação da terapia com CTMs-MO em relação à abordagem convencional utilizado no manejo da DRD. Demonstramos em um modelo robusto da doença que o uso de CTMs-MO apresenta maior controle glicêmico, menor progressão de alterações histológicas e da albuminúria, e preservação de podócitos, assemelhando-se a um estado de estabilização da doença; e, portanto, a abordagem da combinação de estratégias terapêuticas possui grande potencial para a diminuição da progressão da DRD.

5 CONCLUSÕES

1. Identificamos uma nova metodologia para a reversão da hiperglicemia crônica e doença renal diabética no modelo *black and tan brachyury obese*;
2. Constatamos que a administração de célula-tronco mesenquimal da medula óssea em associação a outras abordagens utilizadas na clínica, como inibidor do cotransportador de sódio e glicose 2 e restrição calórica, apresenta maior potencial para o controle glicêmico, porém evidenciamos também a necessidade da aplicação de mais doses das células-tronco mesenquimais da medula óssea para a manutenção desse efeito;
3. Evidenciamos o potencial da combinação à terapia celular para a preservação da função das ilhotas pancreáticas;
4. Verificamos o maior potencial da terapia celular como forma de atenuar as alterações estruturais da doença renal diabética, com redução da progressão da expansão mesangial e preservação de podócitos;
5. Demonstramos também o potencial da associação às células-tronco mesenquimais da medula óssea para a melhora funcional, com redução da progressão da albuminúria;
6. Por fim, identificamos o potencial mecanismo do seu efeito benéfico por meio da modulação da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e redução do estresse oxidativo.

6 ANEXOS

Anexo 1. Checklist diário do animal em experimentação



Checklist de Cuidados Gerais com os Animais em Experimentação

CEUA: 4845-21 / 4450-20

Pesquisadora: Érika B. Rangel

Animal:

Atenção: Não manusear os animais fora do fluxo; garantir a limpeza do fluxo antes do manuseio (limpar o fluxo, bquer e balança com desinfetante e álcool, e irradiar por 20 minutos no mínimo; limpar bquer e balança com álcool entre os animais; e trocar a luva entre os animais).

	Segunda-feira	Terça-feira	Quarta-feira	Quinta-feira	Sexta-feira	Sábado	Domingo
Responsável							
Data							
Hora							
Peso do animal (g)							
Obstrução urinária (S/N)							
Desobstrução realizada (S/N)							
Hidratação Animal:							
A) Pele colabada (teste do dorso) (S/N)							
B) Temperatura corporal habitual ao manusear o animal (S/N)							
C) Observação sobre o consumo de ração							
Caixa suja com urina e fezes (S/N)							
Reidratação com Ringer (S/N; mL)							
Umidade da caixa (%)							
Troca da caixa (S/N)							
Bebedouro (mL)							
Apatia/sinais de dor (S/N)							
Presença de feridas (S/N; local)							

(S=sim; N=não)

Anexo 2. Ficha de acompanhamento do animal em experimentação

**Ficha de controle do animal**

SGPP: 4450-20 **Título: Tratamento de animais B TBR obob com empagliflozina e células-tronco mesenquimais geneticamente modificadas**

Pesquisador principal: Érika Bevilacqua Rangel

Pesquisador associado: Stephany Beyerstedt

Identificação: _____ Origem: _____ Data de nascimento: _____ Posição da gaiola na rack: _____ Início da ração EMPA (data): _____

Grupo: Controle () Tx () Empagliflozina 25mg ()... + restrição e células com Klotho () + restrição e células () + restrição e células com Klotho ()

Dose	Data	Nº de células	VOLUME (Veículo e µL)	Via (P/I/V)	Linagem celular	Observações
1ª						
2ª						

$U^P = \text{interpolant of } U \text{ at } V = \text{intravascular}$

Planilha de intervenções

[illegible]

S = sim; N = não; SF = soro fisiológico 0,9%)

Eutanásia

Data: _____ Horário: _____ Peso (g): _____ Órgãos coletados: _____ N° do laço: _____

Versão 6 – 20/11/2021

Assinaturas

Anexo 3. Ficha do procedimento do transplante de gordura



ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

PI: Erika B Rangel Protocolo: _____ Espécie: camundongos BTBR
Cirurgião: _____ Anestesiista: _____
ID do animal: _____ Peso (g) pré-cirúrgico: _____
Data da cirurgia: _____

Procedimento: Transplante de gordura

Os doadores serão eutanasiados por overdose anestésica. Serão retiradas as gorduras inguinal e interescapular e colocadas em uma placa de Petri com PBS estéril. Esse tecido não poderá ser armazenado por mais de 10 minutos. Será feito um pool de 12-15 doadores para cada receptor. O peso final da gordura a ser transplantada será estabelecido com o uso de balança analítica.

O animal que irá receber o transplante será anestesiado com isofluorano, colocado em decúbito dorsal. Serão injetadas 0,5-3,5g de gordura via subcutânea com uma seringa de 18-gauge, utilizando-se um volume de 100-200µL por infusão, com um total de 5-50 injeções distribuídas no dorso. O animal retornará posteriormente para a gaiola.

Número de doadores: _____

Peso da gordura transplantada: _____

Agente de indução: Isofluorano Concentração: _____

Agente de anestesia: Isofluorano Concentração: _____

Horário de início da anestesia: _____ Horário de início da cirurgia: _____

Horário de término da cirurgia: _____ Início da coleta: _____

Heparina (20-50 U/kg) _____ (µL), SC. Fluidos administrados: NaCl 0,9% _____ (mL) IP

Planilha de Monitoração da Anestesia (anotar, pelo menos, a cada 15 minutos)

Nível de Anestesia	Início	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	120 min
Profundidade da Anestesia Boa/Muito leve/Muito profunda								
Respiração Boa/Muito rápida/Muito lenta								
Membranas mucosas/orelhas Rosa/Avermelhada/Azulada								

Hidratação (solução) : _____ Dose: _____ (mg/mL) Vol: _____ (µL) Via: _____

Analgesia : _____ Dose: _____ (mg/mL) Vol: _____ (µL) Via: _____

Descrição da cirurgia (Procedimento e Complicações):

Monitoramento Pós-operatório imediato (até o retorno à gaiola): (iniciais/Horário)

Versão 02.05.2022

7 REFERÊNCIAS

1. Magliano DJ, Boyko EJ. Committee IDFData. IDF Diabetes Atlas. IDF diabetes atlas. Brussels: International Diabetes Federation© International Diabetes Federation; 2021.
2. Tomic D, Shaw JE, Magliano DJ. The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2022;18(9):525–39.
3. Sá JC, Rangel E, Bauer A. Marcio Lauria, Escott G, Zelmanovitz T, Silveiro S, Bertoluci M. Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. 2022.
4. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(7):363–83.
5. Sies H, Belousov VV, Chandel NS, Davies MJ, Jones DP, Mann GE, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(7):499–515.
6. Stavely R, Nurgali K. The emerging antioxidant paradigm of mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells Transl Med*. 2020;9(9):985–1006.
7. Gao L, Zhong X, Jin J, Li J, Meng XM. Potential targeted therapy and diagnosis based on novel insight into growth factors, receptors, and downstream effectors in acute kidney injury and acute kidney injury-chronic kidney disease progression. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):9.
8. Franco ML, Beyerstedt S, Rangel ÉB. Klotho and mesenchymal stem cells: a review on cell and gene therapy for chronic kidney disease and acute kidney disease. *Pharmaceutics*. 2021;14(1):11.
9. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Renal and extrarenal actions of Klotho. *Semin Nephrol*. 2013;33(2):118–29.
10. Yao X, Guo H, Sun M, Meng S, Zhu B, Fang J, et al. Klotho ameliorates podocyte injury through targeting TRPC6 channel in diabetic nephropathy. *J Diabetes Res*. 2022;2022:1329380.
11. Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. HGF as a renotrophic and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. *Front Biosci*. 2008;13:7072-86.
12. Grahammer F, Schell C, Huber TB. The podocyte slit diaphragm—from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(10):587–98.
13. Dandapani SV, Sugimoto H, Matthews BD, Kolb RJ, Sinha S, Gerszten RE, et al. Alpha-actinin-4 is required for normal podocyte adhesion. *J Biol Chem*. 2007;282(1):467–77.
14. Ilatovskaya DV, Blass G, Palygin O, Levchenko V, Pavlov TS, Grzybowski MN, et al. A NOX4/TRPC6 pathway in podocyte calcium regulation and renal damage in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(7):1917-27
15. Beyerstedt S, Casaro EB, Rangel ÉB. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(5):905-19.
16. Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2013;169(3):477–92.
17. Mizuiri S, Ohashi Y. ACE and ACE2 in kidney disease. *World J Nephrol*. 2015;4(1):74–82.

18. Schenk LK, Möller-Kerutt A, Klosowski R, Wolters D, Schaffner-Reckinger E, Weide T, et al. Angiotensin II regulates phosphorylation of actin-associated proteins in human podocytes. *FASEB J.* 2017;31(11):5019-35.
19. Yang Y, Yang Q, Yang J, Ma Y, Ding G. Angiotensin II induces cholesterol accumulation and injury in podocytes. *Sci Rep.* 2017;7(1):10672.
20. Rossing P, Caramori ML, Chan JC, Heerspink HJ, Hurst C, Khunti K, et al. Executive summary of the KDIGO 2022 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease: an update based on rapidly emerging new evidence. *Kidney Int.* 2022;102(5):990–9.
21. DeFronzo RA, Reeves WB, Awad AS. Pathophysiology of diabetic kidney disease: impact of SGLT2 inhibitors. *Nat Rev Nephrol.* 2021;17(5):319–34.
22. DeFronzo RA, Norton L, Abdul-Ghani M. Renal, metabolic and cardiovascular considerations of SGLT2 inhibition. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(1):11–26.
23. Gembardt F, Bartaun C, Jarzebska N, Mayoux E, Todorov VT, Hohenstein B, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates early features of diabetic nephropathy in BTBR ob/ob type 2 diabetic mice with and without hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;307(3):F317–25.
24. Tanaka S, Sugiura Y, Saito H, Sugahara M, Higashijima Y, Yamaguchi J, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition normalizes glucose metabolism and suppresses oxidative stress in the kidneys of diabetic mice. *Kidney Int.* 2018;94(5):912–25.
25. The EMPA-KIDNEY Collaborative Group; Herrington WG, Staplin N, Wanner C, Green JB, Hauske SJ, Emberson JR, Preiss D, Judge P, Mayne KJ, Ng SYA, Sammons E, Zhu D, Hill M, Stevens W, Wallendszus K, Brenner S, Cheung AK, Liu ZH, Li J, Hooi LS, Liu W, Kadowaki T, Nangaku M, Levin A, Cherney D, Maggioni AP, Pontremoli R, Deo R, Goto S, Rossello X, Tuttle KR, Steubl D, Petrini M, Massey D, Eilbracht J, Brueckmann M, Landray MJ, Baigent C, Haynes R. Empagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med.* 2023;388(2):117-27.
26. Hudkins KL, Li X, Holland AL, Swaminathan S, Alpers CE. Regression of diabetic nephropathy by treatment with empagliflozin in BTBR ob/ob mice. *Nephrol Dial Transplant.* 2022;37(5):847–59.
27. Karalliedde J, Maltese G, Hill B, Viberti G, Gnudi L. Effect of renin-angiotensin system blockade on soluble Klotho in patients with type 2 diabetes, systolic hypertension, and albuminuria. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(11):1899–905.
28. Mora-Fernández C, Sánchez-Niño MD, Donate-Correa J, Martín-Núñez E, Pérez-Delgado N, Valiño-Rivas L, et al. Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors increase Klotho in patients with diabetic kidney disease: A clinical and experimental study. *Biomed Pharmacother.* 2022;154:113677.
29. Sano M. Hemodynamic effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors. *J Clin Med Res.* 2017;9(6):457–60.
30. Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, Nakatsuka A, et al. Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PLoS One.* 2014;9(6):e100777.
31. Yang L, Liang B, Li J, Zhang X, Chen H, Sun J, et al. Dapagliflozin alleviates advanced glycation end product induced podocyte injury through AMPK/mTOR mediated autophagy pathway. *Cell Signal.* 2022;90:110206.

32. Cassis P, Locatelli M, Cerullo D, Corna D, Buelli S, Zanchi C, et al. SGLT2 inhibitor dapagliflozin limits podocyte damage in proteinuric nondiabetic nephropathy. *JCI Insight*. 2018;3(15):e98720.
33. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
34. Sávio-Silva C, Beyerstedt S, Soinski-Sousa PE, Casaro EB, Balby-Rocha MT, Simplício-Filho A, et al. Mesenchymal stem cell therapy for diabetic kidney disease: a review of the studies using syngeneic, autologous, allogeneic, and xenogeneic cells. *Stem Cells Int*. 2020;2020:8833725.
35. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 2003;9(6):677–84.
36. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31(10):890–6.
37. Davies LC, Heldring N, Kadri N, Le Blanc K. Mesenchymal stromal cell secretion of programmed death-1 ligands regulates T Cell mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 2017;35(3):766–76.
38. Sanchez-Diaz M, Quiñones-Vico MI, Sanabria de la Torre R, Montero-Vílchez T, Sierra-Sánchez A, Molina-Leyva A, et al. biodistribution of mesenchymal stromal cells after administration in animal models and humans: a systematic review. *J Clin Med*. 2021;10(13):2925.
39. Sávio-Silva C, Soinski-Sousa PE, Simplício-Filho A, Bastos RM, Beyerstedt S, Rangel ÉB. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in a pre-clinical model of diabetic kidney disease and obesity. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1546.
40. Mahmoud M, Abu-Shahba N, Azmy O, El-Badri N. Impact of diabetes mellitus on human mesenchymal stromal cell biology and functionality: implications for autologous transplantation. *Stem Cell Rev Rep*. 2019;15(2):194–217.
41. Paulini J, Higuti E, Bastos RM, Gomes SA, Rangel ÉB. mesenchymal stem cells as therapeutic candidates for halting the progression of diabetic nephropathy. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9521629.
42. Caplan H, Olson SD, Kumar A, George M, Prabhakara KS, Wenzel P, et al. Mesenchymal stromal cell therapeutic delivery: translational challenges to clinical application. *Front Immunol*. 2019;10:1645.
43. Rudnick MR, Leonberg-Yoo AK, Litt HI, Cohen RM, Hilton S, Reese PP. The controversy of contrast-induced nephropathy with intravenous contrast: what is the risk? *Am J Kidney Dis*. 2020;75(1):105–13.
44. Hudkins KL, Pichaiwong W, Wietecha T, Kowalewska J, Banas MC, Spencer MW, et al. BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(9):1533–42.
45. Pichaiwong W, Hudkins KL, Wietecha T, Nguyen TQ, Tachaudomdach C, Li W, et al. Reversibility of structural and functional damage in a model of advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(7):1088–102.
46. Mendoza-Herrera K, Florio AA, Moore M, Marrero A, Tamez M, Bhupathiraju SN, et al. The leptin system and diet: a mini review of the current evidence. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:749050.

47. Hayden MR, Banks WA. Deficient leptin cellular signaling plays a key role in brain ultrastructural remodeling in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5427.
48. Bastos RM, Simplício-Filho A, Sávio-Silva C, Oliveira LF, Cruz GN, Sousa EH, et al. Fecal microbiota transplant in a pre-clinical model of type 2 diabetes mellitus, obesity and diabetic kidney disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3842.
49. Herold J, Kalucka J. Angiogenesis in adipose tissue: the interplay between adipose and endothelial cells. *Front Physiol.* 2021;11:624903.
50. Robertson SA, Leininger GM, Myers MG Jr. Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiol Behav.* 2008;94(5):637–42.
51. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med.* 2010;152(2):93–100.
52. Dhillon H, Kalra SP, Kalra PS. Dose-dependent effects of central leptin gene therapy on genes that regulate body weight and appetite in the hypothalamus. *Mol Ther.* 2001;4(2):139–45.
53. Miller DW, Findlay PA, Morrison MA, Raver N, Adam CL. Seasonal and dose-dependent effects of intracerebroventricular leptin on lh secretion and appetite in sheep. *J Endocrinol.* 2002;175(2):395–404.
54. Denroche HC, Huynh FK, Kieffer TJ. The role of leptin in glucose homeostasis. *J Diabetes Investig.* 2012;3(2):115–29.
55. D'souza AM, Neumann UH, Glavas MM, Kieffer TJ. The glucoregulatory actions of leptin. *Mol Metab.* 2017;6(9):1052–65.
56. Lim S, Kim KM, Nauck MA. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and cardiovascular events: class effects versus individual patterns. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(4):238–48.
57. Bosch C, Carriazo S, Soler MJ, Ortiz A, Fernandez-Fernandez B. Tirzepatide and prevention of chronic kidney disease. *Clin Kidney J.* 2022;16(5):797–808.
58. Foretz M, Guigas B, Viollet B. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential. *Nat Rev Endocrinol.* 2023;19(8):460–76.
59. Si Y, Zhao Y, Hao H, Liu J, Guo Y, Mu Y, et al. Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: identification of a novel role in improving insulin sensitivity. *Diabetes.* 2012;61(6):1616–25.
60. Bazhanov N, Ylostalo JH, Bartosh TJ, Tiblow A, Mohammadipoor A, Foscett A, et al. Intraperitoneally infused human mesenchymal stem cells form aggregates with mouse immune cells and attach to peritoneal organs. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):27.
61. Freitas GP, Lopes HB, Souza AT, Oliveira PG, Almeida AL, Souza LE, et al. Cell therapy: effect of locally injected mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or adipose tissue on bone regeneration of rat calvarial defects. *Sci Rep.* 2019;9(1):13476.
62. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol.* 2012;3:297.
63. Lin W, Li HY, Yang Q, Chen G, Lin S, Liao C, et al. Administration of mesenchymal stem cells in diabetic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):43.

64. Zhang Y, Ye C, Wang G, Gao Y, Tan K, Zhuo Z, et al. Kidney-targeted transplantation of mesenchymal stem cells by ultrasound-targeted microbubble destruction promotes kidney repair in diabetic nephropathy rats. *BioMed Res Int.* 2013;2013:526367.
65. Rothberg AE, McEwen LN, Herman WH. Severe obesity and the impact of medical weight loss on estimated glomerular filtration rate. *PLoS One.* 2020;15(2):e0228984.
66. Boorsma EM, Beusekamp JC, Ter Maaten JM, Figarska SM, Danser AH, van Veldhuisen DJ, et al. Effects of empagliflozin on renal sodium and glucose handling in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2021;23(1):68–78.
67. Grempler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp DE, et al. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14(1):83–90.
68. Nishikoba N, Kumagai K, Kanmura S, Nakamura Y, Ono M, Eguchi H, et al. HGF-MET signaling shifts m1 macrophages toward an M2-like phenotype through PI3K-mediated induction of arginase-1 expression. *Front Immunol.* 2020;11:2135.
69. Vulugundam SC, Kiranmayi VS, Rao PV, Vishnubhotla SK. Hepatocyte growth factor in predialysis and hemodialysis chronic kidney disease patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2022;33(1):58-65.
70. Chen Y, Qian H, Zhu W, Zhang X, Yan Y, Ye S, et al. Hepatocyte growth factor modification promotes the amelioration effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on rat acute kidney injury. *Stem Cells Dev.* 2011;20(1):103–13.
71. Hilzendeger AM, Morgan DA, Brooks L, Dellsperger D, Liu X, Grobe JL, et al. A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303(2):H197-206
72. Bhandari S, Mehta S, Khwaja A, Cleland JGF, Ives N, Brettell E, Chadburn M, Cockwell P; STOP ACEi Trial Investigators. Renin-Angiotensin System Inhibition in Advanced Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med.* 2022;387(22):2021-32.
73. Lu J, Chen G, Shen G, Ouyang W. Ang-(1-7) attenuates podocyte injury induced by high glucose in vitro. *Arch Endocrinol Metab.* 2023;67(6):e000643.
74. Souza AM, Ecelbarger CM, Sandberg K. Caloric restriction and cardiovascular health: the good, the bad, and the renin-angiotensin system. *Physiology (Bethesda).* 2021;36(4):220-234.
75. Liu Q, Lv S, Liu J, Liu S, Wang Y, Liu G. Mesenchymal stem cells modified with angiotensin-converting enzyme 2 are superior for amelioration of glomerular fibrosis in diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;162:108093.
76. Yaribeygi H, Atkin SL, Butler AE, Sahebkar A. Sodium-glucose cotransporter inhibitors and oxidative stress: an update. *J Cell Physiol.* 2019;234(4):3231–7.
77. Llorens-Cebrià C, Molina-Van den Bosch M, Vergara A, Jacobs-Cachá C, Soler MJ. Antioxidant Roles of SGLT2 inhibitors in the kidney. *Biomolecules.* 2022;12(1):143.
78. Zeni L, Norden AG, Cancarini G, Unwin RJ. A more tubulocentric view of diabetic kidney disease. *J Nephrol.* 2017;30(6):701–17.
79. Edwards A, Kurtcuoglu V. Renal blood flow and oxygenation. *Pflugers Arch.* 2022;474(8):759–70.
80. Leong CL, Anderson WP, O'Connor PM, Evans RG. Evidence that renal arterial-venous oxygen shunting contributes to dynamic regulation of renal oxygenation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(6):F1726–33.

81. Andres-Hernando A, Lanaspa MA, Kuwabara M, Orlicky DJ, Cicerchi C, Bales E, et al. Obesity causes renal mitochondrial dysfunction and energy imbalance and accelerates chronic kidney disease in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019;317(4):F941-F948.
82. Palm F, Friederich M, Carlsson PO, Hansell P, Teerlink T, Liss P. Reduced nitric oxide in diabetic kidneys due to increased hepatic arginine metabolism: implications for renomedullary oxygen availability. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(1):F30-7.
83. Hesp AC, Schaub JA, Prasad PV, Vallon V, Laverman GD, Bjornstad P, et al. The role of renal hypoxia in the pathogenesis of diabetic kidney disease: a promising target for newer renoprotective agents including SGLT2 inhibitors? *Kidney Int*. 2020;98(3):579–89.
84. Gronda E, Palazzuoli A, Iacoviello M, Benevenuto M, Gabrielli D, Arduini A. Renal Oxygen Demand and Nephron Function: Is Glucose a Friend or Foe? *Int J Mol Sci*. 2023;24(12):9957.
85. Weins A, Pollak MR. Inherited nephroses. In: Mount DB, Pollak MR, editors. *Molecular and genetic basis of renal disease*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2008. Chapter 9: p. 141–50.
86. Greka A, Mundel P. Calcium regulates podocyte actin dynamics. *Semin Nephrol*. 2012;32(4):319–26.
87. Hirakawa M, Tsuruya K, Yotsueda H, Tokumoto M, Ikeda H, Katafuchi R, et al. Expression of synaptopodin and GLEPP1 as markers of steroid responsiveness in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Life Sci*. 2006;79(8):757–63.
88. Guo R, Wang P, Zheng X, Cui W, Shang J, Zhao Z. SGLT2 inhibitors suppress epithelial-mesenchymal transition in podocytes under diabetic conditions via downregulating the IGF1R/PI3K pathway. *Front Pharmacol*. 2022;13:897167. Erratum in: *Front Pharmacol*. 2022;13:1074294
89. Yu H, Kistler A, Faridi MH, Meyer JO, Trynieszewska B, Mehta D, et al. Synaptopodin Limits TRPC6 Podocyte Surface Expression and Attenuates Proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(11):3308–19.
90. Jha JC, Thallas-Bonke V, Banal C, Gray SP, Chow BS, Ramm G, et al. Podocyte-specific Nox4 deletion affords renoprotection in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2016;59(2):379–89.

Abstract

Introduction: Diabetic kidney disease is one of the complications of *diabetes mellitus* and is characterized by loss of renal function and progressive proteinuria. Chronic hyperglycemia and the action of angiotensin II promote oxidative stress in the podocyte, affecting its architecture and function. The diminished activation of the renoprotective angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1-7)/Mas receptor axis and the targeting of the angiotensin-converting enzyme/angiotensin II/ angiotensin II type 1 receptor axis causes an increase in reactive oxygen species through the modulation of NADPH oxidase 4 and, thus, the reorganization of the cytoskeleton of these cells by increasing the influx of intracellular calcium through the transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6. Conventional therapy based on changes in lifestyle habits and medications has the ability to delay and reduce the progression of the disease, but complementary approaches are needed to repair the structures. In this sense, mesenchymal stem cell therapy is a strategy for restoring impaired renal function. **Purpose:** To evaluate the therapeutic potential of conventional therapy in association with mesenchymal stem cells. **Methods:** We used the type 2 diabetes and diabetic kidney disease model BTBR^{ob/ob}, in which we tested the conventional therapy used in the clinic (this approach being both medication, with a sodium and glucose cotransporter 2 inhibitor, and changing in lifestyle habits, represented by caloric restriction) in association or not with the administration of bone marrow mesenchymal stem cells. In this animal, we evaluated weight gain, blood glucose, glycosuria, natriuresis, morphometry of the glomerular area and pancreatic islets, mesangial expansion, proteinuria and glomerular filtration rate, and gene expression of podocyte markers (synaptopodin, α -actinin-4, nephrin and Wilms tumor-1), components of the angiotensin II/NADPH oxidase 4/ transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6 pathway, the renin-angiotensin-aldosterone system (angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme 2), in addition to renoprotective factors (hepatocyte growth factor and Klotho protein). Additionally, we also evaluated the potential reversibility of the disease phenotype in this model through the fat transplantation methodology and, therefore, used this strategy as a comparison to the proposed therapeutic approaches. **Results:** We observed a high potential for blood glucose control with combined therapy compared to medication monotherapy and the BTBR^{ob/ob} group, in addition to a reduction in the progression of mesangial expansion and

albuminuria. Furthermore, we also found that this approach promotes a greater increase in angiotensin-converting enzyme 2, indicating targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1-7)/Mas receptor axis, leading to lower tissue oxidative stress, maintenance of the expression of renoprotective factors and podocyte preservation and the expression of its markers. **Conclusions:** The therapeutic strategy of combining conventional therapy with mesenchymal stem cells has greater renoprotective potential, with preservation of the structure and function of podocytes.

Keywords: Diabetic nephropathies; Mesenchymal stem cells; Klotho proteins; Oxidative stress