Christian Savio Silva

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
NA DOENÇA RENAL DIABÉTICA É MEDIADO PELO EFEITO
ANTIOXIDANTE E MODULADOR NO PROGRAMA DE CONTROLE DE
QUALIDADE MITOCONDRIAL**

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

São Paulo

2020

Christian Savio Silva

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
NA DOENÇA RENAL DIABÉTICA É MEDIADO PELO EFEITO
ANTIOXIDANTE E MODULADOR NO PROGRAMA DE CONTROLE DE
QUALIDADE MITOCONDRIAL**

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
2020

S586a

Silva, Christian Savio

Potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais na doença renal diabética é mediado pelo efeito antioxidante e modulador no programa de controle de qualidade mitocondrial / Christian Savio Silva. -- São Paulo, 2020. xviii, 105 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: *Therapeutic potential of mesenchymal stem-cells for diabetic kidney disease is mediated by antioxidant and modulation of a mitochondrial quality control program.*

1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Nefropatias diabéticas. 3. Mitocôndrias. 4. Células-tronco adultas. 5. Estresse oxidativo.

NLM – WK 810

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Christian Savio Silva

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
NA DOENÇA RENAL DIABÉTICA É MEDIADO PELO EFEITO
ANTIOXIDANTE E MODULADOR NO PROGRAMA DE CONTROLE DE
QUALIDADE MITOCONDRIAL**

Presidente da banca: Profa. Dra. Érika Bevilaqua Rangel

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Patricia Maria de Carvalho Aguiar

Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

Profa. Dra. Patricia Fiorino

Membros suplentes:

Prof. Dr. Lionel Fernel Gamarra Contreras

Profa. Dra. Fernanda Agostini Rocha

Profa. Dra. Rita de Cassia Cavaglieri

Aprovada em: 23/01/2020.

Agradecimentos

Eu me considero abençoado por tantas boas amizades que fiz ao longo do caminho, imprescindíveis para a caminhada. Assim, indico abaixo aqueles e aquelas que colaboraram de forma decisiva para a conclusão dessa etapa na minha história pessoal. Digo para aqueles que não estão mencionados diretamente: não se preocupem! A Justiça é plena e recompensa todos os bons samaritanos. A cada qual é dado segundo suas obras. Eu agradeço aos coordenadores da pesquisa no HIAE e a minha orientadora, por me darem a oportunidade de estar aqui.

Aos meus familiares, por todas as razões e motivos, obviamente. Principalmente aos meus pais e avós que me deram as condições para que eu chegasse vivo e saudável até a idade adulta.

À minha companheira, por toda paciência e cuidado. Por todas as boas conversas e orações.

Aos meus padrinhos e protetores, por todo o cuidado e ensinamentos. Principalmente por terem me trazido até aqui e não me deixado desistir quando as coisas ficavam complicadas.

Aos colegas de trabalho do grupo EBR. Aqui incluo também aqueles que passaram pelo grupo e agora seguem outras trilhas. Foram muitos aprendizados e ajuda fundamental para eu dar conta do recado. Principalmente àqueles que me ajudaram no início, com muita paciência e perseverança.

Aos colaboradores do IIEP, alunos e pesquisadores de outros grupos, além dos colegas de outras instituições, que me ajudaram sem medida e sem restrições, também com muita paciência.

À agência de fomento, com o auxílio material através da bolsa de incentivo: FAPESP; bem como ao Hospital Israelita Albert Einstein.

Aos meus amigos da Agricultura do ICE, incluindo as mestras e o mestre R.S. Esse trabalho ilumina meus dias.

Aos colegas de faculdade e das repúblicas Kanta Galo e Vila Velha. Todos foram muito importantes no meu amadurecimento, participando de escolhas importantes e me aceitando desde o início, mesmo com todas as dificuldades. Muitos me serviram de exemplo. Muitos me ajudaram. Muitos me ensinaram.

Sumário

Agradecimentos.....	v
Lista de figuras	ix
Lista de quadros	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
Resumo	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Diabetes mellitus e a doença renal diabética	1
1.1.1 Fisiologia renal	3
1.2 Fisiopatologia da doença renal diabética.....	10
1.2.1 Estresse oxidativo versus sinalização redox	15
1.3 Mitocôndria e a resposta ao estresse.....	19
1.3.1 Mitofagia	23
1.4 Células-tronco mesenquimais	25
1.4.1 Secretoma: proteínas solúveis e vesículas extracelulares: atuação parácrina e endócrina.....	26
1.4.2 Transferência mitocondrial via contato direto	27
1.5 Objetivos.....	29
2 MÉTODOS	31
2.1 Local do estudo	31
2.2 Aspectos éticos e legais	31
2.3 Células experimentais	31
2.4 Meios de cultura e condicionamento	33
2.5 Grupos e delineamento	34
2.6 Cocultura direta: terapia celular com células-tronco mesenquimais da medula óssea	35
2.6.1 Grupos da terapia celular	36
2.7 Avaliações in vitro.....	37
2.7.1 Metabolismo celular – densidade ótica por MTT	37
2.7.2 Morte celular – Anexina V e Iodeto de Propídeo/DAPI	38
2.7.3 Migração – ensaio da ferida	38
2.8 Avaliações mitocondriais in vitro.....	39
2.8.1 Radical oxidante mitocôndria-específico – MitoPY1	39

2.8.2 Potencial de membrana mitocondrial.....	39
2.8.3 Expressão gênica dos componentes do programa de qualidade mitocondrial	40
2.9 Avaliação <i>in vivo</i> : animais experimentais	41
2.9.1 Aquisição e manutenção dos animais em biotério.....	42
2.10 Administração de células-tronco mesenquimais da medula óssea	44
2.11 Avaliações funcionais: peso e coleta da urina	45
2.12 Avaliação da proteinúria – determinação da perda de função glomerular	45
2.13 Glicemia basal	46
2.14 Avaliações morfológicas: preparo das lâminas.....	46
2.14.1 Hematoxilina e eosina: histologia renal	46
2.14.2 Ácido Periódico de Schiff: expansão mesangial	46
2.14.3 Expressão gênica: componentes do Programa de Qualidade Mitocondrial.....	47
2.14.4 Expressão proteica de via de apoptose: caspase 3	47
2.14.5 Expressão proteica de marcador podocitário: WT-1 nuclear	48
2.15 Rastreamento das células-tronco mesenquimais da medula óssea mTmG: imagens <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	49
2.16 Avaliação dos resultados.....	49
3 RESULTADOS	50
3.1 Caracterização das células-tronco mesenquimais da medula óssea mTmG	50
3.2 Efeitos funcionais da hiperglicose e/ou H ₂ O ₂ nas Células Glomerulares Mesangiais	52
3.3 Acúmulo de H ₂ O ₂ específico na mitocôndria das Células Glomerulares Mesangiais pela hiperglicose e/ou H ₂ O ₂	55
3.4 Aumento da morte celular nas Células Glomerulares Mesangiais pela hiperglicose e/ou H ₂ O ₂	56
3.5 Alteração do potencial de membrana mitocondrial pela hiperglicose e/ou H ₂ O ₂ nas Células Glomerulares Mesangiais	58
3.6 Efeitos da hiperglicose e/ou H ₂ O ₂ na expressão gênica de marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial nas Células Glomerulares Mesangiais	59
3.7 Efeito protetor das células-tronco mesenquimais da medula óssea: menos H ₂ O ₂ mitocondrial e morte celular nas Células Glomerulares Mesangiais	62
3.8 Efeito das células-tronco mesenquimais da medula óssea na expressão gênica dos marcadores de mitofagia e biogênese das Células Glomerulares Mesangiais.....	64

3.9 Efeito deletério do microambiente nas células-tronco mesenquimais da medula óssea: aumento da morte celular	65
3.10 Resumo dos resultados <i>in vitro</i> (em relação ao controle normoglicose)	66
3.11 Rastreo das células-tronco mesenquimais da medula óssea após administração intraperitoneal nos camundongos BTBR ^{ob/ob}	67
3.12 Efeitos das Células-Tronco Mesenquimais da Medula Óssea no ganho de peso, glicemia e proteinúria dos camundongos BTBR ^{ob/ob}	68
3.13 Efeito das células-tronco mesenquimais na expansão mesangial dos animais BTBR ^{ob/ob}	70
3.14 Modulação da expressão gênica dos marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial pelas células-tronco mesenquimais da medula óssea no córtex renal dos animais BTBR ^{ob/ob}	72
3.15 Efeito das célulastronco mesenquimais da medula óssea na ativação da caspase 3 total e na taxa de podócitos/glomérulo nos rins dos animais BTBR ^{ob/ob}	74
3.16 Resumo dos resultados <i>in vivo</i>	76
4 DISCUSSÃO	78
5 CONCLUSÕES	91
6 REFERÊNCIAS	92
Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição mundial da prevalência do diabetes <i>mellitus</i> em 2019 e da projeção de incidência até 2045 (20-79 anos).....	1
Figura 2. Glomérulo e alguns de seus componentes (podócitos, tufo de capilares, membrana basal glomerular [MBG]).....	4
Figura 3. Túbulo proximal e a reabsorção da glicose pelos cotransportadores <i>sodium-glucose co-transporters</i> 1 e 2 e o transporte da glicose, rumo à circulação, via <i>glucose transportes</i>	6
Figura 4. Esquema simplificado da interação de glicólise, ciclo de Krebs e oxidação fosforilativa, formando a principal via de produção de trifosfato de adenosina nos rins. .	8
Figura 5. Esquema simplificado da oxidação de ácidos graxos por células do túbulo proximal, uma das principais fontes de energia dessas células	10
Figura 6. Aparecimento das diferentes alterações da doença renal diabética ao longo do tempo, de forma cumulativa e progressiva	12
Figura 7. Morfologia normal (A) e alterada pelo diabetes <i>mellitus</i> (B) de glomérulos seccionados. Principais estruturas alteradas: células mesangiais, membrana basal, podócitos, endotélio.....	14
Figura 8. Sinalização redox e o estresse oxidativo	16
Figura 9. Níveis de espécie reativa de oxigênio e o respectivo efeito tóxico ou fisiológico.....	17
Figura 10. Hiperglicemia e dano mitocondrial no aumento de espécie reativa de oxigênio, com consequente dano no DNA nuclear e bloqueio da via glicolítica. Ativação das vias intermediárias dos substratos da via glicolítica	19
Figura 11. Esquema da adaptação mitocondrial, frente ao estresse, pela mudança morfológica.....	20
Figura 12. Interações no Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial frente à alteração metabólica (obesidade, dieta rica em lipídios), levando a bloqueio da biogênese e fusão e ativação da fissão, além dos danos por espécie reativa de oxigênio	21
Figura 13. Excesso de espécie reativa de oxigênio e dano mitocondrial, criando ciclo vicioso que leva a disfunção mitocondrial.....	22

Figura 14. Transferência mitocondrial entre células-tronco mesenquimais e célula epitelial com disfunção mitocondrial, via contato direto e nanotubos. Ação direta da proteína Miro1 no carreamento da mitocôndria	29
Figura 15. Linhas do tempo das células glomerulares mesangiais condicionadas por 6 horas (A) e 72 horas (B)	35
Figura 16. Linhas do tempo das células glomerulares mesangiais condicionadas por 72 horas (A) e 6 horas (B) em cocultura com células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	36
Figura 17. Esquema demonstrativo da dinâmica de contato entre células glomerulares mesangiais e células-tronco mesenquimais da medula óssea em cocultura direta.....	37
Figura 18. Linha do tempo dos 4 grupos de animais BTBR ^{ob/ob} e as respectivas coletas de amostras e medidas. De cada grupo, foram eutanasiados 6 animais para coleta dos rins.....	43
Figura 19. Identificação dos animais mutantes (m) BTBR ^{ob/ob} por genotipagem e presença da banda de 100pb & 55pb (seta vermelha).....	44
Figura 20. Linha do tempo do grupo de animais BTBR ^{ob/ob} que recebeu terapia com células-tronco mesenquimais da medula óssea mTmG e as respectivas coletas de amostras e medidas ao longo do tempo. Foram eutanasiados 6 animais para coleta dos rins.....	45
Figura 21. Fotomicroscopia de luz (A) e de fluorescência RFP+ (B) de células-tronco mesenquimais da medula óssea mTmG, passagem 8-9, em cultura	50
Figura 22. Imunofenotipagem, por citometria de fluxo, das células-tronco mesenquimais da medula óssea em passagem 7-8.....	51
Figura 23. Diferenciação das células-tronco mesenquimais da medula óssea após condicionamento nos meios indutores	52
Figura 24. Célula glomerular mesangial condicionada em normoglicose (a) hiperglicose (b), manitol (c) normoglicose H ₂ O ₂ (d) & hiperglicose H ₂ O ₂ (e), respectivamente.....	53
Figura 25. Proliferação de células glomerulares mesangiais condicionadas em normoglicose, hiperglicose e manitol.....	54
Figura 26. Capacidade de metabolização de substratos pelas células glomerulares mesangiais	54
Figura 27. Área migrada, em um ² , pelas células glomerulares mesangiais condicionadas por 6 & 72 horas em cada meio experimental (normoglicose (NG), manitol (MN), hiperglicose (HG), normoglicose + H ₂ O ₂ e hiperglicose + H ₂ O ₂).....	55

Figura 28. Avaliação por citometria de fluxo da quantidade (%) de células glomerulares mesangiais, condicionadas por 6 & 72 horas em Normoglicose (NG), Hiperglicose (HG), Manitol (MN), Normoglicose H ₂ O ₂ e Hiperglicose H ₂ O ₂ , com acúmulo de H ₂ O ₂ na mitocôndria (FITC+; n=3; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Tukey).....	56
Figura 29. Avaliação de processo de morte celular indicada por marcação positiva para anexina-V (conjugada a FITC).....	57
Figura 30. Morte celular com permeabilização de membrana, em marcação positiva para anexina-V (conjugada a FITC) e iodeto de propídeo.....	58
Figura 31. Polarização da membrana mitocondrial.....	59
Figura 32. Expressão gênica (fold change) de marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial.....	60
Figura 33. Expressão gênica (fold change) de marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial.....	61
Figura 34. Quantidade (%) de células glomerulares mesangiais, condicionadas por 6 (A) & 72 (B) horas em normoglicose (NG), hiperglicose (HG), manitol (MN), NG H ₂ O ₂ e HG H ₂ O ₂ , com acúmulo de H ₂ O ₂ na mitocôndria (FITC+), após cocultura com células-tronco mesenquimais da medula óssea. (*p<0,05 + desvio padrão)	63
Figura 35. Morte celular com permeabilização de membrana, em marcação para anexina-V (FITC+) e DAPI (violeta+).....	64
Figura 36. Expressão gênica dos marcadores de mitofagia (Parkin, PINK1) e biogênese (TFAM, PGC-1) em células glomerulares mesangiais sem e com tratamento células-tronco mesenquimais da medula óssea (pós cocultura). (B) Expressão gênica de células glomerulares mesangiais do grupo hiperglicose (HG) sem e com tratamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea (respectivamente). Recorte do gráfico geral, mostrando o marcador PINK1, único que apresentou diferença nessa avaliação. Valores de expressão relativos ao grupo controle NG (n=2; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com pós-teste de Fisher LSD)	65
Figura 37. Morte celular com permeabilização de membrana, marcação para anexina-V (FITC+) e DAPI (violeta+)	66
Figura 38. Avaliação <i>ex vivo</i> de fluorescência em rins após a eutanásia do animal.....	67
Figura 39. Medidas do peso (g) dos animais BTBR WT, BTBR ^{ob/ob} e BTBR ^{ob/ob} + CTMs-MO entre 8 e 19 semanas de vida	68

Figura 40. Glicemia capilar basal (mg/dL) dos animais BTBR WT, BTBR ^{ob/ob} e BTBR ^{ob/ob} + CTMs-MO com 10, 14 e 20 semanas de vida.....	69
Figura 41. Albuminúria corrigida por creatinina (ug/mg) dos animais BTBR WT e BTBR ^{ob/ob} de 10, 14 e 20 semanas de idade e dos animais BTBR ^{ob/ob} de 20 semanas de idade que receberam terapia com células-tronco mesenquimais da medula óssea.	70
Figura 42. (A) Deposição de matriz mesangial nos animais BTBR WT e BTBR ^{ob/ob} de idades 10, 14 e 20 semanas e BTBR ^{ob/ob} +CTMs de 20 semanas, corados com PAS. B) Quantificação da deposição de matriz mesangial extracelular em porcentagem (%) de pixels/área da coloração PAS glomerular.....	71
Figura 43. Expressão gênica (<i>fold change</i>) de marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitochondrial no córtex renal dos BTBR ^{ob/ob} controle (8-10, 14-15, 18-20 semanas) e BTBR ^{ob/ob} +CTMs-MO, relativos ao BTBR WT (8-10, 14-15 e 18-20 semanas de idade)	73
Figura 44. Avaliação da expressão renal de caspase-3 por imunohistoquímica nos BTBR ^{ob/ob} de 8-10, 14 e 20 semanas e BTBR ^{ob/ob} +CTMs de 20 semanas	74
Figura 45. Avaliação do número de podócitos/glomérulo nos BTBR WT (10, 14 e 20 semanas), BTBR ^{ob/ob} (8-10, 14 e 20 semanas) & BTBR ^{ob/ob} +CTMs de 20 semanas ...	76

Lista de quadros

Quadro 1. Preferências de substratos metabólicos para cada segmento do néfron.....	9
Quadro 2. Estágios da progressão da doença renal diabética e suas respectivas características de alterações	11
Quadro 3. Processos componentes do Programa de Controle de Qualidade Mitochondrial e os respectivos marcadores usados para avaliação da expressão de RNA via q RT-PCR	40
Quadro 4. Efeito aumentativo (+), e escala de gravidade com repetições do símbolo (+++); efeito depressor (-), considerando a mesma lógica de índice de gravidade e efeito nulo (0). As comparações foram feitas com o controle NG, dentro de cada <i>timepoint</i>	66
Quadro 5. Efeito aumentativo (+), indicando escala de gravidade com as repetições do símbolo; efeito depressor / negativo (-), considerando a mesma lógica de índice de gravidade e efeito nulo (0). “X” para ausência de dado sobre o grupo de animais em questão. @: <i>versus</i> BTBR WT de mesma idade; #: <i>versus</i> BTBR ^{ob/ob} controle (sem CTMs).....	77

Lista de abreviaturas

AAALAC	Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care
AGEs	<i>Advanced Glycation End-product</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT1R	<i>Angiotensin II type 1 receptor</i>
AT2R	<i>Angiotensin II type 2 receptor</i>
ATP	<i>Adenosine Tri-Phosphate</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</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
CGMs	Célula Glomerular Mesangial
CPE-IIIEPAE	Centro de Pesquisa Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
CTM	Célula-Tronco Mesenquimal
DAB	3'-Diaminobenzidine
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNAmt	<i>Deoxyribonucleic Acid, mitochondrial</i>
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide Triphosphate</i>
DO	Densidade Óptica
DRD	Doença Renal Diabética
DRP1	<i>Dynamin-1-like protein</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FADH ₂	Dinucleotídeo Flavina Adenosina

FCCP	<i>Trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazone</i>
FIS	Fission, Mitochondrial 1
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GLUT1/2	<i>Glucose transporter 1/2</i>
GM	Gaiola Metabólica
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HG	Hiperglicose
HG H ₂ O ₂	Hiperglicose + Peróxido de Hidrogênio
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
JC-1	<i>1st J-aggregate-forming cationic dye</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LEP	Leptina
LEPR	<i>Leptin Receptor</i>
MAP-quinase	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MFN	Mitofusina
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MN	Manitol
mTmG	<i>Membrane-localized tdTomato - Membrane-localized Green Fluorescent Protein</i>
MTT	<i>3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NADH	Dinucleotídeo Nicotinamida Adenosina
NG	Normoglicose
NG H ₂ O ₂	Normoglicose + Peróxido de Hidrogênio
NM	Não Marcado
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i>
OPA	<i>Optic Atrophy</i>
PARKIN	<i>Parkinson Protein 2 E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
PAS	<i>Periodic acid–Schiff</i>
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCQM	Programa de Controle de Qualidade Mitochondrial

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PGC-1	<i>Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator-1</i>
PINK1	<i>PTEN-Induced Putative Kinase Protein 1</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
q RT-PCR	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPM	<i>Rotations Per Minute</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SGPP	Sistema Gerenciador de Projeto de Pesquisa
SGLT2	<i>Sodium-glucose co-Transporter 2</i>
SQSTM1	<i>Sequestosome-1</i>
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TFAM	<i>Transcription factor A mitochondrial</i>
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TFGe	Taxa de Filtração Glomerular estimada
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WT	<i>Wild Type</i>
WT-1	<i>Wilms' Tumour-1</i>

Resumo

Introdução: A Doença Renal Diabética é caracterizada pela progressiva perda da função renal e proteinúria tempo-dependentes. A hiperglicemia causa estresse oxidativo e afeta a resposta adaptativa mitocondrial, que é caracterizada pela modulação da biogênese, mitofagia, fusão e fissão (Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial). As células-tronco mesenquimais têm ação antioxidante e podem contribuir para o reparo da mitocôndria, estacionando a progressão da Doença Renal Diabética. **Objetivos:** Avaliar o efeito renoprotetor e antioxidante das células-tronco mesenquimais frente a hiperglicose da Doença Renal Diabética, investigando a modulação do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial. **Métodos:** *In vitro*, condicionamos células glomerulares mesangiais de camundongo em hiperglicose e peróxido de hidrogênio. Já *in vivo*, utilizamos camundongos machos BTBR^{ob/ob}, *knockout* para o gene da leptina, que é um modelo de obesidade, diabetes tipo 2 e Doença Renal Diabética. Em ambos os cenários, realizamos terapia com células-tronco mesenquimais da medula óssea de camundongos Rosa26-mTmG, que expressam naturalmente a *red fluorescent protein*. *In vitro*, pela cocultura direta e, *in vivo*, por 2 administrações intraperitoneais. *In vitro*, avaliamos morfologia, proliferação, migração, morte celular, concentração de H₂O₂ mitocondrial e a expressão gênica dos marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial nas células mesangiais. Já no modelo *in vivo*, avaliamos ganho de peso, glicemia, proteinúria, razão de podócitos/glomérulo, expansão mesangial, expressão gênica dos mesmos macadores mitocondriais no córtex renal, *homing* renal das células-tronco administradas via intraperitoneal, ativação da via caspase 3 nos rins e peroxidação lipídica renal nos animais BTBR^{ob/ob}. O projeto foi pré-aprovado pelo comitê de ética sob o registro: 3129-17. As amostras do repositório estão sob os registros do Comitê de Ética no Uso de Animais: 2704-16 (animais controle) e 3092-17 (animais na terapia celular). **Resultados:** *In vitro*, as células-tronco mesenquimais reduziram o acúmulo de H₂O₂ na mitocôndria das células mesangiais, além de diminuir a morte celular e induzir a expressão gênica da via de biogênese e mitofagia, frente à hiperglicose e H₂O₂. Já nos animais BTBR^{ob/ob}, as células-tronco mesenquimais migraram para os rins, promovendo a redução do dano renal, que foi evidenciado pela menor proteinúria e pela indução da expressão das vias de biogênese, mitofagia, fusão, fissão e motilidade

mitocondriais. Além disso, as células-tronco tiveram efeito protetor na manutenção dos podócitos e evitaram a expansão mesangial exacerbada, com indício de inibição da via de apoptose. **Conclusão:** As células-tronco mesequimais têm efeito reparador e renoprotetor na Doença Renal Diabética, reduzindo o estresse oxidativo, a morte celular e o dano renal, além de induzir a expressão dos componentes do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial.

Descritores: Diabetes mellitus tipo 2; Nefropatias diabéticas; Mitocôndrias; Células-tronco adultas; Estresse oxidativo

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus e a doença renal diabética

O diabetes *mellitus* (DM), considerado uma doença epidêmica, tem cada vez maior prevalência no transcorrer dos anos de forma a tornar-se um grave problema de saúde pública a nível mundial. Estima-se que, em 2019, eram 463 milhões de indivíduos afetados pela doença no mundo (Figura 1) e, apenas no Brasil, mais de 16 milhões. As previsões indicam que, até 2045, haverá um aumento mundial para 700 milhões de pessoas com DM.⁽¹⁾ O DM afeta gravemente a qualidade de vida das pessoas acometidas e gera altos custos aos recursos administrativos de saúde pública, com valores na casa dos trilhões de dólares mundialmente.⁽²⁾

Fonte: Traduzido de International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 9th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2019.⁽¹⁾

Figura 1. Distribuição mundial da prevalência do diabetes *mellitus* em 2019 e da projeção de incidência até 2045 (20-79 anos)

Como um dos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do DM tipo 2, a obesidade vem aumentando sua expressão epidemiológica de forma a também ser considerada uma pandemia mundial e uma doença crônica e progressiva. As abordagens de controle preventivo e tratamento da obesidade não têm tido sucesso nas políticas públicas e mesmo no acompanhamento médico individual, de forma a contribuir para a pandemia diabética. A média de

prevalência da obesidade em adultos foi de 19,5% em 2017, chegando a 30% em países como os Estados Unidos da América (EUA).⁽³⁾

Sendo a hiperglicemia a principal marca do DM, existem terapias classicamente empregadas para o controle glicêmico. Na linha de frente estão os medicamentos hipoglicemiantes integrados à reeducação alimentar e à prática de exercícios físicos moderados e regulares. Além disso, existem prescrições a respeito da interrupção ou, pelo menos, diminuição do tabagismo e a administração de fármacos responsáveis pelo tratamento dos sintomas do DM, como a elevada pressão arterial. No entanto, mesmo com todo o conhecimento acerca de tratamentos para as pessoas com DM, expressiva parcela dessa população acaba desenvolvendo complicações microvasculares (retinopatia, neuropatia e doença renal diabética [DRD]) e macrovasculares (doença arterial periférica, doença cardiovascular e acidente vascular encefálico). O aparecimento das complicações vasculares é ainda mais agravado devido ao grande número de pessoas – 1 em cada 2 diagnosticadas – que têm DM e não tratam pela falta de diagnóstico. É notável e preocupante a falta de conhecimento público a respeito do DM e suas complicações, levando muitas pessoas a conviverem com a doença de forma inadvertida por anos.⁽¹⁾

A DRD, uma das principais complicações causadas pelo DM, tem por causa primária a hiperglicemia, podendo ou não estar associada à resistência à insulina e às alterações na pressão sistólica. Essencialmente, a DRD é crônica e progressiva, tendo por principais características a elevada e persistente proteinúria e a progressiva perda da taxa de filtração glomerular (TFG).⁽⁴⁾ Com o passar dos anos, a DRD pode chegar ao estágio 5 da doença renal crônica,⁽⁵⁾ sendo necessária a diálise como terapia substitutiva da função renal ou o transplante de rim. Essa é uma complicação microvascular que chega a afetar 30-40% dos indivíduos acometidos por DM, afetando gravemente sua qualidade de vida e sendo fator de risco para complicações cardíacas, associadas a elevadas taxas de mortalidade.⁽⁶⁾ Frente ao desafio apresentado nesse cenário, é importante conhecer e compreender mais profundamente os mecanismos fisiológicos e moleculares básicos por trás do metabolismo da glicose e da função renal (sessões 1.1.1 e 1.1.2, respectivamente). Em seguida, para atuarmos de maneira mais assertiva e impactante no combate aos malefícios da DRD, devemos correlacionar os conhecimentos fisiológicos com os mecanismos já conhecidos da DRD (sessão 1.2).

1.1.1 Fisiologia renal

Os rins são compostos por múltiplas populações celulares, com mais de 30 tipos e, tratando-se do néfron, são distinguíveis os principais componentes estruturais: glomérulo, túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor. Os rins situam-se anatomicamente de forma a receber alto influxo de sangue oxigenado (aproximadamente 20% do débito cardíaco).⁽⁷⁾ Isso se faz necessário por sua alta demanda metabólica, já que é responsável por diversas funções regulatórias como: filtração de toxinas, balanceamento ácido-básico, regulação de eletrólitos, secreção hormonal e reabsorção de nutrientes e metabólitos. Assim, a oferta dos suprimentos metabólicos (sangue, oxigênio, glicose) são fatores que afetam sensivelmente a produção e o consumo de trifosfato de adenosina (ATP – *Adenosine tri-phosphate*) pelas células renais. Um dos principais tipos celulares responsáveis pela alta demanda energética é a do epitélio do túbulo proximal, segmento do néfron onde ocorrem os principais transportes (de forma ativa – com gasto de ATP) de reabsorção e secreção de substâncias diversas. Abaixo, estão alguns detalhes das porções do néfron relacionadas diretamente a fisiopatologia da doença.

1.1.1.1 Glomérulo

Em essência, o glomérulo – unidade de filtração dos rins – é um emaranhado de capilares contidos dentro de uma cápsula (de Bowman) de células epiteliais situado entre duas arteríolas de maior resistência, sendo a arteríola aferente por onde chega o suprimento sanguíneo e a eferente, por onde sai o sangue filtrado. Compondo as camadas da barreira de filtração, em sua porção mais proximal, está a camada endotelial fenestrada (70-100 nm de diâmetro). Em seguida, como segunda camada, está a membrana basal glomerular (MBG) – composta por proteínas extracelulares (colágeno IV, laminina, fibronectina e proteoglicanos). Por fim, na camada mais distal, estão os podócitos – células epiteliais especializadas, que dão suporte estrutural e criam os diafragmas importantes na conclusão da filtração (Figura 2). Ao redor dos capilares (compostos pelas 3 estruturas básicas mencionadas acima), está o mesângio, formado pelas células glomerulares mesangiais (CGMs) e matriz extracelular secretada por elas mesmas, compondo cerca de 30-40% da população total de células do glomérulo.⁽⁸⁾ O mesângio contribui para a manutenção do equilíbrio

físico dos capilares e da hemodinâmica glomerular, modulando o fluxo sanguíneo dos capilares glomerulares através de contração celular (são de tipo muscular liso) e, conseqüentemente, acabam influenciando a TFG.⁽⁹⁾ O filtrado que surge ao fim da passagem por essa barreira cai no espaço da cápsula de Bowman, sendo em seguida conduzido à porção tubular do néfron.⁽¹⁰⁾

Seta indicando região em ampliação, com detalhe da barreira de filtração.

Fonte: Adaptado e traduzido de Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: the sphere of influence. Clin J Am Soc Nephrol. 2014;9(8):1461–9.⁽¹⁰⁾

Figura 2. Glomérulo e alguns de seus componentes (podócitos, tufo de capilares, membrana basal glomerular [MBG]).

1.1.1.2 Túbulo proximal

Constituindo ~90% do córtex renal, as células do túbulo proximal são incumbidas, principalmente, da manutenção do equilíbrio do fluído extracelular. O túbulo proximal executa a secreção de metabólitos e reabsorção de valiosas substâncias filtradas no glomérulo, sendo alguns exemplos de substâncias reabsorvidas: água, glicose, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, aminoácidos, ânions fosfato e citrato. Por isso, possui uma alta demanda metabólica que o leva a ser o local mais rico em mitocôndria, após o coração. Adicionalmente, o túbulo proximal tem a função de metabolizar a vitamina D para sua forma ativa, aumentando os níveis de cálcio circulatório. A reação inversa também é feita nesse segmento, com a inativação da vitamina D.⁽¹¹⁾ Ainda, em ações metabólicas, o túbulo proximal executa a gliconeogênese, assim como o fígado, produzindo localmente a glicose através da absorção e metabolização da glutamina.⁽¹²⁾ Como atuação na tarefa endócrina dos rins,

é pelo túbulo proximal que são feitas as secreções de importantes substâncias: klotho, renina, eritropoietina.^(13,14)

1.1.1.2.1 Transporte da glicose

Existem dois cotransportadores, no túbulo proximal, responsáveis pela captação da glicose filtrada pelos glomérulos: *Sodium-glucose co-Transporter* (SGLT) 1 e SGLT2.⁽¹⁵⁾ O SGLT2, localizado na borda em escova, faz o cotransporte de uma molécula de sódio para cada glicose internalizada, sendo responsável pela maior parte da glicose reabsorvida (97%).⁽¹⁶⁾ Já o SGLT1, situado em porção mais distal do túbulo proximal, possui afinidade maior pela glicose e transporta duas moléculas de sódio para cada uma de glicose, sendo o controle fino que remove os resíduos. Esse sistema seriado de cotransportadores com diferenças na dinâmica de interação e efeito na internalização da glicose cria um sistema muito eficiente, captando praticamente toda a glicose filtrada e deixando menos de 1% escapar do túbulo proximal. A partir das células tubulares, a glicose alcança a circulação sistêmica através da difusão facilitada pelos transportadores *Glucose transporter* (GLUT) 1 e GLUT2 (independentes de sódio), sendo pouco ou nada metabolizada no local (Figura 3). A gliconeogênese tubular contribui para a manutenção da igualdade dos níveis de glicose que entra e que sai dos rins, considerando que uma parte da glicose vinda pelas artérias é utilizada em outros segmentos do néfron.⁽¹⁷⁾

Fonte: Traduzido de Jung CH, Jang JE, Park JY. A novel therapeutic agent for type 2 diabetes mellitus: SGLT2 inhibitor. *Diabetes Metab J.* 2014;38(4):261-73. Fig.1. Glucose reabsorption in the renal proximal tubule; p. 262.⁽¹⁸⁾

Figura 3. Túbulo proximal e a reabsorção da glicose pelos cotransportadores *sodium-glucose co-transporters* 1 e 2 e o transporte da glicose, rumo à circulação, via *glucose transportes*

1.1.1.3 Túbulo distal e a mácula densa

O túbulo distal (TD) é a menor porção do néfron, imediatamente seguindo a mácula densa, e é altamente ativo em termos metabólicos. Anatomicamente é subdividido em duas porções: inicial e final. A cerca das funções, esse segmento é responsável pela homeostase de íons como sódio (~5% do filtrado),⁽¹⁹⁾ cloro (reabsorvido junto com sódio), potássio e cátions bivalentes (magnésio e cálcio). A reabsorção do sódio no túbulo distal é feita de acordo a demanda, sendo diretamente proporcional à quantidade de sódio no lúmen, o que se faz acompanhado de alterações hipertróficas caso esta esteja aumentada.⁽²⁰⁾ A porção inicial do TD faz contato com a arteríola aferente e forma uma estrutura diferenciada chamada mácula densa que, em associação ao mesângio extracelular, compõe o aparelho justaglomerular. A mácula densa, funciona como um sensor de NaCl no lúmen tubular, que sinaliza às células da arteríola aferente de acordo à concentração do soluto. Em caso de excesso de NaCl, a sinalização do *feedback* tubuloglomerular estimula a vasoconstrição da arteríola aferente. Já em caso de baixa concentração de NaCl

tubular, a sinalização da mácula densa estimula a produção de renina pelas células endoteliais da arteríola aferente que, por sua vez, desencadeia a ação da angiotensina, levando a vasoconstrição em múltiplos órgãos e aumento da reabsorção de sódio e água pelo túbulo proximal, além da produção de aldosterona pela glândula adrenal.⁽²¹⁾ O objetivo dessas ações é modular o fluxo sanguíneo e a TFG. Ainda outros fatores são vigiados por esse aparelho justaglomerular: pressão de perfusão renal, ativação da inervação simpática e redução de hormônios atuantes no local (como angiotensina II).

1.1.1.4 Produção energética renal e a mitocôndria

A grande demanda metabólica do rim, com alta densidade mitocondrial, o coloca como o segundo órgão de maior consumo de oxigênio em estado de repouso.⁽²²⁾ Esse oxigênio é consumido na mitocôndria pela oxidação fosforilativa (OXPHOS – *Oxidative phosphorylation*), na formação de ATP pela respiração celular. A OXPHOS tem por fundamento a tarefa de converter substratos (glicose, aminoácidos, ácidos graxos) em ATP e o oxigênio é responsável pela captação dos elétrons que saem da cadeia transportadora de elétrons (CTE) na membrana mitocondrial durante a OXPHOS (Figura 4). A alta concentração de prótons de hidrogênio no espaço intermembrana mitocondrial, levada a cabo pela passagem dos elétrons nos complexos I a IV da CTE, cria um potencial eletroquímico que é convertido na energia motriz para ligação de ADP e fosfato (P – *Phosphate*) no complexo V da CTE. Proteínas carreadoras fazem o trabalho de transporte do ATP para fora da mitocôndria, rumo às demais localidades celulares.⁽²³⁾

MEM: membrana externa mitocondrial; MIM: membrana interna mitocondrial; Cit. C: citocromo C.

Fonte: Traduzido de Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(10):629–46. Figure 1. ATP production in the kidney; p. 631.⁽²⁴⁾

Figura 4. Esquema simplificado da interação de glicólise, ciclo de Krebs e oxidação fosforilativa, formando a principal via de produção de trifosfato de adenosina nos rins.

Fisiologicamente, 90% do ATP produzido nos rins tem origem na OXPHOS.⁽²⁵⁾ No entanto, o metabolismo via oxidação da glicose não é hegemônico em todo o néfron, ocorrendo apenas no glomérulo, vasos e no ramo ascendente espesso da alça de Henle. Já na porção mais hipóxica do néfron, a produção de ATP ocorre via metabolismo anaeróbico da glicose.⁽²⁶⁾ Alguns outros substratos são usados ao invés da glicose, como é o caso de ácidos graxos livres e cetonas – que ocorre nos segmentos túbulo-intersticiais, com exceção do glomérulo (Quadro 1).⁽²⁷⁾

Quadro 1. Preferências de substratos metabólicos para cada segmento do néfron

Segmento do néfron	Glicose	Ácidos graxos	Lactato	Glutamina	Cetonas
Glomérulo	Preferível substrato em condições fisiológicas	Usado prontamente em jejum e quando desafiado	Preferível substrato em condições fisiológicas	Uso negligenciável	Uso negligenciável
Túbulo Proximal*	Uso negligenciável	Preferível substrato em condições fisiológicas	Preferível substrato em condições fisiológicas	Preferível substrato em condições fisiológicas	Usado prontamente em jejum e quando desafiado
Ramo Ascendente Fino	Preferível substrato em condições fisiológicas	Uso negligenciável	Preferível substrato em condições fisiológicas	Preferível substrato em condições fisiológicas	Usado prontamente em jejum e quando desafiado
Ramo Ascendente Espesso	Preferível substrato em condições fisiológicas	Preferível substrato em condições fisiológicas	Usado prontamente em jejum e quando desafiado	Uso negligenciável	Preferível substrato em condições fisiológicas
Túbulo Distal	Usado prontamente em jejum e quando desafiado	Preferível substrato em condições fisiológicas	Preferível substrato em condições fisiológicas	Uso negligenciável	Preferível substrato em condições fisiológicas
Duto Coletor	Preferível substrato em condições fisiológicas	Uso negligenciável	Usado prontamente em jejum e quando desafiado	Usado prontamente em jejum e quando desafiado	Uso negligenciável
* O túbulo proximal também usa citrato, piruvato, acetato e succinato para síntese de ATP quando as concentrações dos outros substratos estão em baixa.					

Fonte: Traduzido de Forbes JM, Thorburn DR. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. Nat Rev Nephrol. 2018;14(5):291–312.⁽²⁷⁾

A oxidação de ácidos graxos gera ATP de forma muito mais eficiente para cada molécula de substrato em comparação a glicólise (Figura 5). Por exemplo, 1 molécula de palmitato gera 129 moléculas de ATP, enquanto que, na respiração celular, 1 molécula de glicose gera 38 moléculas de ATP. Os segmentos que preferem essas formas de metabolismo demonstram sua alta demanda energética – caso dos túbulos proximal e distal, onde ocorre intenso transporte ativo de reabsorção e excreção.⁽²⁸⁾ Os segmentos tubulares (proximal e ramo espesso da alça de Henle)

presentes na região corticomedular são detentores de maior concentração mitocondrial dos rins, aproveitando o maior aporte de oxigênio dessa área.⁽²⁹⁾ Ainda, as células do túbulo proximal usam ATP para síntese de glicose via gliconeogênese, contribuindo com até 20% do total de glicose sistêmica durante o jejum.⁽¹⁶⁾ Como substratos para a gliconeogênese servem, principalmente, o glicerol, o lactato e o glutamato.⁽³⁰⁾ Por fim, parte menos expressiva do ATP renal gerado é usado para funções como síntese hormonal e proteica, além de algumas atividades da filtração glomerular (contração de podócitos e de célula glomerular mesangial – CGMs).⁽³¹⁾

FABP: proteína ligadora de ácido-graxo (*fatty acid-binding protein*); MIM: membrana interna mitocondrial; MEM: membrana externa mitocondrial; CPT1: carnitina palmitoil transferase I.

Fonte: Traduzido de Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(10):629–46. Figure 1. ATP production in the kidney; p. 631.⁽²⁴⁾

Figura 5. Esquema simplificado da oxidação de ácidos graxos por células do túbulo proximal, uma das principais fontes de energia dessas células

1.2 Fisiopatologia da doença renal diabética

Classicamente definidas, as diferentes fases da progressão das alterações morfo-funcionais são categorizadas em 5 estágios de gravidade, segundo Mogensen⁽⁴⁾ (Quadro 2).

Quadro 2. Estágios da progressão da doença renal diabética e suas respectivas características de alterações

Estágio	Característica	Cronologia (anos)	Prognóstico
1) Hiperfiltração e Hipertrofia	Aumento da TFGe estimada Proteinúria induzida por exercício	Início do diabetes <i>mellitus</i>	Reversível
2) Silencioso - lesões morfológicas	TFGe normal, expansão mesangial, espessamento da membrana basal	2-5	Parcialmente reversível
3) Nefropatia incipiente	Menor TFGe Proteinúria: 30-300mg/24h	5-10	Parar a progressão é acessível
4) Nefropatia instaurada	Menor TFGe (10% menor/ano) Proteinúria persistente	10-25	Desacelerar a progressão é acessível
5) Estágio final	Uremia, esclerose glomerular, fibrose renal, proteinúria atenuada	> 15	Irreversível

TFGe: Taxa de Filtração Glomerular estimada.

Fonte: Traduzido de Mogensen CE. Microalbuminuria in prediction and prevention of diabetic nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus patients. J Diabetes Complications. 1995;9(4):337-49.⁽⁵⁾

De modo geral, as alterações relacionadas à DRD são de caráter metabólico, inflamatório, hemodinâmico e fibrótico. Inicialmente, devido à hiperglicemia, ocorrem alterações hemodinâmicas na filtração glomerular que levam a danos celulares importantes. Esses danos vão se acumulando e dando origem às diferentes vias de distúrbios na patologia da DRD. Importante é entender que eles ocorrem ao longo do tempo, muitas vezes com o passar de anos, de forma progressiva e acumulativa (Figura 6). Os rins respondem à hiperglicemia por uma hiperfiltração glomerular e reabsorção tubular da glicose aumentada.⁽³²⁾ Para viabilizar a maior reabsorção tubular, os cotransportadores (SGLT1/2) responsáveis pela captação da glicose passam a ser mais expressos no túbulo proximal. Em consequência do caráter ativo (com gasto de ATP) da internalização da glicose, a maior expressão de SGLT1/2 leva a maior demanda metabólica por parte dos rins.⁽³³⁾ Esse fato ativa uma reação em cadeia, levando a necessidade de mais ATP ser produzido pela mitocôndria renal que, por sua vez, consome mais oxigênio via respiração celular. É dessa forma que ocorre o quadro de hipóxia renal, que gera altos níveis de estresse e dano tecidual.^(33,34) O sódio, cotransportado com a glicose, também é mais reabsorvido pelo túbulo proximal, diminuindo sua concentração luminal e ativando os sensores da mácula densa no TD. A resposta da mácula densa frente à queda nos níveis de sódio gera inibição do

feedback túbulo-glomerular, liberando o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Dentre os efeitos do SRAA está a indução de maior aporte sanguíneo, via dilatação da arteríola aferente e constrição da arteríola eferente. Além disso, o SRAA leva a maior aumento da pressão intraglomerular, que desencadeia a hiperfiltração glomerular e a consequente hipertrofia dos componentes da barreira de filtração.^(33,35) Com a evolução do quadro patológico, ocorrem perdas heterogêneas dos néfrons funcionais ao longo do tecido renal e os néfrons remanescentes passam a uma sobrecarga de trabalho. Em consequência, ocorrem alterações compensatórias de hiperfiltração como mecanismo de manutenção da TFG total em níveis normais, o que também contribui para a hipertrofia. Mais tardiamente, com o agravamento do quadro e a perda progressiva de mais néfrons, o desequilíbrio começa a ficar evidente e a TFG total se mostra reduzida (com cerca de 20-40% de néfrons funcionais).⁽³⁶⁾

TFG: taxa de filtração glomerular; DREF: doença renal em estágio final.

Fonte: Traduzido de Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities. Clin J Am Soc Nephrol. 2017;12(12):2032–45.⁽³⁷⁾

Figura 6. Aparecimento das diferentes alterações da doença renal diabética ao longo do tempo, de forma cumulativa e progressiva

De um ponto de vista glomerular: ao longo da progressão do quadro, ocorrem danos e alterações no endotélio, com altos níveis de inflamação, perda do tônus da parede e aumento da permeabilidade dos vasos, contribuindo para a proteinúria – biomarcador do dano renal.⁽³⁸⁾ Esses danos endoteliais, além da DRD,

estão por trás de diversas complicações micro e macrovasculares associadas ao DM, inclusive as cardiovasculares.⁽³⁹⁾ Paralelamente, ocorre o espessamento da membrana basal glomerular, devido ao acúmulo das proteínas normalmente expressas (entactina, colágeno IV, colágeno V, colágeno VI, fibronectina, laminina, proteoglicanos) e/ou pela deposição de proteínas que não são normalmente expressas (colágeno I, colágeno III).⁽⁴⁰⁾ Tratando-se dos podócitos, a associação das alterações do microambiente já relatadas nessa sessão leva ao descolamento podocitário e a morte por apoptose.⁽⁴¹⁾ Os podócitos remanescentes passam a trabalhar de forma compensatória e sofrem hipertrofia, além de terem distúrbios no citoesqueleto que acabam por alterar os seus prolongamentos celulares da fenda de filtração nos capilares glomerulares.⁽⁴¹⁾ Assim, a perda dos podócitos é fator determinante para instalação e agravamento da proteinúria.⁽⁴²⁾ Finalmente, outro ponto importante nas alterações glomerulares é a expansão mesangial que, por definição, ocorre devido ao acúmulo de matriz extracelular produzida pelas CGMs e pela falha na degradação pelas enzimas metaloproteinases.⁽⁴³⁾ Inicialmente na DRD, ocorre a hiperplasia das CGMs, logo seguida pela parada do ciclo celular e a hipertrofia, que então passa a contribuir para a produção de matriz extracelular em excesso (colágeno IV e outros; Figura 7).^(37,44) Fator de crescimento transformante beta (TGF- β – *Transforming Growth Factor beta*), proteína quinase ativada por mitógeno (MAP-quinase – *Mitogen Activated Protein Kinase*) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*) são induzidos pela hiperglicemia e estão entre os responsáveis pela parada do ciclo celular e ativação da via produtora de colágeno.⁽⁴⁵⁾

Fonte: Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities. Clin J Am Soc Nephrol. 2017;12(12):2032–45.⁽³⁷⁾

Figura 7. Morfologia normal (A) e alterada pelo diabetes *mellitus* (B) de glomérulos seccionados. Principais estruturas alteradas: células mesangiais, membrana basal, podócitos, endotélio

Além da clássica visão "glomerulocêntrica" da fisiopatologia da DRD, os danos tubulares são também determinantes para a instalação e progressão da doença pela visão da "tubulopatia diabética". Um dos pontos levantados para essa nova abordagem é a microalbuminúria, ou albuminúria moderada, como biomarcador da fase inicial da doença. Muitos indivíduos com DRD não desenvolvem albuminúria, ou a tem de forma estacionária, não correspondendo com a progressão geral da doença e evidências recentes têm colocado o fenótipo de DRD sem proteinúria como o mais prevalente atualmente.⁽³⁵⁾ Dessa forma, as evidências levantam a necessidade de inclusão do componente tubular, além da hemodinâmica glomerular e da barreira de filtração, nos mecanismos da patogênese da DRD e a busca por biomarcadores de dano tubular específicos. O metabolismo tubular é diferente do glomerular, sendo de padrão gliconeogênico e utilizando outros substratos preferencialmente (Quadro 1). Isso leva a uma resposta diferente frente à hiperglicemia, sendo as células do túbulo proximal (TP) obrigadas a utilizar a glicose internalizada ao invés da convencional via de oxidação lipídica, por exemplo. As células do TP não conseguem reduzir a internalização de glicose em cenário de hiperglicemia, o que poderia proteger o ambiente intracelular da citotoxicidade e das alterações metabólicas.⁽⁴⁶⁾ A combinação dessas alterações metabólicas (incluindo o maior gasto de ATP e oxigênio pelas células do TP na reabsorção da maior quantidade de glicose no lúmen tubular) com as

alterações hemodinâmicas de vasoconstrição e danos nos capilares peritubulares pode levar a um estado de hipóxia, isquemia e dano tubular.⁽³⁵⁾

Em relação à reabsorção de proteínas rumo à circulação, as células do TP são as protagonistas em comparação aos outros segmentos do néfron. Esse processo ocorre pelo transporte via complexo megalina-cubilina, ambas expressas na borda em escova.⁽⁴⁷⁾ A alta exposição das células do TP a maior concentração proteica no lúmen gera citotoxicidade e danos tubulares devido ao aumento da demanda reabsortiva e ao acúmulo de proteínas intracelulares que, apesar da resposta adaptativa, pode ativar vias de inflamação.⁽³⁵⁾ Assim, existe a contribuição individual do glomérulo e do TP na proteinúria, além de uma relação de toxicidade de um levando ao outro. A megalina pode ser usada como biomarcador da função tubular, já que a sua ausência impede grande parte da ação reabsortiva de proteínas filtradas pelo glomérulo ⁽⁴⁸⁾ e por existir uma forte correlação entre o dano túbulo-intersticial e a função renal ao longo da doença.⁽³⁵⁾ Ainda, o sucesso clínico no combate à progressão da DRD pela administração dos fármacos glifozinas, bloqueadores da reabsorção tubular via cotransportador SGLT2, levando a preservação da função renal, é uma forte evidência dessa tese tubulocêntrica.⁽⁴⁹⁾

Além dessas, outra tese que busca explicar e contribuir no entendimento da patogênese da DRD é a partir do ponto de vista do estresse oxidativo e sua interrelação com a mitocôndria, protagonistas nos danos renais pelo DM.^(50,51) Interessantemente, esse entendimento pode ser aplicado para elucidar a patogênese das complicações diabéticas em outros órgãos além dos rins, já que envolve alterações metabólicas e de sinalização celular que afetam todo o sistema fisiológico. Para tal, é importante compreendermos qual é o entendimento atual sobre o estresse oxidativo, a sinalização redox e, em seguida, associarmos ao conhecimento acerca da mitocôndria e sua resposta ao estresse.

1.2.1 Estresse oxidativo *versus* sinalização redox

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio funcional que leva a alterações estruturais, ocorrendo pelas adaptações e respostas ao aumento excessivo e persistente de agentes pró-oxidantes, as espécies reativas de oxigênio (EROs). As consequências do estresse oxidativo variam desde danos biomoleculares a

mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) e morte celular, dependendo do grau do desequilíbrio.⁽⁵²⁾ As EROs são produtos secundários do metabolismo aeróbico, altamente reativas com as moléculas ao seu redor, alterando a conformação radical de estruturas proteicas, lipídicas e do DNA.⁽⁵³⁾ Os principais tipos de EROs são: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\bullet$). No entanto, quando em concentrações fisiológicas – já que são um subproduto natural – atuam na sinalização celular e regulam diversos processos.⁽⁵⁴⁾ Essa sinalização é essencial para a adaptação às demandas ambientais em relação ao suplemento nutricional. Por exemplo, o H_2O_2 em concentrações fisiológicas (baixas), atua oxidando um resíduo de cisteína nas proteínas de forma transiente, o que transmite uma sinalização específica. Quando em excesso, essa oxidação acontece de maneira quimicamente diversa, tornando a alteração permanente e levando a danos na estrutura proteica.⁽⁵⁵⁾ Naturalmente, o H_2O_2 é obtido através da conversão, pelas enzimas superóxido dismutases, do O_2^- produzido na respiração celular mitocondrial.⁽⁵⁶⁾ Para evitar que ocorra acúmulo de H_2O_2 , existem agentes antioxidantes especializados, como as enzimas glutatonas peroxidases (Figura 8).

Fonte: Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Curr Biol. 2014;24(10):R453–62. Figure 1. Basics of ROS; p. R454.⁽⁵⁷⁾

Figura 8. Sinalização redox e o estresse oxidativo

Os diferentes tipos de EROs, além do sítio de sua produção, determinam qual será o resultado da sinalização redox ou mesmo do dano causado pelo excesso de sua síntese. Isso ocorre pela diferente reatividade de cada uma das espécies, que determina sua meia-vida e capacidade de alterar os resíduos

moleculares, como também é determinante a proximidade com os alvos de acordo ao sítio de produção intracelular.⁽⁵⁷⁾ Além disso, cada tipo celular responde de maneira distinta às alterações redox, o que mostra uma especificidade dependente do contexto e do tipo de célula.⁽⁵⁸⁾

Há mais de 50 anos foi postulada a teoria que associa danos mitocondriais ao aumento de EROs e o envelhecimento.⁽⁵⁹⁾ Desde então, muitos estudos vêm sendo publicados a respeito dos malefícios das EROs e do estresse oxidativo. Essa cultura levou à busca indiscriminada por abordagens antioxidantes, visando bloquear o acúmulo de EROs e evitar o estresse oxidativo. Apesar disso, existem conclusões conflitantes na literatura a respeito dos benefícios da abordagem antioxidante na prevenção das alterações do estresse oxidativo.⁽⁶⁰⁾ Ao que indica o atual entendimento, os benefícios de uma intervenção com antioxidantes não são simplesmente obtidos a partir de um bloqueio indiscriminado da produção de EROs. Essa abordagem indisciplinada e inespecífica altera tanto a parte patológica quanto a fisiológica da sinalização redox, o que pode estar por trás dos resultados desestimulantes das terapias antioxidantes (Figura 9).

EROs: espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Sagoo MK, Gnudi L. Diabetic nephropathy: Is there a role for oxidative stress? Free Radic Biol Med. 2018;116:50-63.⁽⁵⁸⁾

Figura 9. Níveis de espécie reativa de oxigênio e o respectivo efeito tóxico ou fisiológico

Ainda, existem cenários em que aumentar determinadas EROs, em locais específicos, leva a efeitos benéficos. Como é o caso do exercício físico moderado.⁽⁶¹⁾ Ainda, evidências têm apontado os efeitos negativos da alta suplementação de antioxidantes, levando ao chamado estresse redutivo⁽⁶²⁾ que

bloqueia as atuações fisiológicas das EROs e pode estar na base disparadora do estresse oxidativo pela hiperglicemia.⁽⁶³⁾ Assim, é importante modular essa dinâmica de forma a inibir as vias patológicas e preservar, ou estimular, as vias benéficas e fisiológicas.

A hiperglicemia, pelo aumento de influxo de glicose nas vias metabólicas, gera o aumento de EROs e ativa as principais vias moleculares de sinalização associadas ao estresse oxidativo.⁽⁵⁸⁾ Assim, a hiperglicemia leva a maior síntese de produtos avançados da glicação não enzimática (AGEs – *Advanced Glycation End-product*), ativação da proteína quinase C (PKC – *Protein Kinase C*) e aceleração da reação envolvendo aldose redutase, todos processos relacionados ao estresse oxidativo.⁽⁶⁴⁾ Além disso, também são importantes a indução da via do poliol e o estímulo à atividade da via hexosamina.⁽⁶⁵⁾ O mais importante é que, anteriormente à ativação dessas vias, a mitocôndria é especialmente afetada pelo desequilíbrio da hiperglicemia diabética^(66,67) com evidências se acumulando na demonstração de que os danos do DM têm como causa primária em comum o distúrbio mitocondrial (Figura 10).⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾ Estudos já indicam alterações na função mitocondrial em fases iniciais do DM^(70,71) e da DRD,⁽⁷²⁾ com relação à hiperfiltração glomerular,⁽⁷³⁾ aos danos tubulares⁽⁷⁴⁾ e aos danos renais mesmo sem hiperglicemia.⁽⁷⁵⁾ Assim, é imprescindível que compreendamos melhor o funcionamento fisiológico e metabólico mitocondrial e a sua resposta ao estresse no DM e DRD.

Fonte: Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KA, Zoungas S, et al. Diabetic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15018.⁽⁶⁷⁾

Figura 10. Hiperglicemia e dano mitocondrial no aumento de espécie reativa de oxigênio, com consequente dano no DNA nuclear e bloqueio da via glicolítica. Ativação das vias intermediárias dos substratos da via glicolítica

A mitocôndria regula o metabolismo celular através da síntese de ATP pela OXPHOS, além de ser responsável por diversas outras funções como: homeostase iônica (cálcio e etc.), produção de metabólitos precursores de ácido ribonucleico (RNA)/DNA/proteínas/lipídios, sequestro de agentes potencialmente danosos como a amônia e EROs e a regulação da via de morte apoptótica.⁽⁷⁶⁾ Atualmente, a mitocôndria tem tido maior destaque na sua ação nas vias de sinalização redox, pela síntese fisiológica de EROs, e na coordenação da resposta celular ao estresse, que é altamente dependente de energia.⁽⁷⁷⁾ A resultante entre o sucesso ou a falha dessa resposta ao estresse agudo ou prolongado (como a hiperglicemia) está intrinsicamente relacionada à transição da saúde para o desenvolvimento de doenças.⁽⁷⁷⁾ A hiperglicemia persistente causa um desbalanço na CTE, devido à excessiva demanda de funcionamento mitocondrial que, por sua vez, resulta em

aumento no potencial elétrico de sua membrana. Esse estado alterado de funcionamento leva a maior vazamento de elétrons pelos complexos I e III da CTE, culminando em maior produção de EROs. As EROs em demasia, e por tempo prolongado, superam a defesa antioxidante mitocondrial e causam desbalanço redox, alterando as estruturas e causando dano no DNAm^t.^(27,78) Em consequência, ocorre prejuízo do potencial de membrana, da produção dos componentes proteicos da CTE e falha na síntese de ATP.⁽⁷⁸⁾ A mitocôndria disfuncional produz mais EROs, alimentando esse ciclo vicioso,^(79,80) além da liberação de fatores indutores de morte por apoptose.⁽⁸¹⁾

A síntese de enzimas antioxidantes e a adaptação morfológica da rede mitocondrial são as primeiras atuações da mitocôndria de forma a se adaptar às mudanças ambientais. Caso haja algum dano mitocondrial, o processo de mitofagia é ativado como mecanismo de eliminação da porção mitocondrial disfuncional/danificada e impedimento da morte celular prematura. O mecanismo morfológico tem tido cada vez mais relevância a respeito da sua influência na atividade funcional da mitocôndria, através da dinâmica de modificações na forma e nas ligações com outras organelas.⁽⁷⁷⁾ Em situações fisiológicas, a mitocôndria é organizada em estrutura mais ou menos tubular, de acordo às condições ambientais (Figura 11).

Fonte: Adaptado de Eisner V, Picard M, Hajnóczky G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):755–65.⁽⁷⁷⁾

Figura 11. Esquema da adaptação mitocondrial, frente ao estresse, pela mudança morfológica

A resposta morfológica e funcional da mitocôndria em reação adaptativa às mudanças do meio, e aos possíveis insultos, está baseada no Programa de Controle de Qualidade.⁽⁸²⁾ Os principais componentes desse programa de controle são: biogênese, mitofagia, fusão, fissão e motilidade. Cada um deles tem sua devida atuação, porém funcionam em equilíbrio dinâmico e interdependente, de forma que buscam um balanceamento de atividades entre si de acordo à necessidade adaptativa. A biogênese⁽⁸³⁾ significa a formação de novas organelas funcionais (mitocondrions) e, no polo oposto, está a mitofagia, que é a degradação/reciclagem de mitocondrions danificados ou inúteis.⁽⁸⁴⁾ Fusão e fissão são processos em que se faz a união e a separação de organelas de forma a estruturar a rede em aspecto mais tubular ou mais fragmentado, de acordo ao ambiente e à demanda energética.⁽⁸⁵⁾ E, finalmente, a motilidade mitocondrial representa a capacidade de movimentação mecânica da organela por proteínas motoras, processo que pode ser feito de forma intracelular ou em direção extracelular.⁽⁸⁶⁾ Essa resposta visa reequilibrar a rede mitocondrial, mas pode ter a sua ação impedida ou superada pelos danos em cenários de estresse prolongado (Figura 12).⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾

Fonte: Dahlmans D, Houzelle A, Schrauwen P, Hoeks J. Mitochondrial dynamics, quality control and miRNA regulation in skeletal muscle: implications for obesity and related metabolic disease. Clin Sci (Lond). 2016;130(11):843-52. Figure 1. Healthy and impaired mitochondrial dynamics; p. 845.⁽⁸⁸⁾

Figura 12. Interações no Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial frente à alteração metabólica (obesidade, dieta rica em lipídios), levando a bloqueio da biogênese e fusão e ativação da fissão, além dos danos por espécie reativa de oxigênio

Em relação aos rins, alterações no Programa de Controle de Qualidade Mitochondrial causadas pelo estresse oxidativo hiperglicêmico já foram evidenciadas em células mesangiais de animais⁽⁹⁰⁾ e de pacientes diabéticos.⁽⁹¹⁾ Adicionalmente, existem evidências da atuação protetora que o estímulo da biogênese mitocondrial promove contra o insulto da hiperglicemia⁽⁹²⁾ e também sobre a importância da mitofagia na proteção contra infarto tecidual.⁽⁹³⁾ Nos rins, os efeitos da hiperglicemia levando ao desequilíbrio mitocondrial podem ser muito piores do que em outros cenários menos exigentes de energia em forma de ATP. Sem a correta função mitocondrial, há perda da homeostase celular nos túbulos proximais, levando à degeneração e ao impedimento da absorção de glicose. Quanto maior a depleção de ATP, mais severo é o dano.⁽⁹⁴⁾ Além disso, a desestruturação da síntese de ATP leva às alterações do citoesqueleto com prejuízos do contato célula-célula e perda da barreira de filtração.⁽⁹⁵⁾ Outro exemplo é a fibrose túbulointersticial e a glomerulosclerose, devidas à exagerada deposição de matriz extracelular, que envolvem mecanismos principalmente inflamatórios recrutados e ativados pelas EROs mitocondriais.^(96,97) As alterações específicas que desestabilizam esse programa de qualidade mitocondrial são, assim, relacionadas como causas das principais vias de dano da hiperglicemia diabética, colocando a mitocôndria disfuncional como a causa das complicações associadas ao DM (Figura 13).⁽⁹⁸⁾

EROs: espécies reativas de oxigênio; ERNs: espécies reativas de nitrogênio.

Fonte: Cherry AD, Piantadosi CA. Regulation of mitochondrial biogenesis and its intersection with inflammatory responses. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(12):965-76. Figure 1. Inflammation-induced reactive oxygen and nitrogen species modulate mitochondrial quality control programs through redox signaling; however, higher levels of oxidative stress may also contribute to inflammatory mitochondrial dysfunction, resulting in energetic failure and cell death; p. 42.⁽⁹⁸⁾

Figura 13. Excesso de espécie reativa de oxigênio e dano mitocondrial, criando ciclo vicioso que leva a disfunção mitocondrial

Dentre os componentes mencionados do Programa de Controle de Qualidade mitocondrial (PCQM), a mitofagia é induzida em cenários de dano prolongado, de forma a evitar ativação de apoptose por liberação de citocromo C. No entanto, a mitofagia em excesso ativa mecanismo de morte por levar à inviabilidade da homeostase celular. De forma análoga, a falta de mitofagia leva a acúmulo de debris e mitocôndria disfuncional, o que já vem sendo apontado por um crescente número de evidências como um dos principais mecanismos por trás da patofisiologia de doenças relacionadas ao envelhecimento.⁽⁹⁹⁾ Inclusive, nesse contexto, a indução da mitofagia mostrou resultados no aumento da expectativa de vida.⁽¹⁰⁰⁾ Nos rins, existe um grande e crescente número de evidências indicando alterações da mitofagia como fator determinante na patofisiologia dos distúrbios renais,⁽¹⁰¹⁾ principalmente em relação aos podócitos pelo seu caráter terminal de diferenciação e parada do ciclo celular.⁽¹⁰²⁾ Em decorrência desses apontamentos, devemos compreender os mecanismos por trás da mitofagia para elucidar melhor a sua relação com as alterações da DRD.

1.3.1 Mitofagia

Funcionando tanto fisiologicamente quanto em resposta a danos, a mitofagia é um tipo especializado de autofagia, que coordena a eliminação e reciclagem de porções da mitocôndria danificadas e disfuncionais, através de sinalização que ativa cascatas moleculares associadas ou não à ubiquitinação para lise.⁽¹⁰³⁾ A via reguladora da mitofagia dependente de ubiquitinação é mediada pela sinalização de PINK1 (sintetizado na mitocôndria) e Parkin (citossólico).⁽¹⁰⁴⁾ Na mitocôndria com perda de potencial de membrana, PINK1 deixa de ser degradado e se estabiliza na membrana mitocondrial externa,⁽¹⁰⁵⁾ sendo ativado através de autofosforilação. PINK1 passa então a recrutar o Parkin citossólico,⁽¹⁰⁴⁾ que se associa à membrana mitocondrial e ativa seu sítio de ligação para ubiquitina, formando cadeias de ubiquitina que são fosforiladas por PINK1.⁽¹⁰⁶⁾ A mitocôndria sinalizada pelas correntes de ubiquitina é reconhecida pelos mecanismos de autofagia e sofre a degradação via proteossoma.⁽¹⁰⁷⁾ No entanto, para que a efetiva mitofagia ocorra, é necessária a separação da porção danificada da rede total de mitocôndria. Com esse fim, a fissão através dos agentes DRP1 e FIS se faz imprescindível para o destacamento entre o que deve ser eliminado e o que vai permanecer.⁽¹⁰⁸⁾ De forma a

possibilitar a fissão, moléculas promotoras da fusão, como MFN 1 e 2 devem ser suprimidas momentaneamente⁽¹⁰⁹⁾ e os agentes responsáveis pela motilidade, como as proteínas adaptadoras-motoras Miro, devem atuar de forma a transportar os fragmentos para o devido engolfamento pelo fagolisossomo.⁽¹¹⁰⁾ Nesse panorama, fica clara a interconexão funcional dos fatores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial.^(111,112) Existe ainda mecanismos de mitofagia de forma independente de Parkin, que usam outras moléculas com sítio de ligação para ubiquitina: Gp78, SMURF1, SIAH1, MUL1 e ARIH1.⁽¹¹³⁾ Essas, também atuam na construção de cadeias de ubiquitina para identificação pelo mecanismo de ligação com o autofagossomo (ULK1, DFCP1, WIPI1, LC3).⁽¹¹⁴⁾

Em suma, no cenário de desregulação metabólica causada pela hiperglicemia, com excessiva produção de EROs e danos mitocondriais em retro-alimentação, teremos o desequilíbrio da homeostase energética mesmo antes dos sinais clínicos da DRD. Como um dos primeiros sinais, ocorrem alterações morfológicas mitocondriais, ficando em estado mais fragmentado e produzindo menores taxas de ATP, além da ativação de síntese de enzimas antioxidantes como resposta ao estresse oxidativo. Pela persistente e exacerbada hiperglicemia, a resposta adaptativa compensatória da mitocôndria é superada e os danos passam a se acumular, sendo necessária a intervenção da mitofagia para limpeza dos debris disfuncionais e a devida reciclagem, de modo a evitar a ativação da morte celular por liberação do citocromo c. No entanto, com o acúmulo de estresse, a persistente indução da mitofagia também ativa a morte celular. A desregulação da mitofagia tanto para mais, quanto para menos, leva a erros na recuperação da homeostase mitocondrial e metabólica, criando um cenário de desequilíbrio energético que ativa os processos de morte celular e contribui para a progressão da DRD.^(83,84,101) Em modelos de DM1, induzida por estreptozotocina, foi encontrada alteração disfuncional no marcador PINK1 no córtex renal⁽¹¹⁵⁾ e um aumento dos marcadores p62/SQSTM1, relacionados à desestruturação da autofagia.⁽¹¹⁶⁾ Até então, existe uma lacuna de estudos sobre DRD no DM2, sendo muito mais comum o uso de modelos animais que se assemelham a fisiopatologia do DM1, como nos exemplos citados acima. O nosso modelo animal de estudo (*Black and Tan Brachyury Obese* BTBR^{ob/ob}) desenvolve obesidade e DM2, além de mimetizar os danos renais em humanos, de forma tempo-dependente.⁽¹¹⁷⁾ Dessa maneira, é um modelo pré-clínico de extrema importância para

o entendimento das alterações mitocondriais na DRD, com grande impacto no futuro da saúde pública, já que 90% dos casos são provenientes do DM2.

Após entendermos grande parte dos agentes indicados pela literatura como protagonistas na fisiopatologia da DRD, ainda fica a grande questão a respeito da progressão da doença, que acontece em número expressivo de pessoas, mesmo após o controle glicêmico. Se apontamos a hiperglicemia como o gatilho dos problemas indicados, por que seus efeitos ainda persistem mesmo em normoglicemia? O processo de EROs em excesso, perda de função mitocondrial e falência energética em *looping* pode explicar essa progressão que chega a taxa de 2% ao ano entre os estágios da DRD,⁽¹¹⁸⁾ independente do tratamento empregado. Como proposta para salvar essa mitocôndria em falência progressiva e auto-estimulada, algo externo precisa vir em seu resgate. Aí entra a proposta da terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTM) em associação ao tratamento padrão ouro já utilizado, angariando os benefícios de ambas e visando impacto maior no combate a progressão da DRD. A terapia com CTMs é promissora ferramenta de tratamento, já havendo resultados na redução da glicemia^(119,120) e resultados benéficos em modelos de danos renais,^(121,122) inclusive em DRD.⁽¹²³⁾

1.4 Células-tronco mesenquimais

Segundo o "*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*", são definidas como células-tronco mesenquimais multipotentes por apresentarem habilidade de diferenciação nas 3 linhagens teciduais (adipogênica, condrogênica, osteoblástica), clonogenicidade, morfologia tipo-fibroblasto, auto-renovação e aderência ao plástico.⁽¹²⁴⁾ As CTMs podem ser encontradas em grande variedade de tecidos adultos, como o medular-ósseo (MO) e o adiposo.⁽¹²⁵⁾ Seguindo as mesmas diretrizes de definição, as CTMs expressam marcadores de membrana *Cluster of Differentiation* (CD) específicos como, por exemplo, CD29, CD73, CD90, SCA1 e CD105, e não expressam marcadores de outras linhagens como, por exemplo, CD14, CD19, CD31, CD34 e CD45.⁽¹²⁴⁾ No entanto, existem variações de acordo à espécie das CTMs (humanos, camundongos, ratos), do *background* genético do modelo animal⁽¹²⁶⁾ e do tecido de obtenção (embrionário, adulto – adiposo, medular).

As CTMs vêm sendo amplamente estudadas na medicina regenerativa, com finalidades de reparo e, possivelmente, regeneração de tecidos e órgãos danificados. Já existe um grande número de evidências a respeito do potencial da terapia com CTMs na DRD, ainda com questões em aberto sobre os atuais desafios e inúmeras oportunidades para adaptações e melhoramentos.⁽¹²⁷⁾ Até onde se sabe, as CTMs têm, basicamente, duas frentes de mecanismo reparador: a via indireta pelo secretoma, e a via direta pela transferência mitocondrial por nanotúbulos,⁽¹²⁸⁾ estando delineados abaixo os principais efeitos que podem ter uma atuação mais relevante no reparo do *looping* disfuncional do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial da DRD. Adicionalmente, as CTMs são capazes de interagir com a sinalização do microambiente e, através da leitura dos sinais de dano em células vizinhas, ativam os mecanismos de resposta e adaptação, além de serem capazes de migrar para os locais danificados.⁽¹²⁹⁾ A respeito da diferenciação de CTMs em tipos teciduais, para reposição de células perdidas, existe uma grande controvérsia na literatura.⁽¹³⁰⁾ Ao que tudo indica essa não é a principal forma de ação terapêutica efetiva das CTMs.⁽¹³¹⁾

1.4.1 Secretoma: proteínas solúveis e vesículas extracelulares: atuação parácrina e endócrina

O secretoma das CTMs, responsável pelos efeitos parácrinos e endócrinos, é caracterizado pelo conjunto de fatores de crescimento, enzimas, citocinas e vesículas extracelulares – contendo inclusive mtDNA, mRNA e miRNA – liberadas no microambiente que, ao se dissiparem, atingem as células vizinhas e os órgãos distantes, respectivamente. Sem o devido isolamento desses dois componentes, os efeitos observados pelo uso de meio de cultura condicionado pelas CTMs são devidos à atuação conjunta de ambos os fatores. No entanto, os fatores solúveis e as vesículas extracelulares, isoladamente, já tiveram seus efeitos reparadores demonstrados na literatura.⁽¹³²⁾ Os efeitos da atuação parácrina/endócrina são alcançados mesmo sem a integração prolongada das CTMs no tecido alvo, o que é um dado comumente observado no rastreamento das células injetadas, após certo tempo.⁽¹³³⁾ Outro ponto de interesse é a dinâmica de distribuição das CTMs de acordo à rota de administração escolhida. Uma das mais comuns, a endovenosa, leva ao aprisionamento das células na microvasculatura pulmonar. No entanto, mesmo nesse

cenário, as CTMs secretam os fatores proteicos e as vesículas na circulação e acabam por beneficiar tecidos distantes, de maneira endócrina.⁽¹³⁴⁾

Dentre os principais efeitos renoprotetores das CTMs, via secretoma, estão: a modulação do sistema imune, a diminuição da inflamação e fibrose – com importante modulação de macrófagos,⁽¹³⁵⁾ a redução da morte celular, a transferência mitocondrial e o combate ao estresse oxidativo.⁽¹³⁶⁾ As CTMs diminuem expressivamente o estresse oxidativo através da indução de enzimas antioxidantes, diminuição da produção de EROs e reparo mitocondrial,⁽¹³⁷⁻¹³⁹⁾ promovendo efeitos reparadores tanto em modelos de dano agudo de isquemia e reperfusão⁽¹⁴⁰⁾ quanto em modelos crônicos de DRD.⁽¹³⁸⁾ Evidências têm demonstrado a atuação terapêutica das CTMs através da indução à mitofagia e consequente remoção de organelas mitocondriais já disfuncionais, produzindo efeito regenerador funcional em células beta do pâncreas de pacientes com DM⁽¹⁴¹⁾ e na preservação da função do córtex renal e dos podócitos em exposição crônica à hiperglicemia.^(142,143) A indução da mitofagia é importante fator para combate ao estresse oxidativo, considerando o já descrito mecanismo de contribuição da mitocôndria disfuncional para a produção de EROs.

A versatilidade de atuação das CTMs em diversas vias de reparo é um dos grandes trunfos dessa ferramenta terapêutica, e atualmente existe uma longa lista de outros produtos secretados pelas CTMs, descobertos através da aplicação de tecnologias de análise proteômica.⁽¹⁴⁴⁾ Esse fato abre um leque de entendimento novo de futuras possibilidades de modulações das CTMs, além do entendimento dos diferentes subtipos de acordo à situação do ambiente.

1.4.2 Transferência mitocondrial via contato direto

As CTMs possuem metabolismo diferenciado, estando em um padrão energético glicolítico, com baixa concentração de ATP intracelular e consequente baixa quantidade de EROs e danos oxidativos, tendo um balanço redox altamente regulado e rede mitocondrial preservada.⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁷⁾ Segundo as evidências, as CTMs têm a capacidade de transferir porções de sua mitocôndria às células vizinhas danificadas, como forma de atuar na recuperação e regeneração do alvo.⁽¹⁴⁸⁾ Essa transferência depende de mecanismos intracelulares de motilidade mitocondrial, que se dá pela atuação de proteínas motoras e adaptadoras como a Miro1 – responsável pelo

translado em direção extracelular (Figura 14).⁽¹⁴⁹⁾ As novas organelas mitocondriais provenientes das CTMs modulam o metabolismo bioenergético da célula-alvo, sendo uma estratégia interessante para recuperação da homeostase energética e combate ao estresse oxidativo. Além disso, é uma abordagem que acelera e viabiliza a recuperação do dano, já que as células em crise demorariam muito mais em processos de reformulação por conta própria. Os efeitos dessa transferência vão desde regulação da respiração celular até a redução de danos oxidativos, observados em estudos de cocultura.^(149,150) Essa atuação parece ser efetuada principalmente pela transferência mitocondrial através de nanotúbulos, tendo uma forte influência das proteínas motoras nesse processo e um alto impacto na efetiva atuação reparadora, já que 70% do efeito foi perdido no bloqueio desse tipo de transferência via contato direto.⁽¹⁴⁹⁾ As evidências indicam que a transferência de mitocôndrias via vesículas extracelulares, sem o contato célula-célula, é menos expressiva.⁽¹⁵¹⁾ Esses dados mostram a importância da presença das CTMs, em si, na região de interesse para alcançarmos efetivo reparo.

Em suma, compreendemos que a hiperglicemia leva a disfunção mitocondrial e induz a falha energética, afetando todo o sistema fisiológico com maior ou menor impacto de acordo à susceptibilidade metabólica. Assim, ao estar instalado o *looping* de mal adaptação ao estresse crônico do DM, mesmo em posterior estado de controle glicêmico (normoglicemia) via terapia farmacológica e mudanças no estilo de vida, ocorre a progressão dos danos em expressiva população, possivelmente por um sistema de retro-alimentação entre dano e distúrbio mitocondrial (Figura 13). Nesse cenário as CTMs vêm como fator potencial para resgate mitocondrial e reequilíbrio redox, por suas diversas capacidades reparadoras no âmbito antioxidativo em resposta ao microambiente em estresse. Assim, acreditamos que a terapia com CTMs-MO tem efeito reparador das alterações causadas pela hiperglicose da Doença Renal Diabética, através da ação antioxidante e da modulação do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial.

EROs: espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Buratovich M. Stem cells heal damaged cells by transferring mitochondria [Internet]. Spring Arbor: Beyond the Dish; 2014 [cited 2019 Nov 23]. Figure. This study presents the first mechanistic insight into how Mesenchymal Stem Cells (MSC) act as mitochondrial donors during attenuation of lung inflammation and injury. Mitochondrial donation is an essential part of the MSC therapeutic effect in these models and is positively regulated by Miro1 / Rhot1 mitochondrial transport proteins. Available from: <https://beyondthedish.wordpress.com/2014/02/10/stem-cells-heal-damaged-cells-by-transferring-mitochondria/>

Figura 14. Transferência mitocondrial entre células-tronco mesenquimais e célula epitelial com disfunção mitocondrial, via contato direto e nanotubos. Ação direta da proteína Miro1 no carreamento da mitocôndria

1.5 Objetivos

1. Avaliar o impacto do estresse oxidativo causado pela hiperglicose e pelo peróxido de hidrogênio nas CGMs: alterações da morfologia, viabilidade, capacidade de migração e de metabolização de substratos, concentração de peróxido de hidrogênio mitocondrial, expressão gênica de marcadores moleculares do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial: (biogênese, mitofagia, fusão e fissão & motilidade);
2. Avaliar o efeito reparador das CTMs-MO nas CGMs condicionadas aos meios de hiperglicose e peróxido de hidrogênio: concentração de peróxido de hidrogênio mitocondrial e viabilidade/morte celular;
3. Avaliar o impacto da administração das CTMs nos parâmetros renais, funcionais e metabólicos dos animais BTBRob/ob: ganho de peso e glicemia capilar de jejum, morfologia glomerular, expansão mesangial, manutenção dos podócitos, proteinúria/creatinina (UACR), ativação da morte celular via caspase 3 nos

tecido renal, expressão gênica dos marcadores moleculares do “Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial” (biogênese, mitofagia, fusão, fissão e motilidade) do córtex renal.

2 MÉTODOS

2.1 Local do estudo

O estudo foi realizado no Hospital Israelita Albert Einstein no Centro de Pesquisa Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (CPE – IIEPAE). As intervenções *in vivo* e coletas das amostras teciduais foram realizadas no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC), certificado pela Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) – o qual segue os padrões internacionais de qualidade para quarentena e cuidados animais. Existe 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 em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein sob número 3129-17 protocolado no Sistema Gerenciador de Projeto de Pesquisa (SGPP) e seguiu a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, bem como as normas estabelecidas pelo CETEC do Hospital Israelita Albert Einstein. Amostras dos animais como repositório são provenientes de projetos também aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA), sob os números 2704-16 (animais controle) e 3092-17 (animais tratados com CTMs-MO e os animais doadores de medula para coleta de CTMs).

2.3 Células experimentais

CGMs imortalizadas de camundongos foram adquiridas da *The American Type of Culture Collection* [SV40 MES 13 (ATCC® CRL-1927™)], pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Mirian Aparecida Boim, do Departamento de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Uma parcela dessas CGMs foi gentilmente doada ao nosso grupo, em passagem 30. Em nosso laboratório, as CGMs

foram mantidas em meio de cultura DMEM/F12 1:1 (Ham) (Gibco – Life Technologies, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 5000U/L de Penicilina (Invitrogen) e 2,438 g/L de NaHCO₃. As células foram mantidas em incubadora a 37°C, 95% O₂ e 5% de CO₂. Para os experimentos, utilizamos as CGMs entre passagem 30 e 50.

Células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO), obtidas da medula óssea femoral e tibial de camundongos machos, de 6 a 8 semanas de idade, da linhagem Rosa26/mTmG (Jackson Laboratories, JAX). O procedimento cirúrgico para retirada do material ósseo/medular é realizado no CETEC, no qual os animais são anestesiados previamente via inalação de Isoflurano (Attane) seguida de eutanásia por deslocamento cervical. As células medulares obtidas foram cultivadas *in vitro*, em meio DMEM/F12 (Ham)1:1 (Gibco, USA) suplementado em 20% com SFB (Cultilab) e Penicilina & Estreptomicina (1%) (Invitrogen). As CTMs-MO foram caracterizadas, tradicionalmente, pelo fenótipo tipo-fibroblasto, capacidade de aderência ao plástico, capacidade de multidiferenciação, e da imunofenotipagem por citometria de fluxo.⁽⁶⁴⁾ Referente à expressão dos epítomos, é definido como padrão para CTMs: CD 105⁺, CD 90⁺ e CD 73⁺; CD 45⁻, CD 34⁻, CD 14⁻ ou CD 11b⁻, CD 79alpha⁻, ou CD 19⁻ e HLA-DR.⁽¹²⁴⁾ No entanto, é essencial ressaltar que existem diferenças entre a expressão dos epítomos quando são comparadas populações de CTMs obtidas de diferentes fontes (i.e. tecido adiposo, medula óssea e etc.) e também de animais de linhagens diferentes.⁽¹²⁶⁾ Em nosso caso específico, existe uma lacuna na literatura referente à descrição de CTMs obtidas de camundongos com *background* genético CD-1, como é o caso do nosso animal Rosa26/mTmG. Usamos os marcadores anticamundongo CD 29, CD 31 CD 34, CD 44, CD 45, CD 90, CD 105 e SCA-1 associados ao fluoróforo *fluorescein isothiocyanate* (FITC) (eBioscience, Thermo Fisher) para a imunofenotipagem das CTMs em passagem 8-12.

CD 29: integrina β1 (# 11-0291-82)

CD 31: adesão celular endotelial plaquetária (# 11-0311-82)

CD 34: fosfoglicoproteína; marcador de célula-tronco/progenitora hematopoiética (# 11-0341-82)

CD 44: receptor de hialuronato e osteopontina (# 11-0441-82)

CD 45: glicoproteína de células linfo-hematopoiéticas (# 11-0451-82)

CD 90: antígeno de célula timocitária (thy-1; # 11-0900-81)

CD 105: endoglina (# MA5-17945)

Sca1 (Ly-6A/E): marcador de célula-tronco/progenitora mesenquimal e hematopoiética (# 11-5981-82)

Referente à diferenciação *in vitro* das CTMs-MO, realizamos o procedimento para obtenção das linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, através da indução pelos reagentes específicos em meio de cultura e, em seguida, coloração pelos marcadores *alcian blue* – matriz hialina, *oil red* – depósitos de lipídios e *alizarin red* – cristais de cálcio. Detalhes dos reagentes de diferenciação: para adipogênica, as células foram plaqueadas em meio de cultura com 10% de SFB contendo 1µM dexametasona, 0,5 µM 1-metil-3-isobutillxantine, 10µg/mL insulina, e 100µM indometacina (*Sigma-Aldrich*), por 2 semanas; para osteogênica, as células foram plaqueadas em meio de cultura com 10% de SFB contendo 10⁻⁷ M dexametasona, 0,2mM ácido ascórbico e 10mM β-glicerol-fosfato (*Sigma-Aldrich*), por 4 semanas;⁽¹⁵²⁾ para condrogênica, as células foram plaqueadas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB contendo insulina a 6,25µg/mL, ácido ascórbico a 50µg/mL e TGF-beta a 10ng/mL, por 3 semanas.

2.4 Meios de cultura e condicionamento

Para o devido condicionamento das CGMs, usamos os seguintes meios de cultura:

- a) Expansão e purificação das CTMs-MO – Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, *Gibco*) suplementado em 20% com SFB;
- b) Expansão das CGMs – Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, *Gibco*) 5% SFB;
- c) Normoglicose – DMEM (*Gibco*) 0,5% SFB, suplementado com 5,6 mM/L de glicose 50% (1g/L);
- d) Hiperglicose – DMEM (*Gibco*) 0,5% SFB, suplementado com 30 mM/L de glicose 50% (5,4g/L);
- e) Controle de osmolaridade – DMEM (*Gibco*) 0,5% SFB, suplementado com 24,4mM/L de Manitol 20% (5,46g/L) e 5,6mM/L (1g/L) de glicose 50%;

- f) Normoglicose + Peróxido de hidrogênio – DMEM (*Gibco*) 0,5% SFB, suplementado com 5,6mM/L de glicose 50% (1g/L) e 100μmol/L de H₂O₂ a 0,3%;
- g) Hiperglicose + Peróxido de hidrogênio – DMEM (*Gibco*) 0,5% SFB, suplementado com 30mM/L de glicose (5,4g/L) e 100μmol/L de H₂O₂ a 0,3%.

Escolhemos o manitol como controle de osmolaridade pela larga experiência de uso na literatura da área relacionada ao estudo da hiperglicemia do DM. Já bem descrito, o manitol é metabolicamente inerte em humanos, servindo como um diurético osmótico (Mannitol Identification. DrugBank¹). É importante ter um controle que mimetiza a alta osmolaridade dos condicionamentos de hiperconcentração de glicose, para que possamos separar os efeitos osmóticos dos efeitos inerentes da glicose em si. É necessário considerar que efeitos osmóticos existem, o que corrobora as evidências da prática clínica. No entanto, pelo delineamento de nossa hipótese e dos mecanismos usados na base teórica, esperamos que os efeitos deletérios da alta concentração de glicose sejam superiores aos efeitos estressores da hiperosmolaridade de um composto metabolicamente inerte. Por sua vez, o meio Normoglicose + H₂O₂ é o controle do efeito isolado do H₂O₂, a fim de ser comparado ao meio Hiperglicose + H₂O₂ e podermos identificar as diferenças em relação ao efeito sinérgico de ambos os fatores associados.

2.5 Grupos e delineamento

Tendo descritos os meios de condicionamento, separamos as CGMs em 5 grupos distintos, visando comparar os efeitos da hiperglicose por si só, do H₂O₂ isoladamente e, por fim, da junção sinérgica de ambos. Os demais grupos são controles de osmolaridade e o controle de normalidade:

- NG: CGMs + Meio Normoglicose (5,6mM/L glicose);
- HG: CGMs + Meio Hiperglicose (30mM/L glicose);
- MN: CGMs + Meio Controle Osmolaridade (24,4mM/L manitol + 5,6mM/L glicose);

¹ <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00742>

- NG + H₂O₂: CGMs + Meio Normoglicose + Peróxido de Hidrogênio (5,6mM/L glicose + 100μmol/L H₂O₂);
- HG + H₂O₂: CGMs + Meio Hiperglicose + Peróxido de Hidrogênio (30mM/L glicose + 100μmol/L H₂O₂).

As CGMs são mantidas nos respectivos meios de condicionamento por 6 e 72 horas (*timepoints*). Dessa forma visamos avaliar os efeitos em curto prazo de condicionamento (6 horas) comparados aos efeitos de condicionamento mais prolongado (72 horas), com ênfase na observação e investigação dos efeitos da presença acumulada do radical livre H₂O₂ (grupo NG H₂O₂) e também da sua sinergia com a hiperconcentração de glicose (grupo HG H₂O₂). Os meios de cultura são trocados a cada 48 horas, devido a degradação do H₂O₂ em DMEM (Figura 15).

Figura 15. Linhas do tempo das células glomerulares mesangiais condicionadas por 6 horas (A) e 72 horas (B)

2.6 Cocultura direta: terapia celular com células-tronco mesenquimais da medula óssea

Células-tronco mesenquimais da medula óssea e CGMs são cultivadas simultaneamente na mesma superfície de placa (proporção inicial de 1:5, respectivamente). Mantemos as células em coabitação em meio DMEM 0,5% de SFB suplementado com os respectivos tratamentos já descritos (NG, HG, MN, NG H₂O₂ e

HG H₂O₂). A cocultura foi mantida por 24 horas, após passadas 48 horas de tratamento no grupo tardio (72 horas, Figura 16.A) e ao final do grupo precoce (6 horas, Figura 16.B).

Figura 16. Linhas do tempo das células glomerulares mesangiais condicionadas por 72 horas (A) e 6 horas (B) em cocultura com células-tronco mesenquimais da medula óssea

2.6.1 Grupos da terapia celular

Unindo as CGMs de cada grupo com a respectiva cocultura da terapia com CTMs-MO, teremos mais 5 grupos de avaliação:

- CTMs-MO mTmG + CGMs NG
- CTMs-MO mTmG + CGMs HG
- CTMs-MO mTmG + CGMs MN
- CTMs-MO mTmG + CGMs NG H₂O₂
- CTMs-MO mTmG + CGMs HG H₂O₂

Esse procedimento mimetiza uma interação celular mais próxima do esperado que, além das interações parácrinas e vesículas extracelulares, permite o contato direto entre as populações e dá as condições necessárias para a formação dos nanotubos de transferência de material intercelular (com destaque para a mitocôndria;

Figura 17). A distinção entre as CGMs e as CTMs-MO mTmG é realizada através de citometria de fluxo (*Attune Acoustic Focusing Cytometer, ThermoFisher*), sendo possível identificar as CTMs pela expressão constitutiva de proteína vermelha fluorescente (RFP – *red fluorescent protein*), além da diferença de tamanho bem evidente. Nos ensaios além da citometria, isolamos as CGMs por *sorting* (*MoFlo Astrios EQ, Beckman Coulter*). Essa abordagem foi usada, por exemplo, para extrair RNA das CGMs sem a contaminação de CTMs.

Fonte: Adaptado de Kaessmeyer S, Bhoola K, Baltic S, Thompson P, Plendl J. Lung cancer neovascularisation: cellular and molecular interaction between endothelial and lung cancer cells. *Immunobiology*. 2014;219(4):308–14. Fig. 1. Experimental design of direct co-culture method; p. 310.⁽¹⁵³⁾

Figura 17. Esquema demonstrativo da dinâmica de contato entre células glomerulares mesangiais e células-tronco mesenquimais da medula óssea em cocultura direta

2.7 Avaliações *in vitro*

As CGMs foram avaliadas de maneira a compreendermos melhor os efeitos do estresse oxidativo causado pela hiperglicose, avaliando aspectos funcionais basais das células: metabolismo de substratos, migração em cultura, morte celular na população, além de observar aspectos referentes à morfologia e ao padrão de proliferação em cultura. As avaliações foram feitas após os respectivos condicionamentos (6 e 72 horas) com os meios de cultura (NG, HG, MN, NG H₂O₂ e HG H₂O₂) e, nos casos aplicados, após a cocultura da terapia celular.

2.7.1 Metabolismo celular – densidade ótica por MTT

O ensaio visa avaliar a capacidade das CGMs em metabolizar reagentes, dando também uma medida de viabilidade celular na população em teste. São quantificadas as células ativas metabolicamente de forma colorimétrica, através da

transformação do reagente 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide MTT (amarelo) em formazan (precipitado roxo), pela enzima redutase celular. A atividade celular é diretamente proporcional à intensidade de sinal colorimétrico obtido pela acumulação do precipitado. Ao final, a absorbância resultante é lida em espectrofotômetro, 540-570 nm de comprimento de onda.

2.7.2 Morte celular – Anexina V e Iodeto de Propídeo/DAPI

Quantificação (%) das células em estágio inicial ou já avançado de morte celular através da coleta de $0,1-0,5 \times 10^6$ CGMs, seguida de ressuspensão em 300µL de *Annexin Binding Buffer* (1x). Adicionam-se 2µL de *Annexin V – FITC* (anticorpo marcador de fosfatidilserina exposta na membrana celular conjugado a fluorocromo FITC) e 2µL de iodeto de propídeo ou DAPI (marcadores nucleares, identificando permeabilização de membrana). Finalmente, incuba-se por 15 minutos em temperatura ambiente, no escuro. A partir daí, é feita a detecção das porcentagens de células marcadas por citometria de fluxo (*Attune*).⁽¹⁵⁴⁾

2.7.3 Migração – ensaio da ferida

Atingida a confluência de 90-100% da placa de cultura (CGMs), cria-se uma faixa de espaço em meio às células aderidas através do arrasto de ponteira de pipeta (200µL). Dessa forma, cria-se um vão de área destituída de células, o qual as células remanescentes de cada borda oposta buscarão ocupar pela migração, fechando a ferida. A área ocupada (migrada) pelas células é quantificada e comparada à área inicial da ferida. Assim, chega-se a porcentagem de ocupação de espaço em determinado período de tempo, o qual será de 24 horas. Os ensaios serão fotografados em tempos 0h (logo após a ferida) e 24 horas após a ferida.⁽¹⁵⁵⁾

2.8 Avaliações mitocondriais *in vitro*

2.8.1 Radical oxidante mitocôndria-específico – MitoPY1

Quantificação específica de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) intra-mitocondrial através de marcador fluorescente por citometria de fluxo (*Attune*). O marcador MitoPY1, ao interagir com o radical H_2O_2 , sofre mudanças em sua conformação, apresentando-se então na forma oxidada: MitoPY1ox. Esse MitoPY1ox emite fluorescência, que é então detectada e quantificada (510nm – absorção e 528nm – emissão). As amostras celulares são analisadas e comparadas entre si em relação à porcentagem de eventos positivos do marcador fluorocromo. Ao fim, essas porcentagens de marcação positiva para o fluorocromo são associadas às quantidades de H_2O_2 intramitocondrial.⁽¹⁵⁶⁾

2.8.2 Potencial de membrana mitocondrial

Como medida avaliativa da função mitocondrial, usamos o kit *MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (ThermoFisher)* para identificar a quantidade de organelas ainda ativas nas células dos modelos experimentais. O JC-1 é um marcador que se acumula e oligomeriza especificamente na mitocôndria polarizada (viável). Em organelas funcionais, com a polarização adequada mantida, a emissão de fluorescência do reagente JC-1 muda para espectro vermelho (590nm), devido à agregação dos conjugados intra-mitocondriais. Já em ambientes celulares com essas organelas disfuncionais, sem a devida polarização da membrana mitocondrial, a emissão fluorescente é mantida no espectro verde (530nm), devido à persistência da difusão do fluorocromo, que não é “capturado” e condensado intra-mitocondrial. Os monômeros de JC-1 (mitocôndria despolarizada) emitem fluorescência em verde difuso (530nm) e os agregados de JC-1 (mitocôndria polarizada) emitem fluorescência em laranja-vermelho (590nm).⁽¹⁵⁷⁾

Após a suspensão da cultura de CGMs ($1 \times 10^6/\text{mL}$) e a devida marcação com o reagente JC-1 (200 μM ; 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$; 30 minutos a 37°C), analisamos, via citometria de fluxo, a média de intensidade de fluorescência (MIF) para cada grupo celular (NG, HG, MN, NG H_2O_2 e HG H_2O_2). Ao final, a razão de emissão (MIF)

vermelho/verde é o indicativo resultante acerca da polarização da membrana mitocondrial. O protocolo de marcação segue as diretrizes do fabricante: *JC-1 and JC-9 Mitochondrial Potential Sensors, Invitrogen*.

2.8.3 Expressão gênica dos componentes do programa de qualidade mitocondrial

Cada um dos genes do quadro 3 é usado como marcador de atividade da via molecular referente a um componente do grupo de mecanismos do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial. A expressão gênica foi avaliada por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) quantitativo em tempo real. Em linhas gerais, o procedimento se inicia pelo isolamento das amostras de CGMs, seguido de acondicionamento em solução RNALATER (Sigma-Aldrich, Merck, Alemanha) e congelamento a -80°C , evitando qualquer tipo de degradação até o seu uso. Então, fazemos a extração de RNA e a purificação pelas sucessivas lavagens em colunas do kit RNeasy mini kit (QIAGEN). O RNA obtido é quantificado no Nanodrop (ThermoFisher) e usado – em concentração $10\text{ng}/\mu\text{L}$ – para síntese do cDNA através da transcrição reversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems). O cDNA então é usado na realização do PCR quantitativo em tempo real (qPCR) (TaqMan™ Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems; QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystems). Seguindo as conclusões da padronização de gene *housekeeping* já feitas previamente pelo nosso grupo de pesquisa, usamos o beta-glucuronidase (GUSB, Mm01197698_m1 - Taqman Endogenous Control – ThermoFisher) para controle endógeno. Os demais genes, componentes do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial, estão relacionados abaixo:

Quadro 3. Processos componentes do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial e os respectivos marcadores usados para avaliação da expressão de RNA via q RT-PCR

Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial	Expressão de RNA (qRT PCR)
Motilidade	Dynein, Kinesin, Miro 1 & 2
Biogênese	PGC-1, TFAM
Mitofagia	PINK1, PARKIN
Fusão	Mitofusin 1 & 2, OPA1
Fissão	DRP-1, Fis1

- MFN1: Mm00612599_m1 – Mfn1 – Taqman
- MFN2: Mm00500120_m1 – Mfn2 - Taqman
- OPA1: Mm01349707_g1 – Opa1 - Taqman
- DRP1: Mm01342903_m1 – Dnm1l - Taqman
- FIS1: Mm00481580_m1 – Fis1 - Taqman
- DYNEIN: Mm01244889_m1 – Dnaic2 – Taqman
- MIRO1: Mm01304158_m1 – Rhot1 - Taqman
- MIRO2: Mm00524478_m1 – Rhot2 - Taqman
- KINESIN: Mm00492936_m1 – Klc1 - Taqman
- PARKIN: Mm01323528_m1 – Park2 - Taqman
- PGC1: Mm01208835_m1 - Ppargc1a - Taqman
- TFAM: Mm00447485_m1 – Tfam - Taqman
- PINK: Mm00550827_m1 – Pink1 - Taqman

2.9 Avaliação *in vivo*: animais experimentais

De modo a compreender de maneira mais profunda a patofisiologia da DRD, avaliamos as alterações renais causadas pela hiperglicemia do DMT2 usando modelo animal de comprovada semelhança com as alterações da DRD humana. Assim, podemos vislumbrar aplicações para o cenário clínico, devido à aplicabilidade dos achados nesse modelo para o uso em humanos. Investigamos alterações metabólicas como o ganho de peso e a glicemia de jejum ao longo do tempo, além de avaliações específicas do tecido renal a cerca das principais alterações como a expansão mesangial, manutenção dos podócitos e a proteinúria. Além disso, investigamos a modulação dos marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial.

Os camundongos BTBR.Cg-*Lep^{ob}*/WiscJ (*black and tan, obese, tufted*; JAX stock #004824) são homozigotos para a mutação *knockout* do gene da leptina (*Lep^{ob}*), sendo comumente identificados como BTBR^{*ob/ob*}, conforme a empresa da qual foram adquiridos: *The Jackson Laboratory*². Esta mutação está relacionada ao desenvolvimento da obesidade, uma vez que estes animais se tornam hiperfágicos. Além da obesidade, os camundongos BTBR^{*ob/ob*} apresentam hiperglicemia, intolerância

² <https://www.jax.org/strain/004824>

à glicose, hiperinsulinismo, hipertrigliceridemia, cicatrização comprometida e aumento da produção dos hormônios da hipófise e supra-renais. A obesidade é caracterizada por um aumento no número e no tamanho dos adipócitos.⁽¹¹⁷⁾ Embora a hiperfagia contribua para a obesidade, os homozigotos apresentam excesso de peso e acumulam gordura mesmo quando restritos a uma dieta suficiente para a manutenção do peso normal em camundongos magros. A hiperinsulinemia não se desenvolve até que ocorra o aumento do peso corporal e é provavelmente o resultado desse distúrbio. Os camundongos BTBR^{ob/ob} desenvolvem DM com seis semanas (machos) e oito semanas (fêmeas). A hiperglicemia é grave e progressiva, com glicemia de jejum de 400mg/dl em 10 semanas.^(117,158) Além disso, os camundongos BTBR^{ob/ob} desenvolvem proteinúria de forma tempo-dependente, detectada por volta da 8ª semana de vida nos animais machos. Desta forma, esses animais desenvolvem doença renal diabética similar ao que acontece em seres humanos, incluindo a expansão mesangial e a podocitúria.⁽¹¹⁷⁾ Representam, portanto, o modelo pré-clínico mais robusto de doença renal diabética, no qual várias estratégias terapêuticas podem ser avaliadas.

- **BTBR selvagem ou *wild type* (WT):** modelo de camundongos preto e marrom, não braquiúrico.

- **BTBR^{ob/ob}:** BTBR (preto e marrom, braquiúrico) mutante deficiente em leptina, obeso e hiperglicêmico.

- **ROSA^{mT/mG} ou Gt(ROSA)^{26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo:}** branco, com membrana celular marcada em 2 cores fluorescentes associadas a alelo *Cre-reporter*. Antes da recombinação *Cre*, todas as membranas são vermelhas fluorescentes (*red fluorescence protein – tdTomato*). Após a recombinação nas células-alvo marcadas, as membranas celulares e tecidos passarão a expressar na membrana a fluorescência verde (*green fluorescence protein*). Animais foram adquiridos da empresa *The Jackson Laboratory*³ e mantidos no biotério (CETEC).

2.9.1 Aquisição e manutenção dos animais em biotério

Baseado no princípio bioético dos quatro "Rs" da pesquisa experimental em animais (Redução, Reposição, Refinamento e Responsabilidade), foram utilizados 18 animais machos, divididos em:

³ <https://www.jax.org/strain/007576>

- Rosa26/mTmG - idade de 6-8 semanas (n=6);
- BTBR^{ob/ob} controle - idade de 8 semanas (n=6)
- BTBR^{ob/ob} + CTMs-MO mTmG - idade de 18-20 semanas (n=6);

Os animais controle, descritos abaixo, foram parte de projeto prévio. As amostras já estavam coletadas e os referidos animais já eutanasiados. Assim, são repositório de nosso grupo de pesquisa (Figura 18):

- BTBR WT - idade de 9-11 semanas (n=6);
- BTBR WT - idade de 14-15 semanas (n=6);
- BTBR WT - idade de 18-20 semanas (n=6);
- BTBR^{ob/ob} controle - idade de 8-10 semanas (n=6);
- BTBR^{ob/ob} controle - idade de 14-15 semanas (n=6);
- BTBR^{ob/ob} controle - idade de 18-20 semanas (n=6);

Os animais BTBR^{ob/ob} são identificados pelo fenótipo e confirmados por genotipagem. Para a realização da genotipagem, foi padronizada a coleta de fragmento da orelha ou da cauda do animal. O DNA foi extraído por um processo de lise utilizando solução 25mM NaOH/0,2Mm-*Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA), por um período de 1 hora em incubação a 98°C, em agitação a 300rpm. Em seguida o processo de lise foi interrompido pela adição de solução 40mM Tris-HCl pH 5,5, e as amostras centrifugadas a 10.000rpm -4°C por 10 minutos (Centrifuge 5430 R – Eppendorf®). Após extração, as amostras foram preparadas para reação de PCR com MasterMix (ThermoScientific®), primers e água conforme descrito abaixo:

Figura 18. Linha do tempo dos 4 grupos de animais BTBR^{ob/ob} e as respectivas coletas de amostras e medidas. De cada grupo, foram eutanasiados 6 animais para coleta dos rins

Os *primers* utilizados foram (Sigma-Aldrich®):

```

IMR1151   TGTCCAAGATGGACCAGACTC
          ACAGGTTCTACCTGGTCTGAG
IMR1152   ACTGGTCTGAGGCAGGGAGCA
          TGACCAGACTCCGTCCCTCGT

```

Posteriormente realizou-se a digestão com a enzima de restrição Ddel (Promega®-USA) por 1 hora, a 37°C. DNA-ladder de 50bp (ThermoFisher®) foi usado como padrão de peso molecular. A imagem do gel foi obtida através do fotodocumentador ImageQuant 300® (GE Healthcare Amersham Place-UK). A genotipagem de cada animal foi determinada pelo tamanho das bandas expressas e visíveis no gel: bandas de 55bp e 100bp representam o animal mutante (BTBR^{ob/ob}), bandas de 55bp, 100bp e 155bp representam o animal heterozigoto e apenas a banda de 155bp representa o animal BTBR WT (Figura 19).

Figura 19. Identificação dos animais mutantes (m) BTBR^{ob/ob} por genotipagem e presença da banda de 100pb & 55pb (seta vermelha)

2.10 Administração de células-tronco mesenquimais da medula óssea

Células-tronco mesenquimais da medula óssea mTmG (~1,0x10⁶), após rápido descongelamento e breve checagem de viabilidade por azul de tripan (usamos quando ≥90%), foram injetadas via intraperitoneal nos camundongos machos BTBR^{ob/ob} (n=6). Foram feitas 2 doses de injeção, com intervalo de 2 semanas entre elas (nas idades de 8 e 10 semanas). O peso dos animais foi avaliado semanalmente, enquanto que as coletas de amostras de urina e plasma, juntamente com a medida da glicemia, foram feitas nas idades de 10, 14 e 18 semanas. A eutanásia foi feita no período de 18-20 semanas de vida do animal (Figura 20).

Figura 20. Linha do tempo do grupo de animais BTBR^{ob/ob} que recebeu terapia com células-tronco mesenquimais da medula óssea mTmG e as respectivas coletas de amostras e medidas ao longo do tempo. Foram eutanasiados 6 animais para coleta dos rins

2.11 Avaliações funcionais: peso e coleta da urina

Os animais foram pesados duas vezes por semana para acompanharmos a progressão do ganho de peso. Já a urina, foi coletada através de gaiola metabólica, na qual é feita a separação da urina e das fezes em recipientes distintos. Nessa gaiola, os animais BTBR^{ob/ob} foram mantidos – com acesso livre à água e à comida – por até 6 horas, enquanto que os animais BTBR WT, por até 24 horas para a coleta de volume urinário suficiente. Após o procedimento, os animais foram hidratados por infusão de solução salina para evitar complicações de desidratação.

2.12 Avaliação da proteinúria – determinação da perda de função glomerular

Quantificação de albumina excretada na urina através do método de ELISA (Mouse Albumin ELISA Kit, Abcam; ab207620), posteriormente corrigida pela creatinina excretada (fator de diurese), obtida pelo analisador bioquímico automático *Cobas Mira Plus*[®] (Roche, Suíça). Essa correção se faz necessária devido às grandes diferenças entre os níveis de volume urinados dos animais BTBR^{ob/ob} em comparação ao grupo WT.

2.13 Glicemia basal

Os animais BTBR WT e BTBR^{ob/ob} foram submetidos ao teste de glicemia basal após um período de jejum de 6 horas. Coletamos uma gota de sangue da cauda para análise da concentração basal de glicose sanguínea seca no equipamento *Accu-Check Advantage Blood Glucose Monitor*[®] (Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN).

2.14 Avaliações morfológicas: preparo das lâminas

Em seguida à eutanásia, porção de tecido renal dos camundongos foi imediatamente fixada em formalina, a 10%, por pelo menos 24 horas. Posteriormente, 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 3-4µm em micrótomo e fixados em lâminas de microscopia silanizadas.

2.14.1 Hematoxilina e eosina: histologia renal

Foi realizada coloração com hematoxilina e eosina (HE) para análise de morfometria. Após a desparafinização, foi iniciado o processo de coloração, em que as lâminas permaneceram por 2 minutos em solução de *hematoxilina de Harris*, lavadas em água corrente por 2 minutos e, em seguida, colocadas em solução de eosina por 1 minuto. Depois de corados os cortes foram desidratados e montados em meio permanente com o uso de resina líquida (*Bálsamo do Canadá*).

2.14.2 Ácido Periódico de Schiff: expansão mesangial

A coloração com ácido periódico de Schiff (PAS – *Periodic acid-Schiff*) foi realizada para avaliação da expansão mesangial. Este corante identifica os glicosaminoglicanos presentes na matriz mesangial com uma coloração rósea mais

intensa do que em outras áreas. Para o procedimento de coloração os cortes desparafinizados foram tratados com ácido periódico por 10 minutos e lavados com água corrente durante 1 minuto. Em seguida foram tratados com reagente de Schiff por 7 minutos. Depois de corados, os cortes foram lavados em água corrente e, em seguida, contra corados com hematoxilina por 30 segundos. A quantificação da expansão mesangial é feita por *software CellSens (Olympus)*.

2.14.3 Expressão gênica: componentes do Programa de Qualidade Mitocondrial

Cada um dos genes do quadro 3 é usado como marcador de atividade da via molecular referente a um componente do grupo de mecanismos do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real. Em linhas gerais, o procedimento se inicia pelo isolamento das amostras de tecido renal, seguido de acondicionamento em solução RNALATER (Sigma-Aldrich, Merck, Alemanha) e congelamento a -80°C, evitando qualquer tipo de degradação até o seu uso. Então, fazemos a extração de RNA e a purificação pelas sucessivas lavagens em colunas do kit RNeasy mini kit (QIAGEN). O RNA obtido é quantificado no Nanodrop (ThermoFisher) e usado – em concentração 10ng/μL - para síntese do cDNA através da transcrição reversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems). O cDNA então é usado na realização do PCR quantitativo em tempo real (RT qPCR) (TaqMan™ Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems; QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystems). Como gene *housekeeping* para controle endógeno, usamos beta-glucuronidase (GUSB, Mm01197698_m1 - Taqman Endogenous Control - ThermoFisher).⁽¹⁵⁹⁾

2.14.4 Expressão proteica de via de apoptose: caspase 3

Avaliação da expressão proteica da Caspase-3 total e da Caspase-3 clivada. Para isso, utilizamos anticorpo primário anticaspase 3 (#9662 – *Cell Signaling Technology*) e anticaspase 3 clivada (#9661 – *Cell Signaling Technology*) em análise imunohistoquímica dos tecidos renais. Para revelação, usamos *kit DAKO* (#GV800)

com anticorpo secundário *HRP-conjugated goat-anti-rabbit antibody* + revelação por cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB + *substrate buffer*). A coloração marrom obtida está sendo quantificada por *software CellSens (Olympus)*.⁽¹⁶⁰⁾

2.14.5 Expressão proteica de marcador podocitário: WT-1 nuclear

A presença do marcador podocitário WT-1 intranuclear foi avaliada pela técnica de imunoperoxidase, utilizando o polímero conjugado com peroxidase REVEAL-HRP® (Spring Biociences). Cortes de tecido renal (4-5 µm de espessura) previamente fixados em formalina 10% tamponada (formaldeído 3,7-4,0% em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4) e inclusos em parafina foram submetidos à desparafinização (3 x 9 minutos em xilol, 2 x 5 minutos em etanol absoluto), reidratação (2 x 3 minutos em etanol 96%, 1 x 3 minutos em etanol 70% e 2 x 5 minutos em água destilada) e à recuperação de antígenos (15 minutos em forno de micro-ondas na potência máxima, em tampão citrato 10mM pH 6,0). Após resfriarem até a temperatura ambiente, os tecidos foram incubados sucessivamente com as soluções para bloqueio da peroxidase endógena (3% peróxido de hidrogênio, 70% metanol), e de ligações inespecíficas (1% *Bovine Serum Albumin* [BSA]) (30 minutos cada, a temperatura ambiente). Em seguida, o material foi incubado com o anticorpo policlonal de coelho anti-WT-1 (sc-192, Santa Cruz Biotechnologies) na concentração de 1:50 (câmara úmida, a 4°C por 12-18 horas). Ao final desse período, os tecidos foram lavados para retirar o anticorpo não ligado, e incubados com Reveal® HRP Conjugate (câmara úmida, 30 minutos a temperatura ambiente). Para a revelação, o tecido foi incubado com solução substrato da peroxidase (0,1% H₂O₂ em tampão fosfato pH 7,4) contendo o cromógeno 3, DAB, por 5 minutos, quando as células positivas apresentaram núcleos de cor marrom. As lâminas foram então contra-coradas com hemalumbre de Mayer, para definir a estrutura tecidual, e montadas com meio permanente Permount (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para a quantificação do WT-1 foram contados os núcleos positivos de 25 glomérulos/caso, sob o aumento microscópico de 1000X. A média foi expressa em números de núcleos positivos por glomérulo.⁽¹⁶¹⁾

2.15 Rastreamento das células-tronco mesenquimais da medula óssea mTmG: imagens *in vivo* e *ex vivo*

Os animais BTBR^{ob/ob}, após as intervenções de injeção de CTMs-MO e o acompanhamento até 18-20 semanas de vida, foram avaliados *in vivo* quanto a evidência de células positivas para fluorescência *tdTomato* (excitação e emissão máximas de 554nm e 581nm, respectivamente) em seus tecidos, como forma de rastrear a manutenção e a localização das células injetadas. Para isso, nós usamos o filtro de RFP (excitação 545/30 e emissão 598/55) do equipamento IVIS[®] Lumina LT Series III e os sinais analisados em unidades absolutas (fótons/s). Para investigação mais aprofundada e como contra-prova, foram feitas imagens *ex vivo* desses mesmos animais para os órgãos: rins, pulmões, coração, pâncreas, baço, fígado, gordura ventral. As imagens foram feitas nos seguintes parâmetros: *min*2.50e9, *max*3.65e10, *binning* 2, *fov* 12,5, *Fstop*= 4 e tempo de exposição =0,5s.⁽¹⁶²⁾

2.16 Avaliação dos resultados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ou erro padrão da média (nesse caso, indicado na figura). A análise estatística foi feita, primeiro, por teste de normalidade Shapiro-Wilk (*Normality Tests*, GraphPad Prism). Em seguida, caso haja normalidade na distribuição das amostras, foi feita ANOVA (*Analysis Of Variance*) *one way* para análises de uma variável, seguida de pós-teste de *Tukey* ou pós-teste de *Brown-Forsythe and Welch* (quando havia muita variabilidade). Em caso de medidas repetidas ao longo do tempo, foi feita ANOVA *two way*/teste de modelo misto (quando havia diferenças no número de observações em medidas repetidas), sendo feita a correção de Geisser Greenhouse's épsilon para não esfericidade quando aplicável. Nesse caso, para múltiplas comparações, foi feito o pós-teste de Holm-Sidak e, quando as diferenças basais apresentavam muita variabilidade, foi feito o pós-teste de Fisher LSD sem correção, para ganhar mais poder estatístico (caso de alguns dados dos animais BTBR^{ob/ob}). Em caso de não normalidade na distribuição das médias amostrais, usamos teste de Kruskal-Wallis ou teste t múltiplo com correção de Holm-Sidak para comparações múltiplas. Avaliações foram feitas usando o *software GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, CA), sendo considerados estatisticamente significantes valores $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização das células-tronco mesenquimais da medula óssea mTmG

Mantivemos as CTMs-MO mTmG em cultura, após passagens iniciais para purificação, a fim de expandir e formar nosso banco de *vials* congelados prontos para utilização nos animais. Procuramos, assim, mimetizar o que é feito na terapia celular em seres humanos. Nessas imagens de microscopia de luz (Figura 21A) vemos as células em confluência em monocamada na placa de cultura, apresentando aspecto semelhante ao fibroblasto e a aderência ao plástico, que são características do tipo mesenquimal. Ainda, vemos na imagem por microscopia de fluorescência (Figura 21B), a expressão de RFP na membrana das CTMs (o que dá a característica *tomato* do “mTomatoG”). Além disso, observamos em cultura a capacidade de autorenovação das células ao longo das passagens, outra evidência para caracterização como CTM.

Aumento de 10x.

Figura 21. Fotomicroscopia de luz (A) e de fluorescência RFP+ (B) de células-tronco mesenquimais da medula óssea mTmG, passagem 8-9, em cultura

Pela avaliação de imunofenotipagem, as CTMs-MO mTmG (em passagem 7-8) cumprem com os requisitos para a definição como célula-tronco mesenquimal através da expressão de marcadores associados à linhagem mesenquimal (CD 29 e SCA1) e a não expressão de marcadores da linhagem hematopoiética (CD34 e CD45) e endotelial (CD 31). Esse resultado (Figura 22) indica a purificação do tipo CTM em cultura e o sucesso do protocolo na obtenção das CTMs provenientes de MO. Vale ressaltar a diferença de expressão de alguns marcadores

entre os tipos de *backgrounds* genéticos dos camundongos descritos na literatura e a ausência de avaliação do tipo CD-1, que é o camundongo mTmG que usamos para obtenção das CTMs-MO.⁽¹²⁶⁾

Avaliação da expressão dos marcadores de membrana: CD 29, CD 34, CD 44, CD 45, CD 90, SCA-1, CD 31 e CD 105. Valores em porcentagem indicam a quantidade de células-tronco mesenquimais da medula óssea positiva.

Figura 22. Imunofenotipagem, por citometria de fluxo, das células-tronco mesenquimais da medula óssea em passagem 7-8

Como pré-requisito para caracterização fenotípica e funcional, as CTMs-MO precisam ser capazes de se diferenciar em diferentes linhagens celulares. Assim, confirmando a multipotência já descrita na literatura. Através de indução *in vitro* por condicionamento em meios suplementados, avaliamos a diferenciação das CTMs-MO em 3 tipos: osteogênico (Figura 23A), condrogênico (Figura 23B) e adipogênico (Figura 23C). As CTMs-MO mTmG foram capazes de se diferenciar nos tipos mencionados, sendo possível verificar a presença de depósito de cálcio (Figura 23A), depósitos de matriz hialina (Figura 23B) e depósitos lipídicos (Figura 23C). Esse resultado atesta a característica de CTM da nossa população de células.

(a) osteogênica, destaque para os depósitos de cálcio (vermelho/marrom); (b) condrogênica, destaque para matriz de glicosaminoglicanos (azul); (c) adipogênica, destaque para lipídeos.

Figura 23. Diferenciação das células-tronco mesenquimais da medula óssea após condicionamento nos meios indutores

3.2 Efeitos funcionais da hiperglicose e/ou H_2O_2 nas Células Glomerulares Mesangiais

As CGMs, após 6 horas de condicionamento nos meios contendo peróxido de hidrogênio (NG H_2O_2 e HG H_2O_2), apresentaram alterações no caráter morfológico: redução do citoplasma associada à perda do formato característico similar a fibroblasto. Já no condicionamento por 72 horas, houve alterações morfológicas, similares às descritas acima, nos meios: hiperglicose (HG), normoglicose + peróxido de hidrogênio (NG H_2O_2) e hiperglicose + peróxido de hidrogênio (HG H_2O_2). Nesse cenário, porém, as alterações foram em maior escala de gravidade, também afetando mais células, em comparação com o condicionamento por 6 horas. Importante destacar o alto nível de impacto do normoglicose + peróxido de hidrogênio (NG H_2O_2) por si só, que é agravado no meio sinérgico de hiperglicose + peróxido de hidrogênio (HG H_2O_2 ; Figura 24).

Tempos de 6 e 72 horas. As setas indicam áreas sem células, indicando perda por morte e/ou prejuízo proliferativo, como também alterações morfológicas.

Figura 24. Célula glomerular mesangial condicionada em normoglicose (a) hiperglicose (b), manitol (c) normoglicose H₂O₂ (d) & hiperglicose H₂O₂ (e), respectivamente

Quanto ao número de células, como medida de proliferação, foram contadas em câmara de *Newbauer*, após os condicionamentos com normoglicose (NG), hiperglicose e manitol (MN), nos tempos de 24, 48 e 72 horas (Figura 25). As células viáveis foram selecionadas pelo uso de Azul de Tripan (n=3); $p < 0,05^*$. Apenas o condicionamento com HG, após 72 horas, resultou em efeitos deletérios na proliferação das CGMs de forma significativa ($*p < 0,05 +$ desvio padrão). Com base nesses resultados, esse foi o tempo escolhido para realizar o condicionamento mais prolongado em comparação ao tempo agudo de 6 horas.

Comparação de de CGMs entre diferentes tempos de condicionamento (0, 24, 48 e 72 horas). (B) Comparação de células glomerulares mesangiais entre os diferentes condicionamentos normoglicose, hiperglicose e manitol, após 72 horas ($n \geq 2$; média $\pm$ desvio padrão; $*p < 0,05$; ANOVA one-way convencional com múltiplas comparações corrigidas por teste de Tukey).

Figura 25. Proliferação de células glomerulares mesangiais condicionadas em normoglicose, hiperglicose e manitol

Em relação à capacidade de metabolização de substratos, como medida indireta de viabilidade, não houve evidência de efeito dos condicionamentos de 6 horas nas CGMs ($p > 0,05$). No entanto, após 72 horas, as CGMs dos grupos HG, NG H_2O_2 e HG H_2O_2 tiveram reduzidas suas capacidades de metabolização de substrato ($p < 0,05^*$), em relação ao controle NG (Figura 26).

Comparação entre células glomerulares mesangiais nos condicionamentos (normoglicose (NG), manitol (MN), hiperglicose (HG), normoglicose + H_2O_2 e hiperglicose + H_2O_2) após 6 & 72 horas. Densidade óptica obtida por espectrofotometria ($n=3$; média $\pm$ desvio padrão; $*p < 0,05$; ANOVA two-way, com múltiplas comparações corrigidas por teste Holm-Sidak).

Figura 26. Capacidade de metabolização de substratos pelas células glomerulares mesangiais

Quanto à capacidade migratória, as CGMs foram acompanhadas pelo período de 14 horas depois da “ferida” na monocamada de células. Após 6 horas

de tratamento, não houve diferença significativa ($p>0,05$) na área migrada pelas CGMs na comparação entre os grupos experimentais. O mesmo se repetiu no tratamento por 24 horas (Figura 27). Não foi testado o período de 72 horas devido à incapacidade de adaptação do protocolo à velocidade de multiplicação das CGMs – que fecham a “ferida” após esse período – e da dinâmica de dano do H_2O_2 , que impede a confluência em monocamada e inviabiliza a avaliação.

A migração foi acompanhada por 14 horas. ($n \geq 2$; média $\pm$ desvio padrão; $p > 0,05$; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Tukey).

Figura 27. Área migrada, em um^2 , pelas células glomerulares mesangiais condicionadas por 6 & 72 horas em cada meio experimental (normoglicose (NG), manitol (MN), hiperglicose (HG), normoglicose + H_2O_2 e hiperglicose + H_2O_2)

3.3 Acúmulo de H_2O_2 específico na mitocôndria das Células Glomerulares Mesangiais pela hiperglicose e/ou H_2O_2

O condicionamento por 6 horas com o meio HG H_2O_2 foi suficiente para acumular o radical H_2O_2 de maneira expressiva e específica na mitocôndria das CGMs ($*p < 0,05$). Interessante é notar a diferença significativa ($p < 0,05^*$) entre os grupos NG H_2O_2 e HG H_2O_2 , o que evidencia um efeito prejudicial da sinergia entre HG e H_2O_2 . Já após 72 horas de condicionamento, houve um acúmulo expressivo ($p < 0,05^*$) de radical H_2O_2 específico na mitocôndria das CGMs dos grupos HG, NG H_2O_2 e HG H_2O_2 . O efeito sinérgico e deletério de HG H_2O_2 , assim como foi observado em 6 horas, se manteve e foi ainda mais acentuado em 72 horas (Figura 28).

Figura 28. Avaliação por citometria de fluxo da quantidade (%) de células glomerulares mesangiais, condicionadas por 6 & 72 horas em Normoglicose (NG), Hiperglicose (HG), Manitol (MN), Normoglicose H₂O₂ e Hiperglicose H₂O₂, com acúmulo de H₂O₂ na mitocôndria (FITC+; n=3; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Tukey)

3.4 Aumento da morte celular nas Células Glomerulares Mesangiais pela hiperglicose e/ou H₂O₂

Após 6 horas de condicionamento, apenas os meios contendo H₂O₂ apresentaram aumento significativo (p<0,05) na marcação (FITC+) por anexina-V, em comparação aos grupos NG, HG e MN, indicando um processo inicial de morte celular em andamento. Já para o condicionamento de 72 horas, HG aumentou (p<0,05) a porcentagem de CGMs marcadas por anexina-V (FITC+), em comparação ao controle NG e MN. Por sua vez, a presença de H₂O₂, por si só, causou aumento expressivo na porcentagem de CGMs marcadas por anexina-V (FITC+) em comparação aos outros grupos, inclusive sendo maior que o grupo HG H₂O₂, o qual também foi superior aos grupos NG, MN e HG (p<0,05; Figura 29).

Quantidade de células glomerulares mesangiais (% FITC+) condicionadas por 6 & 72 horas nos meios experimentais Normoglicose (NG), Manitol (MN), Hiperglicose (HG), NG H₂O₂ e HG H₂O₂ (n≥3; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Holm-Sidak).

Figura 29. Avaliação de processo de morte celular indicada por marcação positiva para anexina-V (conjugada a FITC)

Após 6 horas de condicionamento, os grupos NG H₂O₂ e HG H₂O₂ apresentaram aumento (p<0,05) da marcação por anexina-V (FITC+) e iodeto de propídeo (PE+) em comparação ao grupo NG, indicando maior número de células em processo de morte celular (considerando a permeabilização de membrana; Figura 30). Já após 72 horas de condicionamento, houve aumento significativo da porcentagem de células marcadas com anexina-V e iodeto de propídeo (FITC e PE+; p<0,05), já em processo de morte com permeabilização de membrana, no grupo HG, NG H₂O₂ e HG H₂O₂. Esse cenário foi mais severo na atuação do H₂O₂ por si só (NG H₂O₂; p<0,05) e mais ainda quando em sinergia com glicose concentrada (HG H₂O₂; p<0,05).

Quantidade de células glomerulares mesangiais (% FITC+ e PE+) condicionadas por 6 & 72 horas em normoglicose (NG), manitol (MN), hiperglicose (HG), NG H₂O₂ e HG H₂O₂ (n≥3; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Holm-Sidak).

Figura 30. Morte celular com permeabilização de membrana, em marcação positiva para anexina-V (conjugada a FITC) e iodeto de propídeo

3.5 Alteração do potencial de membrana mitocondrial pela hiperglicose e/ou H₂O₂ nas Células Glomerulares Mesangiais

O condicionamento em HG causou aumento significativo (p<0,05) de marcação por JC-1 já em 6 horas, na comparação com o grupo NG, indicando maior polarização da membrana mitocondrial. Esse fato se manteve durante a observação de 72 horas, para o mesmo condicionamento, o que sugere a manutenção ao longo do tempo da maior demanda mitocondrial, refletida como potencial de membrana elevado (Figura 31). Importante ressaltar que o manitol, mesmo sendo o controle de osmolaridade para a hiperglicose, apresentou efeito indutor transitório do potencial de membrana mitocondrial nas CGMs após 6 horas de condicionamento. Por sua vez, os grupos com condicionamento contendo H₂O₂ apresentaram valores menores (p<0,05) em comparação aos demais grupos após 72 horas de condicionamento, denotando uma queda no potencial em comparação intra-grupo com o condicionamento de 6 horas (p<0,05).

Fluorescência PE+ indica mitocôndria polarizada, enquanto FITC+ indica mitocôndria despolarizada. Valores apresentados como % da razão entre células glomerulares mesangiais PE+ e FITC+. CGMs foram condicionadas por 6 & 72 em normoglicose (NG), manitol (MN), hiperglicose (HG), NG H₂O₂ e HG H₂O₂ (n≥3; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Holm-Sidak).

Figura 31. Polarização da membrana mitocondrial

3.6 Efeitos da hiperglicose e/ou H₂O₂ na expressão gênica de marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial nas Células Glomerulares Mesangiais

Em relação à expressão gênica dos marcadores de biogênese e mitofagia, não foi possível evidenciar diferenças significativas (p>0,05) nas avaliações comparativas entre os grupos de CGMs após 6 horas de condicionamento (Figura 32). As médias dos valores CT para o controle endógeno GUSB apresentaram coeficiente de variação de 0,96%. Já na avaliação dos marcadores de fusão e fissão MFN1 e MFN2, é possível evidenciar uma diferença geral entre os grupos, mas não é possível identificar em qual comparação exatamente (análise de múltiplas comparações). As médias dos valores CT para o controle endógeno GUSB apresentaram coeficiente de variação de 1,41%. Por sua vez, para os marcadores de motilidade, existe uma diferença geral entre os grupos para cada marcador mas não é possível identificar em qual comparação específica. As médias dos valores CT para o controle endógeno GUSB apresentaram coeficiente de variação de 1,16%.

CGMs condicionadas por 6 horas em normoglicose (NG), hiperglicose (HG), manitol (MN), NG H₂O₂ e HG H₂O₂. (A) biogênese (PGC-1 & TFAM) e mitofagia (PARKIN & PINK) (n=2; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Holm-Sidak); (B) fusão (MFN1, MFN2, OPA1) e fissão (DRP1 & FIS) (n=2; média ± desvio padrão; *p<0,05; teste de Kruskal-Wallis); (C) motilidade (Kinesin, Dynein, Miro1, Miro2) (n=2; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Holm-Sidak).

Figura 32. Expressão gênica (fold change) de marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial

Após 72 horas de condicionamento nas CGMs, houve redução significativa da expressão gênica dos marcadores de mitofagia (PARKIN e PINK) e biogênese (PGC-1) mitocondriais nas CGMs dos grupos HG e dos grupos com a presença do H₂O₂ (NG H₂O₂ e HG H₂O₂; Figura 33). As médias dos valores CT para o controle endógeno GUSB apresentaram coeficiente de variação de 1,83%. Quanto à expressão gênica dos marcadores de fusão (MFN1, MFN2, OPA1) e fissão (DRP1, FIS) mitocondriais, não houve evidência de diferença significativa (p>0,05) entre os grupos de CGMs, após 72 horas de condicionamentos. As médias dos valores CT para

o controle endógeno GUSB apresentaram coeficiente de variação de 1,44%. Em relação à motilidade mitocondrial, não houve evidência de diferença significativa entre os grupos de CGMs após 72 horas de condicionamentos. Será feito novo grupo de CGMs para o marcador Miro1 a fim de diminuir a variabilidade obtida até o momento. As médias dos valores CT para o controle endógeno GUSB apresentaram coeficiente de variação de 1,98%.

Células glomerulares mesangiais condicionadas por 72 horas em normoglicose (NG), hiperglicose (HG), manitol (MN), NG H₂O₂ e HG H₂O₂. (A) biogênese (PGC-1 & TFAM) e mitofagia (PARKIN & PINK) (n=2; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Holm-Sidak); (B) fusão (MFN1, MFN2, OPA1) e fissão (DRP1 & FIS) (n=2; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Holm-Sidak); (C) motilidade (Kinesin, Dynein, Miro1, Miro2) (n=2; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Holm-Sidak).

Figura 33. Expressão gênica (fold change) de marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial

3.7 Efeito protetor das células-tronco mesenquimais da medula óssea: menos H_2O_2 mitocondrial e morte celular nas Células Glomerulares Mesangiais

Após 6 horas de CGMs nos diferentes meios de condicionamento, trocamos os meios para NG e adicionamos as CTMs-MO mTmG na proporção de 1 CTM: 5 CGM, as quais ficaram em cocultura direta por 24 horas adicionais. Após a terapia celular, os grupos HG, NG H_2O_2 e HG H_2O_2 apresentaram redução significativa na concentração de H_2O_2 mitocondrial, não havendo mais diferença entre os grupos pós-terapia quando comparados entre si (Figura 34).

Após 48 horas de CGMs nos meios de condicionamento, adicionamos as CTMs-MO mTmG na proporção de 1:5 (respectivamente) em cocultura direta, a qual foi acompanhada até completarem 72 horas totais. Após as 24 horas do contato entre CGMs e CTMs-MO, ainda há maior expressão do marcador de H_2O_2 mitocondrial nas CGMs dos grupos NG H_2O_2 e HG H_2O_2 em comparação aos demais ($p < 0,05$). Continua sendo o pior cenário o grupo HG H_2O_2 (Figura 34). No entanto, a cocultura com CTMs-MO levou à redução expressiva da marcação por FITC em todos os grupos, quando comparados sem e com tratamento ($p < 0,05$), deixando de haver diferença entre NG e HG.

Avaliação por citometria de fluxo. (n=3; média $\pm$ desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Holm-Sidak).

Figura 34. Quantidade (%) de células glomerulares mesangiais, condicionadas por 6 (A) & 72 (B) horas em normoglicose (NG), hiperglicose (HG), manitol (MN), NG H₂O₂ e HG H₂O₂, com acúmulo de H₂O₂ na mitocôndria (FITC+), após cocultura com células-tronco mesenquimais da medula óssea. (*p<0,05 + desvio padrão)

Após 6 horas de condicionamento nos meios experimentais, não houve diferença entre as CGMs sem e com tratamento de CTMs-MO, quando comparadas intra-grupo. Entre os grupos, no condicionamento de 6 horas sem tratamento, houve maior nível de morte celular no grupo HG H₂O₂ em comparação a NG, MN e HG (p<0,05; Figura 35). No mesmo condicionamento, mas com tratamento, houve maior marcação para os grupos NG H₂O₂ e HG H₂O₂ em comparação aos grupos NG, MN e HG (p<0,05). Por sua vez, no condicionamento de 72 horas, o tratamento com CTMs-MO reduziu (p<0,05) expressivamente a porcentagem de CGMs marcadas com FITC e DAPI nos grupos HG, NG H₂O₂ e HG H₂O₂, o que indica menor quantidade de morte celular e efeito pró-sobrevivência/resistência frente ao ambiente hostil (Figura 35). Entre os grupos, no condicionamento de 72 horas, ainda há maior

marcação para o grupo HG H₂O₂ em comparação aos grupos NG, MN, HG e NG H₂O₂ ($p < 0,05$). Após as CTMs-MO, não houve mais a diferença que existia entre os grupos NG/ MN e o grupo HG. No entanto, os grupos NG H₂O₂ e HG H₂O₂ ainda são os piores cenários em comparação ao controle NG.

Quantidade de células glomerulares mesangiais (%) condicionadas por 6 (A) & 72 (B) horas em normoglicose (NG), manitol (MN), hiperglicose (HG), NG H₂O₂ e HG H₂O₂, após cocultura (n=3; média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0,05$; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Holm-Sidak).

Figura 35. Morte celular com permeabilização de membrana, em marcação para anexina-V (FITC+) e DAPI (violeta+)

3.8 Efeito das células-tronco mesenquimais da medula óssea na expressão gênica dos marcadores de mitofagia e biogênese das Células Glomerulares Mesangiais

De acordo com os resultados obtidos nas análises anteriores, fizemos a avaliação da expressão gênica das CGMs após cocultura com CTMs-MO apenas para os marcadores de Biogênese e de Mitofagia, no condicionamento de 72 horas (foram os únicos que apresentaram diferenças significativas entre os grupos). O

tratamento com CTMs-MO nas CGMs do condicionamento de 72 horas levou a aumento na expressão gênica dos marcadores relacionados à mitofagia: PINK1 e PARKIN ($p < 0,05$) e o marcador TFAM, relacionado à biogênese, no grupo HG (Figura 36). As médias dos valores CT para o controle endógeno GUSB apresentaram coeficiente de variação de 2,96%.

Figura 36. Expressão gênica dos marcadores de mitofagia (Parkin, PINK1) e biogênese (TFAM, PGC-1) em células glomerulares mesangiais sem e com tratamento células-tronco mesenquimais da medula óssea (pós cocultura). (B) Expressão gênica de células glomerulares mesangiais do grupo hiperglicose (HG) sem e com tratamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea (respectivamente). Recorte do gráfico geral, mostrando o marcador PINK1, único que apresentou diferença nessa avaliação. Valores de expressão relativos ao grupo controle NG ($n=2$; média $\pm$ desvio padrão; $*p < 0,05$; ANOVA two-way com pós-teste de Fisher LSD)

3.9 Efeito deletério do microambiente nas células-tronco mesenquimais da medula óssea: aumento da morte celular

A respeito do "Condicionamento por 6 horas", as CTMs-MO do grupo HG H₂O₂ tiveram maior marcação em comparação ao grupo controle NG e também em relação ao grupo NG H₂O₂ ($p < 0,05$), indicando morte celular em maior proporção pela sinergia dos fatores estressores. Interessantemente, nesse cenário, o meio de cultura em que elas estavam era NG, por 24 horas adicionais às 6 horas do protocolo de condicionamento de CGMs (Figura 37). Ou seja, as CTMs não tiveram contato com o meio HG H₂O₂ diretamente. Já a cerca do "Condicionamento por 72 horas", houve grande expressão dos marcadores de morte celular nas CTMs-MO dos grupos NG H₂O₂ e HG H₂O₂ ($p < 0,05$) em comparação aos demais grupos do mesmo *timepoint* e também em comparação intra-grupo, sendo inclusive o grupo HG H₂O₂ diferente do grupo NG H₂O₂. Nesse caso, evidencia-se o efeito de 24 horas dos condicionamentos/ambiente em estresse nas CTMs.

Quantidade de células-tronco mesenquimais da medula óssea (%) após cocultura com células glomerulares mesangiais condicionadas por 6 & 72 horas em normoglicose (NG), manitol (MN), hiperglicose (HG), NG H₂O₂ e HG H₂O₂. (*p<0,05 + desvio padrão). Comparação entre "Condicionamento por 6 horas" e "Condicionamento por 72 horas". (n=2; média ± desvio padrão; *p<0,05; ANOVA two-way com múltiplas comparações corrigidas por teste de Holm-Sidak).

Figura 37. Morte celular com permeabilização de membrana, marcação para anexina-V (FITC+) e DAPI (violeta+)

3.10 Resumo dos resultados *in vitro* (em relação ao controle normoglicose)

De forma a reunir os principais achados, montamos um quadro resumo (Quadro 4). Assim, pudemos verificar efeitos deletérios importantes da hiperglicose e/ou H₂O₂ nas CGMs e, por sua vez, os efeitos protetores das CTMs-MO após a cocultura.

Quadro 4. Efeito aumentativo (+), e escala de gravidade com repetições do símbolo (+++); efeito depressor (-), considerando a mesma lógica de índice de gravidade e efeito nulo (0). As comparações foram feitas com o controle NG, dentro de cada *timepoint*

	HG	NG H ₂ O ₂	HG H ₂ O ₂
	MORFOLOGIA ALTERADA		
6 horas	0	0	0
72 horas	+	+++	++++
	MIGRAÇÃO		
6 horas	0	0	0
72 horas	0	0	0
	METABOLISMO		
6 horas	0	-	-
72 horas	-	----	----
	MORTE		
6 horas	0	0	+
+ Cocultura*	0	0	0
CTMs-MO mTmG	0	0	+
72 horas	+	+++	++++
+ Cocultura*	-	--	--
CTMs-MO mTmG	0	++	+++

continua...

...continuação

POTENCIAL MITOCONDRIAL			
6 horas	0	0	0
72 horas	+	0	0
EXPRESSÃO GÊNICA			
6 horas	0	0	0
72 horas	- (B&M)	- (B&M)	- (B&M)
	+ PINK1		
+ <i>Cocultura</i> *	+ PARKIN	0	0
	+ TFAM		
H ₂ O ₂ MITOCONDRIAL			
6 horas	0	0	+
+ <i>Cocultura</i> *	-	-	--
72 horas	+	+++	+++++
+ <i>Cocultura</i> *	-	---	---

(B&M) = biogênese e mitofagia. (*) = comparações intra-grupo.

3.11 Rastreamento das células-tronco mesenquimais da medula óssea após administração intraperitoneal nos camundongos BTBR^{ob/ob}

Através das imagens *ex vivo*, pelo fotodocumentador IVIS[®] Lumina, temos uma evidência da migração das CTMs-MO injetadas por via sistêmica (intraperitoneal), e a sua chegada e manutenção nos rins (Figura 38C-F) por, pelo menos, 8 semanas (considerando a última injeção com 10 semanas de vida e a eutanásia com 18 semanas).

(A) controle positivo: animal BTBR-*mTmG* com expressão constitutiva RFP+ na membrana celular. (B) controle negativo: animal BTBR^{ob/ob} de 8 semanas de idade sem administração de células-tronco mesenquimais da medula óssea. (C-F) animais BTBR^{ob/ob} de 20 semanas de idade que receberam células-tronco mesenquimais da medula óssea via intraperitoneal, nos tempos 8 e 10 semanas de vida.

Figura 38. Avaliação *ex vivo* de fluorescência em rins após a eutanásia do animal

3.12 Efeitos das Células-Tronco Mesenquimais da Medula Óssea no ganho de peso, glicemia e proteinúria dos camundongos BTBR^{ob/ob}

Os animais BTBR^{ob/ob} apresentaram peso mais elevado desde o início do protocolo, em comparação aos animais controle (WT) e essa diferença se manteve até o fim do acompanhamento ($p < 0,05$; Figura 39). Adicionalmente, o tratamento com CTMs-MO não causou alteração no ganho de peso que pudesse ser medida de forma significativa ($p > 0,05$), em relação ao grupo BTBR^{ob/ob}.

n=6. * $p < 0,05$. Média $\pm$ desvio padrão; Modelo de efeito misto com pós-teste de Fisher LSD para múltiplas comparações.

Figura 39. Medidas do peso (g) dos animais BTBR WT, BTBR^{ob/ob} e BTBR^{ob/ob} + CTMs-MO entre 8 e 19 semanas de vida

Quanto a glicemia, os animais BTBR^{ob/ob} apresentaram hiperglicemia capilar basal expressivamente mais elevada ($p < 0,05$) do que os níveis de glicose sanguínea dos animais controle BTBR WT, ao longo de todo o acompanhamento (Figura 40). O mesmo vale para os animais BTBR^{ob/ob} + CTMs-MO, não havendo evidência de efeito da terapia celular no controle ou redução da glicemia dos animais diabéticos.

n=6. *p<0,05. Média $\pm$ desvio padrão; Modelo de efeito misto com pós-teste de Fisher LSD para múltiplas comparações.

Figura 40. Glicemia capilar basal (mg/dL) dos animais BTBR WT, BTBR^{ob/ob} e BTBR^{ob/ob} + CTMs-MO com 10, 14 e 20 semanas de vida

Em todas as observações ao longo do tempo (10, 14 e 20 semanas), a ACR dos animais BTBR^{ob/ob} controle foi maior (p<0,05) em comparação a ACR dos animais BTBR WT, que vai ao encontro da fisiopatologia da DRD desse modelo (Figura 41). Interessantemente, apesar do alto desvio padrão que impede a significância estatística, vemos que os animais BTBR^{ob/ob} + CTM, em média, tiveram ACR em níveis mais baixos do que os animais BTBR^{ob/ob} controle na idade de 10 semanas. No entanto, a diferença significativa entre BTBR^{ob/ob} controles e BTBR^{ob/ob} + CTMs ocorre na idade de 14 semanas, com maior separação da curva. Com 20 semanas de idade, os animais BTBR^{ob/ob} controle apresentam reduzida ACR em relação aos BTBR^{ob/ob} controle de 14-15 e 8-10 semanas de idade, igualando-se aos animais BTBR^{ob/ob} + CTMs mas ainda se mantendo elevada (p<0,05) em relação aos BTBR WT.

n=6. *p<0,05. Média $\pm$ desvio padrão; Modelo de efeito misto com pós-teste de Fisher LSD para múltiplas comparações.

Figura 41. Albuminúria corrigida por creatinina (ug/mg) dos animais BTBR WT e BTBR^{ob/ob} de 10, 14 e 20 semanas de idade e dos animais BTBR^{ob/ob} de 20 semanas de idade que receberam terapia com células-tronco mesenquimais da medula óssea

3.13 Efeito das células-tronco mesenquimais na expansão mesangial dos animais BTBR^{ob/ob}

Pela avaliação dos cortes histológicos renais temos uma clara evidência visual de maior expansão mesangial nos animais BTBR^{ob/ob} desde 10 semanas até 20 semanas de idade, em comparação aos animais BTBR WT de mesmas idades (setas azuis na figura 42). Por sua vez, o tratamento com as CTMs apresentou evidências de efeito na redução/desaceleração da expansão mesangial de forma heterogênea visualmente, sendo escolhido como representativo o animal que apresentou intensidade mediana entre os resultados encontrados. Pela quantificação, obtivemos uma redução moderada em comparação aos animais BTBR^{ob/ob} de 20 semanas sem tratamento. É interessante notar que os animais BTBR^{ob/ob} tratados com CTMs já não apresentam diferença significativa em comparação aos animais BTBR WT de 20 semanas.

As setas azuis indicam intenso depósito de matriz. Fotos em aumento de 60x. $n \geq 4$. * $p < 0,05$; média $\pm$ desvio padrão da média; ANOVA one-way com pós-teste de Fisher LSD para múltiplas comparações.

Figura 42. (A) Deposição de matriz mesangial nos animais BTBR WT e BTBR^{ob/ob} de idades 10, 14 e 20 semanas e BTBR^{ob/ob}+CTMs de 20 semanas, corados com PAS. B) Quantificação da deposição de matriz mesangial extracelular em porcentagem (%) de pixels/área da coloração PAS glomerular

3.14 Modulação da expressão gênica dos marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial pelas células-tronco mesenquimais da medula óssea no córtex renal dos animais BTBR^{ob/ob}

A expressão gênica dos marcadores de biogênese e mitofagia está aumentada, de forma significativa ($p < 0,05$), nos animais BTBR^{ob/ob} já a partir de 10 semanas de vida, em comparação aos animais controle BTBR WT de mesma idade. Essa diferença se mantém nos animais BTBR^{ob/ob} de 14 semanas ($p < 0,05$). No entanto, os animais BTBR^{ob/ob} de 20 semanas tem a expressão igualada aos animais WT de mesma idade. Finalmente, o grupo BTBR^{ob/ob} tratado com CTMs-MO apresentou aumento expressivo ($p < 0,05$) em todos os marcadores, superando os níveis encontrados nos animais BTBR^{ob/ob} (Figura 43-A). As médias dos valores CT para o controle endógeno GUSB apresentaram coeficiente de variação de 2,18%.

A expressão gênica dos marcadores Mfn2 e Opa1 está aumentada ($p < 0,05$) nos animais BTBR^{ob/ob} de 10 e 14 semanas, em relação aos controles (WT) de mesma idade. Já os marcadores Mfn1 e Drp1, apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) apenas nos animais BTBR^{ob/ob} de 14 semanas. Seguindo o mesmo padrão visto nos marcadores de biogênese e mitofagia (Figura 43-B), os animais BTBR^{ob/ob} de 20 tem expressão igualada ao controle WT de mesma idade, apresentando queda em relação aos BTBR^{ob/ob} mais jovens. O tratamento com CTMs-MO induziu aumento da expressão para os marcadores: Mfn1 (BTBR^{ob/ob} 10, 14 e 20 semanas), Mfn2 (BTBR^{ob/ob} 10 e 14 semanas), Opa (BTBR^{ob/ob} 10, 14 e 20 semanas), Drp1 (BTBR^{ob/ob} 10, 14 e 20 semanas) e Fis (BTBR^{ob/ob} 10 e 20 semanas). As médias dos valores CT para o controle endógeno GUSB apresentaram coeficiente de variação de 1,65%.

A expressão gênica dos marcadores de motilidade (com exceção de Miro2 – BTBR^{ob/ob} 10 semanas) está aumentada, de forma significativa ($p < 0,05$), nos animais BTBR^{ob/ob} já a partir de 10 semanas de vida em comparação aos animais controle (BTBR WT) de mesma idade. Esse aumento também é visto, agora para todos os marcadores, nos grupos de animais BTBR^{ob/ob} com 14 semanas. O mesmo padrão de igualdade, em comparação aos animais WT (Figura 43-C), se repete para os marcadores de motilidade dos animais BTBR^{ob/ob} 20 semanas. O tratamento com CTMs-MO também induziu aumento na expressão gênica dos marcadores: Kinesin (BTBR^{ob/ob} 10, 14 e 20 semanas), Dynein (BTBR^{ob/ob} 10, 14 e 20 semanas), Miro2

(BTBR^{ob/ob} 10 e 20 semanas) e Miro1 (BTBR^{ob/ob} 10, 14 e 20 semanas). As médias dos valores CT para o controle endógeno GUSB apresentaram coeficiente de variação de 2,88%.

(A) biogênese (TFAM & PGC-1) e mitofagia (PARKIN & PINK1) (n=6. *p<0,05; média ± desvio padrão; ANOVA two-way com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações); (B) fusão (MFN1, MFN2 & OPA1); e fissão (DRP1 & FIS1) (n=6. *p<0,05; média ± desvio padrão; ANOVA two-way com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações); (C) motilidade (MIRO1, MIRO2, KINESIN, DYNEIN) (n=6. *p<0,05; média ± desvio padrão; Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para múltiplas comparações).

Figura 43. Expressão gênica (*fold change*) de marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial no córtex renal dos BTBR^{ob/ob} controle (8-10, 14-15, 18-20 semanas) e BTBR^{ob/ob}+CTMs-MO, relativos ao BTBR WT (8-10, 14-15 e 18-20 semanas de idade)

3.15 Efeito das células-tronco mesenquimais da medula óssea na ativação da caspase 3 total e na taxa de podócitos/glomérulo nos rins dos animais BTBR^{ob/ob}

A respeito da ativação das vias de morte celular dependentes de caspase-3 total, avaliamos a expressão proteica nos rins dos animais BTBR WT (10, 14 e 20 semanas de vida), BTBR^{ob/ob} (8-10, 14 e 20 semanas de vida), e BTBR^{ob/ob} + CTMs (20 semanas de vida). Estatisticamente, não existe diferença entre os grupos. No entanto, é visualmente menos expressa, em média, nos animais que receberam tratamento de CTMs, de forma que se assemelham aos animais BTBR^{ob/ob} de 14 semanas (Figura 44).

(A) Imagens representativas dos grupos BTBR^{ob/ob} 8-10, 14, 20 semanas e CTMs. Aumento de 20x. (B) Quantificação da expressão proteica de caspase 3-total. Valores em porcentagem de pixels/área (pigmento da reação positiva), em imagens representativas para cada grupo. (n≥3. *p<0,05; média ± desvio padrão; ANOVA Brown-Forsythe & Welch, com teste t não pareado para múltiplas comparações).

Figura 44. Avaliação da expressão renal de caspase-3 por imunohistoquímica nos BTBR^{ob/ob} de 8-10, 14 e 20 semanas e BTBR^{ob/ob} +CTMs de 20 semanas

Quanto a presença numérica de podócitos (WT1⁺ intranuclear)/glomérulo, temos evidência de uma redução significativa nos animais BTBR^{ob/ob}, de todas as idades, em relação aos animais controle BTBR WT (Figura 45-A). Nesse cenário, não foi possível observar diferenças significativas entre os animais BTBR^{ob/ob}+CTMs e os animais BTBR^{ob/ob} sem terapia e BTBR^{ob/ob}+CTMs *versus* BTBR WT. Dessa forma, não podemos afirmar diretamente, e por comprovação estatística, que houve preservação ou recuperação do número de podócitos pelas CTMs (Figura 45-B). No entanto, é possível observar uma ausência de diferença significativa entre os animais BTBR^{ob/ob}+CTMs e o grupo BTBR WT, o que mostra uma maior similaridade entre os grupos e pode indicar a preservação almejada. Devido a distribuição não-normal dos dados, foi feita a análise por teste t múltiplo entre os grupos BTBR WT- BTBR^{ob/ob}, BTBR WT- BTBR^{ob/ob}+CTMs & BTBR^{ob/ob}- BTBR^{ob/ob}+CTMs.

Marcação de WT1 intranuclear por imunohistoquímica. (A) Imagens representativas do resultado da reação para cada grupo: BTBR WT, BTBR^{ob/ob} e BTBR^{ob/ob}+CTMs nas diferentes idades. (B) quantificação do número de podócitos/glomérulo em cada animal BTBR avaliado (n=6; Teste T múltiplo com pós-teste de Holm-Sidak; *p<0,05).

Figura 45. Avaliação do número de podócitos/glomérulo nos BTBR WT (10, 14 e 20 semanas), BTBR^{ob/ob} (8-10, 14 e 20 semanas) & BTBR^{ob/ob}+CTMs de 20 semanas

3.16 Resumo dos resultados *in vivo*

Agrupando os resultados obtidos nos animais BTBR^{ob/ob}, pudemos verificar efeitos significantes das CTMs-MO a cerca de preservação funcional e tecidual, além da importante modulação gênica dos marcadores mitocondriais (Quadro 5).

Quadro 5. Efeito aumentativo (+), indicando escala de gravidade com as repetições do símbolo; efeito depressor / negativo (-), considerando a mesma lógica de índice de gravidade e efeito nulo (0). "X" para ausência de dado sobre o grupo de animais em questão. @: *versus* BTBR WT de mesma idade; #: *versus* BTBR^{ob/ob} controle (sem CTMs)

Semanas de vida	8-10	14-15	18-20
PESO			
BTBR ^{ob/ob}	++ @	+++ @	++++ @
+ CTMs-MO	0 #	0 #	0 #
GLICEMIA			
BTBR ^{ob/ob}	+++ @	+++ @	+++ @
+ CTMs-MO	0 #	0 #	0 #
EXPRESSÃO GÊNICA			
BTBR ^{ob/ob}	-- @	-- @	- @
+ CTMs-MO	X #	X #	++ #
EXPANSÃO MESANGIAL			
BTBR ^{ob/ob}	- @	-- @	--- @
+ CTMs-MO	X #	X #	+ *#
PROTEINÚRIA			
BTBR ^{ob/ob}	++ @	+++ @	+ @
+ CTMs-MO	0 #	-- #	0 #
CASPASE 3 (<i>versus</i> BTBR^{ob/ob} 8-10 semanas)			
BTBR ^{ob/ob}	0 @	0 @	++ @
+ CTMs-MO	X #	X #	- #
NÚMERO DE PODÓCITOS			
BTBR ^{ob/ob}	0 @	- @	- @
+ CTMs-MO	X #	X #	0 #

4 DISCUSSÃO

Frente ao cenário epidemiológico mundial do DM e da DRD, a grande questão em aberto é: mesmo fazendo uso dos tratamentos clássicos, o que faz algumas pessoas serem suscetíveis à progressão da doença? Apesar da terapia farmacológica (metformina, glifozinas, glitazonas) e mudanças no estilo de vida (redução/interrupção do tabagismo, prática de exercícios físicos, perda de peso, reeducação nutricional), uma alta porcentagem (30-40%) das pessoas com DM desenvolve complicações que levam a DRD.⁽³⁷⁾ Analisando os números e consequências desse quadro de saúde pública, fica clara a necessidade de elucidar melhor os mecanismos por trás da progressão da DRD e do DM. Com foco nos rins, as medicações mais utilizadas são os bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, que diminuem a pressão arterial sistêmica e a proteinúria, reduzindo a progressão da DRD. Como mecanismo de ação, esses fármacos bloqueiam a via de ação da angiotensina II pelo receptor tipo 1 – *angiotensin type 1 receptor* (AT1R), que é a via responsável pelos efeitos deletérios renais da ativação do SRAA. No entanto, existe uma segunda forma de atuação da angiotensina II, que é via receptor tipo 2 – *angiotensin type 2 receptor* (AT2R), com efeitos protetores da função renal nos túbulos proximais frente à fase inicial da DRD. Dentre os mecanismos ativados pelo AT2R, estão: preservação da bioenergética mitocondrial, diminuição da produção de EROs mitocondriais, inibição do aumento da proliferação celular e o impedimento da reprogramação metabólica.⁽¹⁶³⁾ Interessantemente, ocorre a produção intracelular de angiotensina⁽¹⁶⁴⁾ e foi documentada a presença de receptor de alta-afinidade AT2R, além de AT1R, na mitocôndria das células epiteliais do túbulo proximal.⁽¹⁶³⁾ Além disso, existe evidência de que a angiotensina 1-7 gerada na própria mitocôndria, pela conversão de angiotensina II via enzima conversora ACE2, pode atuar via AT2R mitocondrial.^(163,165) Esse mecanismo de atuação intracelular e mitocondrial da angiotensina, e seus derivados, ainda é pouco conhecido, podendo influenciar grandemente no metabolismo das células renais, principalmente as tubulares, e participar do quadro oxidativo da DRD. Recentemente, promissoras drogas inibidoras da reabsorção da glicose pelo cotransportador SGLT2 (glifozinas) têm mostrado importantes resultados na prática clínica de forma tão importante que mudaram a história da evolução da DRD para melhor,⁽⁴⁹⁾ apresentando efeitos importantes também

contra as complicações cardiovasculares.⁽¹⁶⁶⁾ Ambas as abordagens farmacológicas são associadas junto com as diretrizes clássicas de mudança de estilo de vida.

É de responsabilidade ética e profissional investir em estudos que complementem o conhecimento adquirido para que possamos associar terapias e obter o melhor êxito no bloqueio ou retardamento da progressão da DRD. A terapia celular visa suprir a demanda dessa lacuna nos efeitos terapêuticos de tudo o que já vem sendo usado na prática clínica até então, sendo uma promissora ferramenta na reparação e até mesmo regeneração tecidual. Ainda existem problemas metodológicos que impedem a associação de resultados de uma forma mais construtiva, seja por deficiência de modelos adequados – como a escassez de estudos com modelo pré-clínicos adequados de DM tipo 2 – ou por um desenho experimental que complemente e seja comparável ao que vem sendo feito em outros centros de pesquisa. Além dos estudos pré-clínicos, é imperioso destacar a necessidade de estudos em humanos, tanto para compreensão da fisiopatologia mecanística da doença, como também para teste adequado da terapia celular, algo que ainda é escasso no Brasil. Segundo o portal *ClinicalTrials.gov*, existem quatro resultados para a busca de ensaios clínicos com as palavras-chaves: Diabetes, *Stem cells* e *Brazil*. Todos que aparecerem são para DM tipo 1 e apenas um deles está com *status* “completo”. A agência reguladora ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) lançou somente em 2018 o documento “Resolução da Diretoria Colegiada” sobre as Boas Práticas de Manufatura de células humanas para uso terapêutico e pesquisa clínica⁴.

Analisando o conjunto de resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, vemos que existe diferença entre os efeitos de intervenções de curta duração, que mimetizam cenários de distúrbios agudos, e os efeitos de intervenções mais prolongadas no tempo (72 horas), visando ilustrar cenários de distúrbios sub-crônicos e crônicos. Também é notável o efeito deletério da hiperglicose, evidenciado em alguns ensaios, mas interessantemente não tão evidente em outros. Além da hiperglicose, EROs acumuladas, no nosso caso sendo testado o H₂O₂ (devido à sua característica de permeabilidade à membrana mitocondrial), tiveram efeito ainda pior. O pior cenário avaliado na grande maioria dos ensaios é a sinergia de hiperglicose e H₂O₂ após 72 horas de interação com as CGMs.

⁴ Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprovada regra para células humanas em uso terapêutico [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2018 [citado 2019 nov 19]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/aprovada-regra-para-celulas-humanas-em-uso-terapeutico/219201

Esse quadro pode estar muito bem relacionado à realidade de pessoas acometidas com DM e complicações renais da DRD, já que a grande maioria sofre do DM tipo 2 (crônico) e muitos ainda de forma silenciosa, sem o diagnóstico necessário para iniciar qualquer terapia de controle glicêmico. Nesses tipos de caso, ocorre então o acúmulo exacerbado e persistente de EROs devido à manutenção de galopantes níveis de hiperglicose.

Já na avaliação morfológica das CGMs em cultura, por imagem de microscopia, é visível a potencialização dos efeitos deletérios do meio de cultura com hiperglicose contendo H_2O_2 após 72 horas (Figura 24E). É interessante notar que a hiperglicose por si possui efeitos diferentes de acordo ao tempo de avaliação e ao marcador que está sendo avaliado, o que algumas vezes pode ser controverso. Por exemplo, na análise de proliferação por contagem diária do número de CGMs ao longo de três dias, vimos que a hiperglicose induz um aumento de proliferação celular nas primeiras horas de cultura, como uma consequência da tentativa celular de lidar com o excesso nutricional imposto pelo ambiente. No entanto, quando continuamos observando o comportamento da população de CGMs, vimos ocorrer uma clara alteração desse padrão, principalmente a partir das 48 horas em diante, sendo nítida a distinção das curvas de proliferação (Figura 25) com queda na contagem de células no grupo em hiperglicose. Essa evidência condiz com o resultado obtido na avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Figura 31), no qual observamos o aumento de marcação nas CGMs sob hiperglicose já em 6 horas de tratamento, o que deve estar associado ao aumento inicial de proliferação celular mesangial, que é um dos primeiros marcadores das alterações renais em pacientes. O aumento observado no grupo MN de 6 horas pode ser explicado pelo estresse hiperosmótico, que mimetiza o nível de hiperosmolaridade do grupo HG.⁽¹⁶⁷⁾ No entanto, o ponto mais importante desse ensaio é a manutenção do elevado potencial de membrana para o grupo HG na avaliação de 72 horas. A alta concentração de glicose leva ao aumento de atividade do ciclo do ácido cítrico na matriz mitocondrial, produzindo maior quantidade de NADH e $FADH_2$. O potencial de membrana está intrinsicamente ligado às transformações redox associadas à atividade do ciclo do ácido cítrico, que por sua vez será utilizado pela ATP-sintase na síntese de ATP. O problema está no papel redutor desses substratos, que em excesso levam a sobrecarga de demanda da CTE e, subsequentemente, a maior vazamento de elétrons formando o superóxido.⁽¹⁶⁸⁾ As células tendem a manter um padrão estável de potencial de membrana e de ATP intracelular em

homeostase.⁽¹⁶⁹⁾ Frente à demanda ambiental, alterações adaptativas acontecem e, se transientes, nada tem de efeitos deletérios. O mal está na manutenção da alta demanda e elevação do potencial de membrana mitocondrial, que leva a consequências patológicas.⁽¹⁷⁰⁾ Em nosso experimento fica evidenciado um momento prévio a essa transição de superexcitação para declínio de potencial de membrana mitocondrial, no grupo HG de 72 horas (Figura 31).

A HG, em 72 horas, afeta negativamente a capacidade de metabolização de substrato MTT pelas CGMs, em comparação ao controle NG (Figura 26). Esse quadro fica ainda pior em relação às CGMs condicionadas em meio contendo H_2O_2 . Esse resultado avalia uma habilidade inerente à homeostase energética saudável, corroborando o achado do teste de proliferação celular (Figura 25) em relação aos efeitos deletérios da HG e do H_2O_2 em 72 horas de condicionamento. Esses achados também se relacionam com o dado de potencial de membrana mencionado acima, já que a elevação persistente da ação mitocondrial está relacionada à disfunção (Figura 31). Ao longo da progressão da DRD, as CGMs passam de um estado de hiperativação com alta proliferação para um estado de parada de ciclo celular e hipertrofia. O nosso resultado condiz mais com o cenário tardio da fisiopatologia, enquanto que o mesmo teste de MTT com uma linhagem de CGMs humanas (HMCs) mostrou aumento (de ~2 vezes) na resposta das células frente à hiperglicose em comparação ao controle.⁽¹⁷¹⁾ Em contrapartida, mais condizente com nossos achados, outro estudo mostrou que a exposição de células humanas do túbulo proximal aos AGEs (um dos resultados da HG persistente) leva a prejuízos funcionais com queda nos níveis de MTT.⁽¹⁷²⁾

Como marcador da consequência última do distúrbio hiperglicêmico, avaliamos os níveis de morte celular em cada grupo de CGMs. Assim, obtivemos evidências de que a morte celular é aumentada nos meios de hiperglicose e nos meios contendo H_2O_2 (HG, NG H_2O_2 e HG H_2O_2), sendo muito mais agravado quando na presença direta do radical peróxido de hidrogênio. Esse efeito deletério evidenciado nos níveis de morte acontece de maneira tempo-dependente, como consequência final da falha energética nas CGMs (Figura 30) e excesso de EROs sendo produzidas leva à danos mitocondriais que podem superar a capacidade de reciclagem via mitofagia, iniciando a sinalização de morte celular.⁽¹⁷³⁾ A relação de morte celular com o estresse oxidativo é tema bem evidenciado na literatura, rendendo revisões e detalhamento de vias possivelmente responsáveis pelas alterações em cadeia de forma tempo-

dependente. Não só a apoptose, mas outros tipos de morte celular como a necroptose e a necrose são associadas à hiperglicose.⁽¹⁷⁴⁾ As evidências indicam a via DAG(diacilglicerol)-PKC (proteína quinase C)-NADPH oxidase, ativada pela HG, como uma das principais fontes de estímulo à produção de EROs e de indução à inflamação crônica de baixo grau, característica nas complicações do DM.⁽⁶⁶⁾ Existem opções de modulação dessas vias, como a própria metformina e seus efeitos bloqueadores da via NADPH-oxidase, levando à inibição do estresse oxidativo.⁽¹⁷⁵⁾

Como forma de rastrear o agressor molecular presente na estrutura mitocondrial avaliada indireta ou diretamente, testamos a concentração de H_2O_2 de forma específica nessa organela. Os resultados mostram que há um acúmulo desse radical na mitocôndria das CGMs no grupo HG H_2O_2 já na avaliação de condicionamento por 6 horas, sendo nesse cenário o único grupo que apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais (Figura 28). Já em 72 horas, vemos novamente o agravamento tempo-dependente das alterações nas CGMs condicionadas com HG H_2O_2 , sendo o pior cenário dentre as comparações. É importante notar a atuação solitária da HG como causadora de acúmulo de H_2O_2 por si só, reforçando o entendimento do mecanismo de desestabilização da CTE e acúmulo de EROs frente ao excesso de suprimento metabólico. O superóxido produzido pela CTE, através da reação entre o oxigênio molecular e os elétrons provenientes de vazamento dos complexos mitocondriais I e III, principalmente, é convertido em H_2O_2 pela superóxido desmutase-2. Em seguida, esse H_2O_2 é neutralizado em água pela enzima catalase e glutathione peroxidase.⁽¹⁷⁶⁾ Notavelmente, após a terapia celular através da cocultura, houve uma queda em todos os níveis de H_2O_2 nas CGMs dos grupos de 72 horas de intervenção, evidenciando o efeito antioxidante das CTMs de forma insulto-dependente (Figura 34) já que foi maior a redução relativa aos grupos de maior marcação de acúmulo inicialmente (cenários mais graves). Esse resultado, além de evidenciar a conhecida capacidade das CTMs em agirem diminuindo os fatores em excesso, relacionados ao estresse oxidativo,⁽¹⁷⁷⁾ ilustra a dinâmica de atuação das CTMs em resposta aos diferentes ambientes. Em cenários de dano são ativadas e passam a intensificar sua atuação reparadora e regenerativa, havendo evidências de aumento na secreção de fatores parácrinos.^(178,179)

Através dos ensaios de PCR quantitativo em tempo real, foi possível identificar a atuação supressora da HG e do peróxido de hidrogênio (NG H_2O_2 & HG H_2O_2), na expressão gênica de alvos moleculares marcadores da mitofagia (PARKIN e

PINK1) e da biogênese (PGC-1); (Figura 33). Esse resultado nos leva a um aprofundamento nas vias moleculares dessas componentes do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial, que são processos intrínsecos do programa de qualidade e permitem a adaptação para homeostase energética frente às alterações nutricionais e/ou estressoras do ambiente.⁽¹⁷³⁾ A mitofagia é essencial na eliminação de fragmentos mitocondriais já em disfunção, permitindo a reciclagem dos seus pequenos componentes constitutivos, que por sua vez alimentarão a formação de novas porções desse coletivo de organelas mitocondriais. É notável que somente a HG já tenha a capacidade de causar uma redução na expressão gênica em 72 horas de intervenção, mesmo na ausência do H₂O₂. As CGMs, frente à HG, sofrem alterações de estresse que as levam à parada do ciclo celular e à hipertrofia com excesso de produção de matriz extracelular.⁽⁴⁴⁾ Por fim, as CGMs acabam por entrar em exaustão e sofrem com a morte celular, sendo a HG por si só associada à inibição da mitofagia e indução da via apoptótica de morte celular.⁽¹⁸⁰⁾ Agentes antioxidantes específicos para mitocôndria (SS-31) atuam de maneira protetora em CGMs contra os danos da hiperglicose, inibindo vias de dano.⁽¹⁸¹⁾ A terapia com CTMs-MO, através da cocultura, foi capaz de recuperar a expressão gênica dos marcadores de mitofagia PINK1 e PARKIN, e do marcador de biogênese TFAM, em comparação ao mesmo grupo sem tratamento com CTMs (Figura 36). PINK1 e PARKIN são responsáveis pela sinalização de mitocôndria que perdeu o potencial de membrana e já está em disfunção, sendo marcada para degradação via lisossomo (mitofagia). Essa modulação da mitofagia é importante para remoção dos debris mitocondriais que se acumulam em cenários de dano e estresse, como a hiperglicose, e pode contribuir para recuperação do equilíbrio energético.⁽¹⁸²⁾ A indução da autofagia/mitofagia pelas CTMs tem um número crescente de evidências na literatura, com diferentes tipos celulares afetados pela HG sendo reparados pela ação protetora da terapia com CTMs.⁽¹⁸⁰⁾ Inclusive, os efeitos das CTMs foram comparáveis aos efeitos da rapamicina (ativador de autofagia) em matéria de indução da autofagia/mitofagia.⁽¹⁸⁰⁾ A indução de biogênese por TFAM é relevante pelo aspecto renovador das estruturas que estão sendo removidas, já que somente remover o dano não resolve o problema por chegar a um limiar de não ser mais possível manter o equilíbrio energético com pouco material restante, como nos casos de excesso de mitofagia⁽⁸³⁾ sendo prejudicial ao sistema. As CTMs já têm sido descritas na literatura por sua capacidade de induzir a biogênese mitocondrial quando usada em terapia, refletindo nos efeitos antiapoptóticos e reparadores frente aos danos teciduais.⁽¹²⁹⁾

A administração sistêmica de CTMs (subcutânea, endovenosa, intraperitoneal, arterial), além da facilidade de tradução para a prática clínica, tem a vantagem de possibilitar a distribuição das CTMs por alguns tecidos e de colocar em circulação maior quantidade de substratos secretados por elas, o que beneficia o reparo frente aos danos da HG, que afeta todos os órgãos. Já foi demonstrado que mesmo a distância, as CTMs podem beneficiar um órgão afetado que não recebeu integração das CTMs em si.⁽¹⁸³⁾ No entanto, nosso foco de interesse em transferência de mitocôndria exige, para maior eficiência terapêutica (~70% do reparo)⁽¹⁴⁹⁾ contato direto célula-célula, o que implica administração de CTMs resultando em integração – mesmo que temporária – no órgão-alvo. Assim, precisamos unir o que seja viável clinicamente com uma abordagem que beneficie o sistema de maneira mais abrangente, mantendo em vista o benefício local que precisamos alcançar. *In vivo*, pudemos verificar a migração das CTMs-MO injetadas via intraperitoneal para os rins dos animais BTBR^{ob/ob} através de imagens *ex vivo* (Figura 38) pela comparação entre animais BTBR^{ob/ob} que receberam CTMs e animais BTBR^{ob/ob} sem administração de células (controle negativo de 8 semanas). Ainda, pudemos verificar que as células, ou pelo menos seus produtos, se mantêm nos rins (e demais órgãos) por pelo menos 8 semanas após a última administração (feita nos animais BTBR^{ob/ob} 10 semanas de vida). Esse resultado é de extrema importância nos debates de terapia celular, já que mostra a viabilidade de uma via de administração sistêmica em atingir o foco de interesse de tratamento. A administração intraperitoneal evita o aprisionamento majoritário das CTMs nos pulmões, que é resultado comum pela via endovenosa, tendo o fígado como foco de maior contenção das células injetadas e também atingindo os rins e baço.⁽¹⁸⁴⁾ Outras formas de administração evidenciaram a chegada de CTMs nos rins, tendo um melhor desempenho a via da artéria renal, em comparação com a via endovenosa, em relação ao número de células alcançando os glomérulos e em relação aos resultados funcionais obtidos.⁽¹⁸⁵⁾

Os animais BTBR^{ob/ob} apresentam obesidade já em idade jovem, evidenciada pelo acompanhamento do ganho de peso ao longo das semanas. A obesidade leva a hiperglicemia com resistência à insulina, caracterizado como DM2, que atinge níveis extremos (>600mg/dL em jejum) em alguns deles já em idade jovem, refletindo o mesmo cenário do estudo de caracterização do modelo.⁽¹¹⁷⁾ A terapia com CTMs-MO não teve efeito que pudesse ser evidenciado por nossas análises no ganho de peso ao longo das semanas (Figura 39) e nos níveis de hiperglicemia (Figura 40).

Sobre a hiperglicemia, é interessante notar nos animais BTBR^{ob/ob} controle (sem CTMs) que ocorre uma queda nas medições entre 14-15 e 18-20 semanas, de certa forma contra intuitivamente. No entanto, avaliando o estado de saúde dos animais nessa idade mais avançada do protocolo, víamos intensas alterações fisiológicas e comportamentais, inclusive referente à capacidade de obtenção do alimento na gaiola devido ao excessivo peso corporal, o que pode explicar essas variações. A queda na taxa de glicemia em estágio avançado da doença parece estar relacionada à piora do quadro de saúde. Em relação às CTMs, talvez fosse mais eficaz fazermos a intervenção em um momento anterior, com os animais mais jovens ou mesmo usar um maior número de doses de forma a aumentar o *pool* de CTMs em circulação. Também é possível que uma via de administração órgão-específica pudesse ser mais eficaz, no caso, intra-pancreática. Já existe evidência na literatura do efeito hipoglicemiante da terapia celular em animais com DM1^(119,186) e outro que diz usar modelo de DM2, mesmo aplicando metodologia inadequada para estabelecimento do modelo, encontrou efeito inibidor da resistência à insulina e efeito hipoglicemiante quando injetadas as CTMs em poucos dias após o estabelecimento do quadro diabético.⁽¹²⁰⁾ De maneira mais realista, temos de considerar o estado clínico dos que procuram por assistência médica, que na maioria dos casos já apresentam alterações significativas no quadro de saúde e não estão no estágio inicial da doença. Esses pacientes são atendidos pelo protocolo padrão ouro de tratamento, que contempla as melhorias no estilo de vida (prática de exercícios físicos, reeducação alimentar) e, principalmente, a intervenção farmacológica com drogas hipoglicemiantes (metformina, glifozinas) e de controle dos efeitos colaterais do DM (bloqueadoras do SRAA). A metformina, classicamente empregada como a primeira intervenção logo após o diagnóstico do DM2, atua no bloqueio da gliconeogênese hepática e no aumento da sensibilidade à insulina.⁽¹⁸⁷⁾ Já as glifozinas, atuam no bloqueio da reabsorção da glicose (~90% do total) via transportador SGLT2 no túbulo proximal. Assim, leva a redução da glicemia pela excreção via urina da glicose não reabsorvida.⁽¹⁸⁸⁾ Por fim, o bloqueio do SRAA (por exemplo, via bloqueio do receptor de angiotensina II ou bloqueio da enzima conversora da angiotensina) tem efeito renoprotetor em pacientes com DRD através do controle da pressão arterial sistêmica e redução da proteinúria, desacelerando a progressão da doença.⁽¹⁸⁹⁾ Dessa maneira, agregar a intervenção farmacológica padrão ouro à terapia celular parece ser a melhor abordagem para potencializar os efeitos de tratamento.

Na avaliação funcional dos rins nos animais BTBR^{ob/ob}, usamos como biomarcador de dano a ACR (taxa de albuminúria corrigida por creatininúria). Devido à elevada ACR, temos evidência significativa de alta deterioração renal nos animais BTBR^{ob/ob} controle nas idades de 10 e 14 semanas, em comparação aos animais BTBR WT (Figura 41). Para a idade de 20 semanas, ocorre uma brusca redução na ACR dos animais BTBR^{ob/ob} controle, o que condiz com a piora funcional durante a progressão da DRD. Nossos resultados a respeito da ACR são semelhantes aos apresentados na literatura que descreve o modelo BTBR^{ob/ob}.⁽¹¹⁷⁾ Apesar de não ser evidenciável de forma significativa pela comparação estatística, os animais BTBR^{ob/ob} tratados com CTMs apresentaram ACR menor na idade de 10 semanas, em comparação ao grupo BTBR^{ob/ob} controle. No entanto, essa diferença passa a ser significativa na idade de 14 semanas, na comparação entre os animais BTBR^{ob/ob} controle e os que foram tratados com as CTMs. Lembrando que os animais receberam 2 doses de injeção, com 8 e com 10 semanas de idade. Assim, faziam 4 semanas de tratamento. Podemos ver a maior similaridade dos BTBR^{ob/ob} CTMs com os BTBR WT pela ausência de diferença significativa entre eles na idade de 20 semanas. Esse resultado é importante evidência do efeito renoprotetor da terapia com CTMs na DRD, que se reflete na preservação funcional observada pela menor ACR nos animais tratados, condizendo com alguns achados da literatura. Em modelo pré-clínico de DM1 e DM2, tanto a administração sistêmica das CTMs-MO em si, quanto do meio condicionado por elas (secretoma), têm efeitos renoprotetores na inibição das alterações glomerulares e tubulares, refletidas pela menor taxa de proteinúria (ACR), pela inibição da morte celular e no reparo dos danos histológicos glomerulares e tubulares.⁽¹⁹⁰⁾ É necessário pontuar que esses efeitos foram evidenciáveis mesmo na presença da hiperglicemia, o que se assemelha ao nosso estudo (Figura 40) e também que mesmo tratando-se de secretoma, existem evidências da presença de mitocôndrias nas vesículas extracelulares e de seus efeitos na reprogramação bioenergética das células receptoras, com benefícios funcionais e reparadores.⁽¹⁹¹⁾

A modulação do microambiente é de extrema importância para a sobrevivência das CTMs, viabilizando sua permanência e ação terapêutica. Como demonstração dessa dinâmica, pudemos evidenciar a alta taxa de morte celular em CTMs (em cocultura com CGMs por 24 horas no "condicionamento por 72 horas") nos grupos NG H₂O₂ e HG H₂O₂ (Figura 37). Interessantemente, as CTMs que ficaram em cocultura com as CGMs "condicionadas por 6 horas" também apresentaram aumento

dos níveis de morte no grupo HG H₂O₂, provavelmente por deposição de debris celulares e moléculas associadas ao dano (do inglês, *damage-associated molecular patterns*; DAMPs), provenientes das CGMs, ativando vias de sinalização de estresse. Vale lembrar que nesse cenário as CTMs não tiveram contato direto com o meio de condicionamento (Figura 16-B).⁽¹⁹²⁻¹⁹⁴⁾ As CTMs são muito estudadas por seus efeitos reparadores nas células e órgãos-alvo, mas é interessante atentar para a sua susceptibilidade ao microambiente deletério da HG. Já foi demonstrado efeitos prejudiciais da HG na proliferação, capacidade de diferenciação e ação imunomodulatória das CTMs.⁽¹⁹⁵⁾ É possível condicionar as CTMs previamente, de forma a torná-las mais resistentes à ação deletéria da HG⁽¹⁹⁶⁾ e de forma a potencializar sua eficácia.⁽¹⁹⁷⁾ Esse ramo de modulação abre um amplo espectro de possibilidades para rever os métodos usados até então no preparo do banco de CTMs e também nas possíveis abordagens para superar as adversidades fisiopatológicas do paciente que receberá a intervenção.⁽¹⁹⁸⁾

Classicamente, na DRD, ocorrem alterações morfológicas importantes no tecido renal. Um dos primeiros sinais dessas alterações é a hipertrofia das CGMs e excessivo depósito de matriz mesangial, que altera a hemodinâmica de filtração glomerular e caracteriza a expansão mesangial.⁽⁴⁴⁾ Os animais BTBR^{ob/ob} controle de 8-10, 14-15 e 18-20 semanas apresentaram, visualmente, aumento da deposição de matriz extracelular no mesângio, evidenciado pela maior coloração por PAS (Figura 42). As imagens dos cortes renais demonstraram evidências heterogêneas dos efeitos da terapia com CTMs na redução ou prevenção da expansão mesangial, identificada pelo método de coloração por PAS nos animais BTBR^{ob/ob}. No entanto, a quantificação por histomorfometria evidenciou efeito médio de redução da expansão mesangial nos animais BTBR^{ob/ob} tratados com CTMs, de forma que eles já não apresentaram diferença significativa em comparação aos animais BTBR WT de 20 semanas. A figura escolhida de um animal representativo indica menos depósito de matriz, mas esses valores precisam ser confirmados pela quantificação. No entanto, existem evidências dos efeitos das CTMs na redução da expansão mensagial em animais diabéticos com complicações renais, sendo atribuídos aos exosomos e a secreção de VEGF o protagonismo na atuação reparadora.⁽¹⁹⁰⁾ Sempre vale ressaltar a diferença entre os modelos de avaliação e as diferenças entre as CTMs usadas em cada estudo, que acabam por dificultar a comparação dos resultados obtidos. Nesse

estudo citado, foram utilizadas CTMs provenientes de ratos e o modelo da doença foram camundongos com dieta rica em lipídios.

Da mesma forma que nos experimentos *in vitro*, as análises de expressão gênica dos marcadores do programa de qualidade mitocondrial no córtex renal dos animais BTBR trouxeram interessantes perspectivas a cerca do mecanismo molecular por trás das alterações funcionais e/ou morfológicas (Figura 43). Na maioria dos marcadores do Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial avaliados (com exceção de Mfn1, Drp1, Fis e Miro2), houve um aumento da expressão nos animais BTBR^{ob/ob} de 8-10 semanas em relação aos animais BTBR WT de mesma idade, que se manteve nos animais BTBR^{ob/ob} de 14-15 semanas e foi perdido (igualou-se ao BTBR WT) nos animais BTBR^{ob/ob} de 20 semanas. Esse cenário parece indicar um efeito compensatório de resposta mitocondrial às alterações decorrentes do DM e da DRD nos animais mais jovens que, no entanto, se perde nos animais mais velhos (20 semanas) e extremamente doentes. Já a administração de CTMs, por sua vez, causou uma maior expressão de todos os marcadores avaliados, em comparação aos BTBR^{ob/ob} controle. O aporte de novos *mitochondrions* integrando a rede mitocondrial das CGMs, além dos efeitos parácrinos de secreção de fatores de crescimento, anti-inflamatórios, antiapoptóticos e antioxidantes pelas CTMs, pode ter levado à uma intensificação dos componentes do programa de qualidade mitocondrial no sentido de reorganizar a matriz mitocondrial das CGMs e recuperar a homeostase energética. O tratamento com CTMs já demonstrou resultados na indução de mitofagia⁽¹⁸⁰⁾ e da biogênese⁽¹³⁸⁾ em modelos de dano pela hiperglicemia. Além disso, a terapia com CTMs inibe a fragmentação, induzindo a fusão e recuperando a morfologia mitocondrial⁽¹³⁹⁾ a cerca da forma de cristas e tamanho da organela,⁽¹³⁸⁾ de maneira a reparar o estado disfuncional associado ao quadro de excesso nutricional hiperglicêmico.⁽¹⁹⁹⁾ No entanto, existem evidências de efeitos indutores de fissão mitocondrial, via Drp1, promovidos pelo tratamento com CTMs.⁽²⁰⁰⁾ Além da indução gênica de marcadores relacionados ao Programa de Controle de Qualidade Mitocondrial, a terapia com CTMs tem efeitos em diversos outros marcadores associados a diferentes processos celulares, em modelo de administração endovenosa e como alvo de análise o fígado.⁽¹³⁹⁾ Interessante notar que nossos resultados com os animais BTBR^{ob/ob} evidenciam um aumento mais expressivo no gene Opa1, responsável pela modulação da fusão da membrana interna mitocondrial (Figura 43). É interessante também contrapor os dados obtidos pela avaliação da expressão gênica

no córtex renal com os dados da análise nas CGMs. Nas CGMs vemos uma diminuição nos marcadores de biogênese e mitofagia frente à hiperglicose e/ou H_2O_2 (Figura 33), enquanto que no córtex renal vemos aumento de vários marcadores nos animais hiperglicêmicos. Esses resultados são importantes na discussão sobre os efeitos do DM e das CTMs e indicam a necessidade de avaliarmos a dinâmica particular de cada tipo celular especificamente, já que respondem de formas diversas ao mesmo estímulo/estresse, além de estarmos estudando cenários com tempos diferentes de exposição aos fatores estressores (72 horas vs. 18 semanas).⁽²⁰¹⁾

A DRD leva a intenso desequilíbrio metabólico e a alterações morfofuncionais que culminam na disfunção tecidual e na ativação de vias de morte.⁽⁶⁶⁾ A morte celular é um processo fisiológico de renovação dos componentes do tecido mas, quando em excesso, pode levar a prejuízos irreversíveis. Visivelmente, a terapia com CTMs nos animais $BTBR^{ob/ob}$ teve um efeito desacelerador da ativação da via da caspase-3, relacionada a morte por *apoptose*, porém não foi possível obter a significância estatística na comparação entre os grupos (Figura 44). Os animais $BTBR^{ob/ob}$ de 20 semanas de idade que não receberam CTMs tiveram um aumento da expressão de caspase-3 em relação ao grupo $BTBR^{ob/ob}$ de 8-10 semanas, porém isso também não foi confirmado estatisticamente. Mesmo assim, apesar de não termos conseguido evidenciar a significância da modulação da vida de caspase 3 nos rins, já foi demonstrado o efeito das CTMs, através da leitura dos sinais de dano ambientais, ativarem processos internos de modulação de vias reparadoras de forma a iniciar atuação no resgate das células vizinhas, com efeitos antiapoptóticos.^(129, 202)

Existem células nos rins que estão completamente comprometidas à determinada função, de forma a serem totalmente diferenciadas e não entrarem mais no ciclo celular de divisão. Esse é o caso dos podócitos, células epiteliais envolvendo os capilares do glomérulo e que compõe a barreira de filtração. A perda dos podócitos é um dos sinais clássicos da progressão da DRD e está relacionada ao aumento das taxas de proteinúria.⁽⁴⁰⁾ Assim, a preservação dessas células é fundamental no combate à progressão da DRD. Os animais $BTBR^{ob/ob}$ controle tiveram menor número de podócitos/glomérulo em todas as idades, em comparação aos animais $BTBR^{WT}$, o que condiz com a proteinúria elevada e a deterioração morfo-funcional desse modelo (Figura 45). No entanto, não pudemos evidenciar uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais $BTBR^{ob/ob}$ de 20 semanas controle para os animais $BTBR^{ob/ob}$ de 20 semanas que receberam CTMs. Apesar de que já não existe

uma diferença entre os animais que receberam a terapia e o grupo BTBR WT, demonstrando maior aproximação e semelhança entre esses grupos e o possível efeito das CTMs na preservação dos podócitos na DRD.

Apesar das alterações metabólicas, imunes e neuroendócrinas decorrentes da ausência de leptina, nosso modelo pré-clínico de camundongos *BTBR^{ob/ob}* para estudo dos efeitos de terapias associadas para desaceleração, diminuição, parada ou reversão da progressão da DRD é de extrema valia. Não só por desenvolver obesidade, DM2 e ter lesões renais tempo-dependentes semelhantes à doença humana, o que o torna notável nessa área de estudo, mas também por ter caráter reversível em suas alterações renais quando suplementado com leptina.⁽²⁰³⁾ Essa característica reversível torna os resultados terapêuticos obtidos nesse modelo muito robustos na investigação mais aprofundada rumo à tradução para a prática clínica. Assim, esperamos contribuir para o delineamento de ensaios clínicos mais robustos e que tragam luz à aplicabilidade da terapia com células-tronco mesenquimais para o reparo e, possivelmente, a regeneração do tecido renal.

Em suma, pudemos evidenciar efeitos reparadores e renoprotetores, porém limitados, da terapia com CTMs-MO *in vitro* e *in vivo*. As perspectivas são positivas para a associação dessa terapia com o uso do tratamento *gold standard*, visando modelos mais realistas e com abordagem mais completa e eficiente. Além disso, visamos a compreensão mais aprofundada dos mecanismos da modulação mitocondrial, que reflete no caráter metabólico, pelas CTMs usadas como terapia para cessar a progressão de dano renal na DRD.

5 CONCLUSÕES

1. Pudemos evidenciar efeitos reparadores e renoprotetores, porém limitados, da terapia com células-tronco mesenquimais da medula óssea nos modelos de doença renal diabética *in vitro* e *in vivo*;

2. As perspectivas são positivas para a associação dessa terapia com o uso do tratamento *gold standard*, visando modelos mais realistas e com abordagem mais completa e eficiente;

3. Visamos a compreensão mais aprofundada dos mecanismos da modulação mitocondrial, refletida no caráter sistêmico-metabólico, pelas células-tronco mesenquimais como terapia para cessar a progressão de dano renal na doença renal diabética.

6 REFERÊNCIAS

1. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 9th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2019.
2. Zhang P, Gregg E. Global economic burden of diabetes and its implications. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(6):404–5.
3. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):288–98.
4. Packham DK, Alves TP, Dwyer JP, Atkins R, de Zeeuw D, Cooper M, et al. Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database. *Am J Kidney Dis*. 2012;59(1):75–83.
5. Mogensen CE. Microalbuminuria in prediction and prevention of diabetic nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Diabetes Complications*. 1995;9(4):337–49.
6. Valmadrid CT, Klein R, Moss SE, Klein BE. The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. *Arch Intern Med*. 2000;160(8):1093–100.
7. Mullens W, Nijst P. Cardiac output and renal dysfunction: definitely more than impaired flow. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(19):2209–12.
8. Olivetti G, Anversa P, Rigamonti W, Vitali-Mazza L, Loud AV. Morphometry of the renal corpuscle during normal postnatal growth and compensatory hypertrophy. A light microscope study. *J Cell Biol*. 1977;75(2 Pt 1):573–85.
9. Stockand JD, Sansom SC. Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiol Rev*. 1998;78(3):723–44.
10. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: the sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(8):1461–9.
11. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):9–18.
12. Meyer C, Dostou JM, Gerich JE. Role of the human kidney in glucose counterregulation. *Diabetes*. 1999;48(5):943–8.
13. Moe OW, Ujiie K, Star RA, Miller RT, Widell J, Alpern RJ, et al. Renin expression in renal proximal tubule. *J Clin Invest*. 1993;91(3):774–9.
14. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood*. 1988;71(2):524–7.
15. Hummel CS, Lu C, Loo DD, Hirayama BA, Voss AA, Wright EM. Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300(1):C14–21.
16. Vallon V, Platt KA, Cunard R, Schroth J, Whaley J, Thomson SC, et al. SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(1):104–12.

17. Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ, Stumvoll M. Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care*. 2001;24(2):382–91.
18. Jung CH, Jang JE, Park JY. A novel therapeutic agent for type 2 diabetes mellitus: SGLT2 inhibitor. *Diabetes Metab J*. 2014;38(4):261–73. Fig.1. Glucose reabsorption in the renal proximal tubule; p. 262.
19. Hierholzer K, Wiederholt M. Some aspects of distal tubular solute and water transport. *Kidney Int*. 1976;9(2):198–213.
20. Ellison DH, Velázquez H, Wright FS. Adaptation of the distal convoluted tubule of the rat. Structural and functional effects of dietary salt intake and chronic diuretic infusion. *J Clin Invest*. 1989;83(1):113–26.
21. Peti-Peterdi J, Harris RC. Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(7):1093–6.
22. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*. 2008;134(1):112–23.
23. Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trézéguet V, Lauquin GJ, Brandolin G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature*. 2003;426(6962):39–44.
24. Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(10):629–46. Figure 1. ATP production in the kidney; p. 631.
25. Soltoff SP. ATP and the regulation of renal cell function. *Annu Rev Physiol*. 1986;48:9–31.
26. Rich PR. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(Pt 6):1095–105.
27. Forbes JM, Thorburn DR. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(5):291–312.
28. Zeni L, Norden AG, Cancarini G, Unwin RJ. A more tubulocentric view of diabetic kidney disease. *J Nephrol*. 2017;30(6):701–17.
29. Hall AM, Unwin RJ, Parker N, Duchon MR. Multiphoton imaging reveals differences in mitochondrial function between nephron segments. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(6):1293–302.
30. Meyer C, Stumvoll M, Dostou J, Welle S, Haymond M, Gerich J. Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282(2):E428–34.
31. Wang Z, Ying Z, Bosy-Westphal A, Zhang J, Schautz B, Later W, et al. Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(6):1369–77.
32. Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2007;27(2):195–207.
33. Vallon V. The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus. *Annu Rev Med*. 2015;66:255–70.

34. Zeni L, Norden AG, Cancarini G, Unwin RJ. A more tubulocentric view of diabetic kidney disease. *J Nephrol.* 2017;30(6):701-17.
35. Anders HJ, Davis JM, Thurau K. Nephron protection in diabetic kidney disease. *N Engl J Med.* 2016;375(21):2096–8.
36. Bandeira E, Queiroz D. Diabetic Nephropathy. In: Bandeira F, Gharib H, Golbert A, Griz L, Faria M, editors. *Endocrinology and diabetes.* New York: Springer; 2014.
37. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(12):2032–45.
38. Goligorsky MS. Vascular endothelium in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;312(2):F266–75.
39. van Sloten TT, Henry RM, Dekker JM, Nijpels G, Unger T, Schram MT, et al. Endothelial dysfunction plays a key role in increasing cardiovascular risk in type 2 diabetes: the Hoorn study. *Hypertension.* 2014;64(6):1299-305.
40. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(5):1358–73.
41. Li JJ, Kwak SJ, Jung DS, Kim JJ, Yoo TH, Ryu DR, et al. Podocyte biology in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 2007;72(106):S36–42.
42. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest.* 1997;99(2):342–8.
43. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2006;55(1):225–33.
44. Kriz W, Löwen J, Federico G, van den Born J, Gröne E, Gröne HJ. Accumulation of worn-out GBM material substantially contributes to mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;312(6):F1101–11.
45. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):8015–20.
46. Vallon V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;300(5):R1009–22.
47. Amsellem S, Gburek J, Hamard G, Nielsen R, Willnow TE, Devuyst O, et al. Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(11):1859–67.
48. Mori KP, Yokoi H, Kasahara M, Imamaki H, Ishii A, Kuwabara T, et al. Increase of total nephron albumin filtration and reabsorption in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(1):278–89.

49. Wanner C, Inzucchi SE, Zinman B. Empagliflozin and progression of kidney disease in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375(18):1801–2.
50. Hinokio Y, Suzuki S, Hirai M, Suzuki C, Suzuki M, Toyota T. Urinary excretion of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a predictor of the development of diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2002;45(6):877-82.
51. Kalia K, Sharma S, Mistry K. Non-enzymatic glycosylation of immunoglobulins in diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta*. 2004;347(1-2):169-76.
52. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):231–55.
53. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*. 1987;107(4):526–45.
54. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011;194(1):7–15.
55. Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(5):549–61.
56. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*. 2010;45(7-8):466–72.
57. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453–62.
58. Sagoo MK, Gnudi L. Diabetic nephropathy: Is there a role for oxidative stress? *Free Radic Biol Med*. 2018;116:50-63.
59. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298–300.
60. Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(2):327-36
61. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(21):8665–70.
62. Kornienko JS, Smirnova IS, Pugovkina NA, Ivanova JS, Shilina MA, Grinchuk TM, et al. High doses of synthetic antioxidants induce premature senescence in cultivated mesenchymal stem cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1296.
63. Yan LJ. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *J Diabetes Res*. 2014;2014:137919.
64. 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.
65. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058–70.

66. Volpe CM, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PM, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):119.
67. Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KA, Zoungas S, et al. Diabetic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15018.
68. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000;404(6779):787–90.
69. Teodoro JS, Gomes AP, Varela AT, Duarte FV, Rolo AP, Palmeira CM. Uncovering the beginning of diabetes: the cellular redox status and oxidative stress as starting players in hyperglycemic damage. *Mol Cell Biochem.* 2013;376(1-2):103–10.
70. Coughlan MT, Nguyen TV, Penfold SA, Higgins GC, Thallas-Bonke V, Tan SM, et al. Mapping time-course mitochondrial adaptations in the kidney in experimental diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2016;130(9):711–20.
71. Hansell P, Welch WJ, Blantz RC, Palm F. Determinants of kidney oxygen consumption and their relationship to tissue oxygen tension in diabetes and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2013;40(2):123–37.
72. Miyamoto S, Hsu CC, Hamm G, Darshi M, Diamond-Stanic M, Declèves AE, et al. Mass spectrometry imaging reveals elevated glomerular ATP/AMP in diabetes/obesity and identifies sphingomyelin as a possible mediator. *EBioMedicine.* 2016;7:121–34.
73. Hallow KM, Gebremichael Y, Helmlinger G, Vallon V. Primary proximal tubule hyperreabsorption and impaired tubular transport counterregulation determine glomerular hyperfiltration in diabetes: a modeling analysis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;312(5):F819–35.
74. Solini A, Usueli V, Fiorina P. The dark side of extracellular ATP in kidney diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(5):1007–16.
75. Friederich-Persson M, Thörn E, Hansell P, Nangaku M, Levin M, Palm F. Kidney hypoxia, attributable to increased oxygen consumption, induces nephropathy independently of hyperglycemia and oxidative stress. *Hypertension.* 2013;62(5):914–9.
76. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):745–54.
77. Eisner V, Picard M, Hajnóczky G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):755–65.
78. Blake R, Trounce IA. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(4):1404–12.
79. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212(2):167–78.
80. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1–13.
81. Mishra R, Emancipator SN, Kern T, Simonson MS. High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. *Kidney Int.* 2005;67(1):82–93.

82. Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* 2013;20(1):31–42.
83. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mitophagy: in sickness and in health. *Mol Cell Oncol.* 2015;3(1):e1056332.
84. Ding WX, Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem.* 2012;393(7):547–64.
85. Pernas L, Scorrano L. Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:505-31.
86. Reis K, Fransson A, Aspenström P. The Miro GTPases: at the heart of the mitochondrial transport machinery. *FEBS Lett.* 2009;583(9):1391–8.
87. Lin HY, Weng SW, Chang YH, Su YJ, Chang CM, Tsai CJ, et al. The causal role of mitochondrial dynamics in regulating insulin resistance in diabetes: link through mitochondrial reactive oxygen species. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:7514383.
88. Dahlmans D, Houzelle A, Schrauwen P, Hoeks J. Mitochondrial dynamics, quality control and miRNA regulation in skeletal muscle: implications for obesity and related metabolic disease. *Clin Sci (Lond).* 2016;130(11):843-52. Figure 1. Healthy and impaired mitochondrial dynamics; p. 845.
89. Lindblom R, Higgins G, Coughlan M, de Haan JB. Targeting mitochondria and reactive oxygen species-driven pathogenesis in diabetic nephropathy. *Rev Diabet Stud.* 2015;12(1-2):134–56.
90. Al-Kafaji G, Sabry MA, Skrypnik C. Time-course effect of high-glucose-induced reactive oxygen species on mitochondrial biogenesis and function in human renal mesangial cells. *Cell Biol Int.* 2016;40(1):36–48.
91. Czajka A, Ajaz S, Gnudi L, Parsade CK, Jones P, Reid F, et al. Altered mitochondrial function, mitochondrial DNA and reduced metabolic flexibility in patients with diabetic nephropathy. *EBioMedicine.* 2015;2(6):499–512.
92. Guo K, Lu J, Huang Y, Wu M, Zhang L, Yu H, et al. Protective role of PGC-1 α in diabetic nephropathy is associated with the inhibition of ROS through mitochondrial dynamic remodeling. *PLoS One.* 2015;10(4):e0125176.
93. Andres AM, Hernandez G, Lee P, Huang C, Ratliff EP, Sin J, et al. Mitophagy is required for acute cardioprotection by simvastatin. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(14):1960-73.
94. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2199–210.
95. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(4):189–200.
96. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med.* 2011;208(3):417–20.
97. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2011;469(7329):221–5.

98. Cherry AD, Piantadosi CA. Regulation of mitochondrial biogenesis and its intersection with inflammatory responses. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(12):965-76. Figure 1. Inflammation-induced reactive oxygen and nitrogen species modulate mitochondrial quality control programs through redox signaling; however, higher levels of oxidative stress may also contribute to inflammatory mitochondrial dysfunction, resulting in energetic failure and cell death; p. 42.
99. Wang Y, Liu N, Lu B. Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25(7):859–75.
100. Aparicio R, Rana A, Walker DW. Upregulation of the autophagy adaptor p62/SQSTM1 prolongs health and lifespan in middle-aged *Drosophila*. *Cell Rep*. 2019;28(4):1029–1040.e5.
101. Saxena S, Mathur A, Kakkar P. Critical role of mitochondrial dysfunction and impaired mitophagy in diabetic nephropathy. *J Cell Physiol*. 2019;234(11):19223–36.
102. Woo CY, Kc R, Kim M, Kim HS, Baek JY, Koh EH. Autophagic flux defect in diabetic kidney disease results in megamitochondria formation in podocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;S0006-291X(19)32034-0.
103. Khaminets A, Behl C, Dikic I. Ubiquitin-dependent And independent signals in selective autophagy. *Trends Cell Biol*. 2016;26(1):6–16.
104. Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr Biol*. 2018;28(4):R170–85.
105. Sekine S, Youle RJ. PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol. *BMC Biol*. 2018;16(1):2.
106. Harper JW, Ordureau A, Heo JM. Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(2):93–108.
107. Chan NC, Salazar AM, Pham AH, Sweredoski MJ, Kolawa NJ, Graham RL, et al. Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet*. 2011;20(9):1726–37.
108. Pryde KR, Smith HL, Chau KY, Schapira AH. PINK1 disables the anti-fission machinery to segregate damaged mitochondria for mitophagy. *J Cell Biol*. 2016;213(2):163–71.
109. Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen DF, Karbowski M, et al. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol*. 2010;191(7):1367–80.
110. Shlevkov E, Kramer T, Schapansky J, LaVoie MJ, Schwarz TL. Miro phosphorylation sites regulate Parkin recruitment and mitochondrial motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(41):E6097–106.
111. Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet*. 2010;19(24):4861–70.
112. Campello S, Strappazzon F, Cecconi F. Mitochondrial dismissal in mammals, from protein degradation to mitophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1837(4):451–60.

113. Orvedahl A, Sumpter R Jr, Xiao G, Ng A, Zou Z, Tang Y, et al. Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature*. 2011;480(7375):113–7.
114. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*. 2015;524(7565):309–14.
115. Smith MA, Covington MD, Schnellmann RG. Loss of calpain 10 causes mitochondrial dysfunction during chronic hyperglycemia. *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(2):161–8.
116. Vallon V, Rose M, Gerasimova M, Satriano J, Platt KA, Koepsell H, et al. Knockout of sodium-glucose transporter SGLT2 attenuates hyperglycemia and glomerular hyperfiltration but not kidney growth or injury in diabetes mellitus. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;304(2):F156–67.
117. 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.
118. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR; UKPDS GROUP. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int*. 2003;63(1):225–32.
119. Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB, Carpio D, Yañez AJ, Conget PA. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(6):631–40.
120. 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.
121. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med*. 2004;14(6):1035–41.
122. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(5):1053–67.
123. Ezquer F, Ezquer M, Simon V, Pardo F, Yañez A, Carpio D, et al. Endovenous administration of bone-marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells prevents renal failure in diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(11):1354–65.
124. 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.
125. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 11):2204–13.
126. Ooi YY, Rahmat Z, Jose S, Ramasamy R, Vidyadaran S. Immunophenotype and differentiation capacity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from CBA/Ca, ICR and Balb/c mice. *World J Stem Cells*. 2013;5(1):34–42.
127. Hickson LJ, Eirin A, Lerman LO. Challenges and opportunities for stem cell therapy in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2016;89(4):767–78.

128. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):125.
129. Mahrouf-Yorgov M, Augeul L, Da Silva CC, Jourdan M, Rigolet M, Manin S, et al. Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *Cell Death Differ.* 2017;24(7):1224–38.
130. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med.* 2013;19(1):35–42.
131. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther.* 2009;17(6):939–46.
132. Driscoll J, Patel T. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease. *J Gastroenterol.* 2019;54(9):763–73.
133. Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(3):700–6.
134. Bi B, Schmitt R, Israilova M, Nishio H, Cantley LG. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(9):2486–96.
135. Vasandan AB, Jahnavi S, Shashank C, Prasad P, Kumar A, Prasanna SJ. Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Sci Rep.* 2016;6:38308.
136. Torres Crigna A, Daniele C, Gamez C, Medina Balbuena S, Pastene DO, Nardozi D, et al. Stem/stromal cells for treatment of kidney injuries with focus on preclinical models. *Front Med (Lausanne).* 2018;5(179):179.
137. Lv S, Cheng J, Sun A, Li J, Wang W, Guan G, et al. Mesenchymal stem cells transplantation ameliorates glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via inhibiting oxidative stress. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;104(1):143–54.
138. Lee SE, Jang JE, Kim HS, Jung MK, Ko MS, Kim MO, et al. Mesenchymal stem cells prevent the progression of diabetic nephropathy by improving mitochondrial function in tubular epithelial cells. *Exp Mol Med.* 2019;51(7):77.
139. Newell C, Sabouny R, Hittel DS, Shutt TE, Khan A, Klein MS, et al. Mesenchymal stem cells shift mitochondrial dynamics and enhance oxidative phosphorylation in recipient cells. *Front Physiol.* 2018;9(1572):1572.
140. Liu H, McTaggart SJ, Johnson DW, Gobe GC. Original article anti-oxidant pathways are stimulated by mesenchymal stromal cells in renal repair after ischemic injury. *Cytotherapy.* 2012;14(2):162–72.
141. Zhao K, Hao H, Liu J, Tong C, Cheng Y, Xie Z, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic high glucose-induced β -cell injury through modulation of autophagy. *Cell Death Dis.* 2015;6(9):e1885.
142. Li W, Du M, Wang Q, Ma X, Wu L, Guo F, et al. FoxO1 promotes mitophagy in the podocytes of diabetic male mice via the PINK1/Parkin pathway. *Endocrinology.* 2017;158(7):2155–67.

143. Yang S, Han Y, Liu J, Song P, Xu X, Zhao L, et al. Mitochondria: a novel therapeutic target in diabetic nephropathy. *Curr Med Chem*. 2017;24(29):3185–202.
144. Park HW, Shin JS, Kim CW. Proteome of mesenchymal stem cells. *Proteomics*. 2007;7(16):2881–94.
145. Lonergan T, Bavister B, Brenner C. Mitochondria in stem cells. *Mitochondrion*. 2007;7(5):289–96.
146. Chen CT, Shih YR, Kuo TK, Lee OK, Wei YH. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(4):960–8.
147. Bukowiecki R, Adjaye J, Prigione A. Mitochondrial function in pluripotent stem cells and cellular reprogramming. *Gerontology*. 2014;60(2):174–82.
148. Paliwal S, Chaudhuri R, Agrawal A, Mohanty S. Regenerative abilities of mesenchymal stem cells through mitochondrial transfer. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):31.
149. Ahmad T, Mukherjee S, Pattnaik B, Kumar M, Singh S, Kumar M, et al. Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J*. 2014;33(9):994–1010.
150. Liu K, Ji K, Guo L, Wu W, Lu H, Shan P, et al. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvasc Res*. 2014;92:10-8.
151. Jackson MV, Morrison TJ, Doherty DF, McAuley DF, Matthay MA, Kissenpfennig A, et al. Mitochondrial transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which mesenchymal stem cells enhance macrophage phagocytosis in the in vitro and in vivo models of ARDS. *Stem Cells*. 2016;34(8):2210–23.
152. Rangel EB, Gomes SA, Dulce RA, Premer C, Rodrigues CO, Kanashiro-Takeuchi RM, et al. C-kit(+) cells isolated from developing kidneys are a novel population of stem cells with regenerative potential. *Stem Cells*. 2013;31(8):1644–56.
153. Kaessmeyer S, Bhoola K, Baltic S, Thompson P, Plendl J. Lung cancer neovascularisation: cellular and molecular interaction between endothelial and lung cancer cells. *Immunobiology*. 2014;219(4):308–14. Fig. 1. Experimental design of direct co-culture method; p. 310.
154. van Genderen H, Kenis H, Lux P, Ungeth L, Maassen C, Deckers N, et al. In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. *Nat Protoc*. 2006;1(1):363–7.
155. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2(2):329–33.
156. Dickinson BC, Lin VS, Chang CJ. Preparation and use of MitoPY1 for imaging hydrogen peroxide in mitochondria of live cells. *Nat Protoc*. 2013;8(6):1249–59.
157. Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, Cheadle EJ, Pelicano H, Ivanov A, et al. Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood*. 2012;119(15):3523–33.

158. Stoehr JP, Nadler ST, Schueler KL, Rabaglia ME, Yandell BS, Metz SA, et al. Genetic obesity unmasks nonlinear interactions between murine type 2 diabetes susceptibility loci. *Diabetes*. 2000;49(11):1946–54.
159. Boulter N, Suarez FG, Schibeci S, Sunderland T, Tolhurst O, Hunter T, et al. A simple, accurate and universal method for quantification of PCR. *BMC Biotechnol*. 2016;16(1):27
160. Liou GY, Storz P. Detecting reactive oxygen species by immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2015;1292:97-104.
161. Goyal S, Mishra K, Sarkar U, Sharma S, Kumari A. Diagnostic utility of Wilms' tumour-1 protein (WT-1) immunostaining in paediatric renal tumours. *Indian J Med Res*. 2016;143 Supplement:S59–67.
162. Ezzat T, Dhar DK, Malago M, Olde Damink SW. Dynamic tracking of stem cells in an acute liver failure model. *World J Gastroenterol*. 2012;18(6):507–16.
163. Micakovic T, Papagiannarou S, Clark E, Kuzay Y, Abramovic K, Peters J, et al. The angiotensin II type 2 receptors protect renal tubule mitochondria in early stages of diabetes mellitus. *Kidney Int*. 2018;94(5):937–50.
164. Ellis B, Li XC, Miguel-Qin E, Gu V, Zhuo JL. Evidence for a functional intracellular angiotensin system in the proximal tubule of the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;302(5):R494–509.
165. Wilson BA, Cruz-Diaz N, Su Y, Rose JC, Gwathmey TM, Chappell MC. Angiotensinogen import in isolated proximal tubules: evidence for mitochondrial trafficking and uptake. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;312(5):F879–86.
166. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al.; EMPA-REG OUTCOME Investigators. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2015;373(22):2117–28.
167. Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, et al. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis: differential effects of sorbitol and mannitol. *J Biol Chem*. 2003;278(40):38484–94.
168. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem*. 2010;47:53-67.
169. Yaniv Y, Juhaszova M, Nuss HB, Wang S, Zorov DB, Lakatta EG, et al. Matching ATP supply and demand in mammalian heart: in vivo, in vitro, and in silico perspectives. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1188:133-42.
170. Izyumov DS, Avetisyan AV, Pletjushkina OY, Sakharov DV, Wirtz KW, Chernyak BV, et al. "Wages of fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1658(1-2):141–7.
171. Zeng W, Qi W, Mu J, Wei Y, Yang LL, Zhang Q, et al. MG132 protects against renal dysfunction by regulating Akt-mediated inflammation in diabetic nephropathy. *Sci Rep*. 2019;9(1):2049.
172. Zhao Y, Zhang W, Jia Q, Feng Z, Guo J, Han X, et al. High dose vitamin E attenuates diabetic nephropathy via alleviation of autophagic stress. *Front Physiol*. 2019;9:1939.

173. Higgins GC, Coughlan MT. Mitochondrial dysfunction and mitophagy: the beginning and end to diabetic nephropathy? *Br J Pharmacol.* 2014;171(8):1917–42.
174. LaRocca TJ, Sosunov SA, Shakerley NL, Ten VS, Ratner AJ. Hyperglycemic conditions prime cells for RIP1-dependent necroptosis. *J Biol Chem.* 2016;291(26):13753–61.
175. Esteghamati A, Eskandari D, Mirmiranpour H, Noshad S, Mousavizadeh M, Hedayati M, et al. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Clin Nutr.* 2013;32(2):179-85.
176. D'Souza AD, Parish IA, Krause DS, Kaech SM, Shadel GS. Reducing mitochondrial ROS improves disease-related pathology in a mouse model of ataxia-telangiectasia. *Mol Ther.* 2013;21(1):42-8.
177. Yan X, Fu X, Jia Y, Ma X, Tao J, Yang T, et al. Nrf2/Keap1/ARE signaling mediated an antioxidative protection of human placental mesenchymal stem cells of fetal origin in alveolar epithelial cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:2654910.
178. Chen H, Min XH, Wang QY, Leung FW, Shi L, Zhou Y, et al. Pre-activation of mesenchymal stem cells with TNF- α , IL-1 β and nitric oxide enhances its paracrine effects on radiation-induced intestinal injury. *Sci Rep.* 2015;5:8718.
179. Mahrouf-Yorgov M, Augeul L, Da Silva CC, Jourdan M, Rigolet M, Manin S, et al. Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *Cell Death Differ.* 2017;24(7):1224-38.
180. Zhu W, Yuan Y, Liao G, Li L, Liu J, Chen Y, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate hyperglycemia-induced endothelial injury through modulation of mitophagy. *Cell Death Dis.* 2018;9(8):837.
181. Hou Y, Li S, Wu M, Wei J, Ren Y, Du C, et al. Mitochondria-targeted peptide SS-31 attenuates renal injury via an antioxidant effect in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;310(6):F547–59.
182. Nguyen TN, Padman BS, Lazarou M. Deciphering the molecular signals of PINK1/Parkin mitophagy. *Trends Cell Biol.* 2016;26(10):733–44.
183. Roddy GW, Oh JY, Lee RH, Bartosh TJ, Ylostalo J, Coble K, et al. Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6. *Stem Cells.* 2011;29(10):1572–9.
184. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(1):12–20.
185. Wang Y, He J, Pei X, Zhao W. Systematic review and meta-analysis of mesenchymal stem/stromal cells therapy for impaired renal function in small animal models. *Nephrology (Carlton).* 2013;18(3):201–8.
186. Lin P, Chen L, Yang N, Sun Y, Xu YX. Evaluation of stem cell differentiation in diabetic rats transplanted with bone marrow mesenchymal stem cells. *Transplant Proc.* 2009;41(5):1891–3.
187. Salpeter SR, Buckley NS, Kahn JA, Salpeter EE. Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. *Am J Med.* 2008;121(2):149–57.e2.

188. Ghosh RK, Ghosh SM, Chawla S, Jasdanwala SA. SGLT2 inhibitors: a new emerging therapeutic class in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol*. 2012;52(4):457–63.
189. Ruggerenti P, Cravedi P, Remuzzi G. The RAAS in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6(6):319–30.
190. Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, Otani M, Nakano M, Konari N, et al. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes. *Sci Rep*. 2016;6:34842.
191. Phinney DG, Di Giuseppe M, Njah J, Sala E, Shiva S, St Croix CM, et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. Version 2. *Nat Commun*. 2015;6:8472.
192. Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell*. 2012;11(5):596–606.
193. Khacho M, Slack RS. Mitochondrial and reactive oxygen species signaling coordinate stem cell fate decisions and life long maintenance. *Antioxid Redox Signal*. 2017;10.1089/ars.2017.7228. [Epub ahead of print].
194. Khacho M, Clark A, Svoboda DS, Azzi J, MacLaurin JG, Meghaizel C, et al. Mitochondrial dynamics impacts stem cell identity and fate decisions by regulating a nuclear transcriptional program. *Cell Stem Cell*. 2016;19(2):232–47.
195. Denu RA, Hematti P. Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2989076.
196. Khan M, Ali F, Mohsin S, Akhtar S, Mehmood A, Choudhery MS, et al. Preconditioning diabetic mesenchymal stem cells with myogenic medium increases their ability to repair diabetic heart. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):58.
197. Cai C, Guo Y, Teng L, Nong Y, Tan M, Book MJ, et al. Preconditioning human cardiac stem cells with an HO-1 inducer exerts beneficial effects after cell transplantation in the infarcted murine heart. *Stem Cells*. 2015;33(12):3596–607.
198. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba-Surma E, Legosz P, Sarzynska S, Drela K. Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells Int*. 2019;2019:9628536.
199. Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor VM. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol*. 2017;11:637–45.
200. Cai J, Wang J, Huang Y, Wu H, Xia T, Xiao J, et al. ERK/Drp1-dependent mitochondrial fission is involved in the MSC-induced drug resistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Dis*. 2016;7(11):e2459.
201. Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med*. 2018;50(8):96.

202. Li JW, Wei L, Han Z, Chen Z. Mesenchymal stromal cells-derived exosomes alleviate ischemia/reperfusion injury in mouse lung by transporting anti-apoptotic miR-21-5p. *Eur J Pharmacol.* 2019;852:68-76.
203. Lee VK, Hosking BM, Holeniewska J, Kubala EC, Lundh von Leithner P, Gardner PJ, et al. BTBR ob/ob mouse model of type 2 diabetes exhibits early loss of retinal function and retinal inflammation followed by late vascular changes. *Diabetologia.* 2018;61(11):2422–32.

Abstract

Introduction: Diabetes Mellitus is a worldwide epidemic. In 2019, this disease affected more than 400 million individuals, although there are estimations that this number represents half of real number of affected individuals. There is no cure for diabetes mellitus, and this affection causes several micro- and macrovascular complications over time, such as diabetic kidney disease. The diabetic kidney disease is characterized by progressive loss of glomerular filtration rate and time-dependent proteinuria, which affect 30-40% of people with diabetes. Oxidative stress, as a major protagonist in this pathogenesis, leads to redox alterations and mitochondria damages. Loss of energy homeostasis through mitochondrial dysfunction is a common reason between the hyperglycemia-driven damage pathways. Damages occur due to the overwhelmed mitochondria stress response through morphological and functional adaptations – fusion, fission, biogenesis and mitophagy. Mesenchymal stem cell therapy has renoprotective activity, inhibiting oxidative stress and repairing mitochondria by secretome releasing and mitochondria transfer. **Purpose:** To use mesenchymal stem cell therapy in diabetic kidney disease models to repair kidney function. **Methods:** We used mouse glomerular mesangial cells conditioned in vitro with hyperglycemia and/or H₂O₂ and BTBRob/ob in animal model. Both groups were treated with mouse mesenchymal stem cells (Rosa 26-mTmG strain). Kidney function as proteinuria and molecular markers were evaluated for oxidative stress and damage. In addition, we evaluated gene expression of mitochondria dynamic targets. **Results:** Mesenchymal stem cell therapy reduced oxidative stress through inhibition of mitochondria-H₂O₂ accumulation in the mouse glomerular mesangial cells, it also diminished cell death and induced the expression of mitochondria Quality Control Program genes. In BTBRob/ob model, cell therapy reduced proteinuria and also induced mitochondria-related genes expression. **Conclusion:** Mesenchymal stem cell therapy had renoprotective and repair effects in diabetic kidney disease. We observed an important gene modulation in mitochondria dynamic components, and adaptation to environmental changes. Likewise, mesenchymal stem cell therapy led to a decrease in apoptosis and halted the mesangial expansion.

Keywords: Diabetes mellitus, type 2; Diabetic nephropathies; Mitochondria; Adult stem cells; Oxidative stress