

Marcella Liciani Franco

**AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA E DE KLOTHO EM CAMUNDONGOS
BTBR^{ob/ob} TRATADOS COM EMPAGLIFLOZINA E CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do título de Doutora em Ciências da
Saúde.

São Paulo

2025

Marcella Liciani Franco

**AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA E DE KLOTHO EM CAMUNDONGOS
BTBR^{ob/ob} TRATADOS COM EMPAGLIFLOZINA E CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do título de Doutora em Ciências da
Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Érika Bevilaqua
Rangel

São Paulo

2025

Franco, Marcella Liciani

Avaliação da autofagia e de Klotho em camundongos BTBR^{ob/ob} tratados com empagliflozina e células-tronco mesenquimais /

Marcella Liciani Franco. -- São Paulo, 2025.

xvii, 70 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Evaluation of autophagy and Klotho in BTBR^{ob/ob} mice treated with empagliflozin and mesenchymal stem-cells.*

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

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

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

Marcella Liciani Franco

**AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA E DE KLOTHO EM CAMUNDONGOS
BTBR^{ob/ob} TRATADOS COM EMPAGLIFLOZINA E CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS**

Presidente da banca: Profa. Dra. Érika Bevilaqua Rangel

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Andréa Laurato Sertié

Dra. Samirah Abreu Gomes

Profa. Dra. Lucia da Conceição Andrade

Membros suplentes:

Prof. Dr. Lionel Fernel Gamarra Contreras

Profa. Dra. Juliana Aparecida Preto de Godoy

Aprovada em: 11/12/2025.

Dedicatória

Dedico, com muito carinho, minha tese de doutorado à minha mãe, Suely Denise Liciani Franco, e ao meu pai, Marcelo Divino Franco. A eles, meu amor e gratidão eternos infinitos.

Agradecimentos

Ao longo destes anos de pós-graduação, que se iniciou como um Mestrado e, após a qualificação, mudou para o Doutorado Direto, sempre tentei demonstrar meu carinho e gratidão a todos que me cercavam. De fato, é um grande privilégio ter trabalhado com tantas pessoas carinhosas, bondosas, solícitas, inteligentes. Levarei cada momento vivido e experiência trocada em meu coração, sem jamais esquecer daqueles que fizeram parte de cada fase. Assim, é difícil nomear cada pessoa a quem gostaria de agradecer, mas deixo, aqui, uma tentativa resumida com um pedido de desculpas àqueles que eu não mencionei, pois seriam muitas páginas.

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus, por não somente ter colocado esse sonho em meu coração, como permitido que eu o realizasse.

Agradeço a minha família, em especial, a minha mãe Suely Denise Liciani Franco, e ao meu pai, Marcelo Divino Franco. Seria impossível descrever em palavras o tamanho do meu amor e gratidão por vocês - que, desde sempre, contribuíram de tantas formas para que eu pudesse realizar meu Doutorado Direto. E sou grata, principalmente, por todo o amor, parceria e confiança que sempre depositaram em mim e na minha irmã. Esse título também é de vocês.

Agradeço a minha irmã, Patricia, ao meu cunhado, Guilherme, e ao meu namorado, Rafael, por todo o amor, apoio e amizade.

Agradeço a minha orientadora, Doutora Érika Bevilaqua Rangel, por ter aberto as portas de seu laboratório para mim naquele janeiro chuvoso de 2021. Agradeço por todos os ensinamentos, oportunidades, incentivos e confiança em meu trabalho. Tudo isso contribuiu de forma significativa em meu amadurecimento pessoal e profissional.

Agradeço ao nosso grupo de pesquisa – atual e antigo – composto por alunos de Iniciação Científica e de Pós-Graduação. Foi um prazer dividir a bancada com eles, bem como ensiná-los e, também, aprender com eles. Além disso, sou extremamente grata pela ajuda que recebi de todos. Dentre tantos nomes, com receio de me esquecer de algum, gostaria de mencionar algumas pessoas com as quais tive o privilégio de conviver mais de perto: Stephany, Melise, Bruno, Tuany, Andrei, Gleice, Jaqueline e Alanah.

Agradeço a todos os amigos que fiz, inclusive, os de outros grupos de

pesquisa pelo carinho, risadas, ajuda, ensinamentos e momentos de almoço compartilhados.

Dentre tantas pessoas queridas, gostaria de detalhar o agradecimento a algumas em particular: Stephany, minha amiga de longa data. Com algumas poucas palavras nos conhecemos nos primeiros dias de faculdade. Desde então, nunca mais deixamos de estar presentes na vida uma da outra, mesmo longe, fisicamente. São, já, dez anos de amizade, alguns anos de trabalho juntas e incontáveis momentos de aprendizado e vivências inesquecíveis, como cada uma fazer um experimento diferente até tarde e esperar a outra para ir embora, e os congressos. Além do incentivo de que eu voltasse para a Academia. Seguiremos colecionando muitas histórias mais.

Cito, também, o Eduardo. Desde o primeiro dia no laboratório, sempre me recebeu bem, mostrando-se disposto a ajudar a qualquer momento em que precisasse e me incentivando. Com o tempo, viramos grandes amigos e espero levar sua amizade por toda a vida.

Expresso, também, meu carinho pela Melise e minha gratidão pela parceria, risadas, troca de conhecimento, caronas e companhia. Certamente, levarei toda essa bagagem no meu coração, esperando que sigamos amigas ao longo dessa caminhada.

Agradeço, também, à Natássia e à Júlia. Sempre com um sorriso acolhedor e um carinho enorme, torcendo pelo nosso sucesso de perto com sua doçura. A torcida pelo sucesso delas é recíproca!

Agradeço à toda equipe técnica do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein – Edicleia, Andrea, Thiago, Juliana, Marta, Guilherme, Caio – por todo o auxílio, preocupação com nosso ambiente de trabalho e pelo carinho e amizade todos os dias.

Agradeço à toda equipe técnica e administrativa do CETEC, em especial, ao Lucas pelo auxílio laboratorial e à Gracielle pelos ensinamentos e auxílio nos cuidados (riquíssimos, por sinal) com nossos animais. Aproveito para também agradecer por seu carinho, gentileza e amizade tão especiais que tanto iluminaram nossos dias.

Agradeço aos funcionários administrativos antigos e atuais da Pós-Graduação, em especial, à Michele, Sandra e Camila, por todo o suporte e prontidão e, também, agradeço à toda a equipe do Núcleo de Apoio à Pesquisa.

Agradeço às Professoras Juliana e Maira pelo acolhimento na

Monitoria da Engenharia Biomédica, bem como por todos os ensinamentos e oportunidades que proporcionaram a mim.

Agradeço ao Centro de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein e ao Hospital Israelita Albert Einstein, por ter me recebido e me acolhido ao longo destes anos, além de ter proporcionado condições para que eu desenvolvesse meu trabalho: financeiras, administrativas e de infraestrutura.

Agradeço a todos os funcionários externos ao Laboratório com os quais tive contato ao longo destes anos e que contribuíram para nosso ambiente bem cuidado e seguro, como os funcionários da limpeza, da segurança, de serviço aos alunos, Engenharia Clínica e da ronda dos *freezers* e geladeiras, bombeiros, dentre outros.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2021/02216 e foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 (88887.908083/2023-00; 88887.848340/2023-00).

Por fim, agradeço por tantos entardeceres em que pude observar o pôr-do-sol - e por todas as vezes em que vi os ipês amarelos florirem - entre um experimento e outro, de ângulos lindos pelas paredes de vidro do laboratório. Meu coração transborda gratidão e, assim como cada pôr-do-sol e cada florir de um ipê são únicos e especiais, tão única e bela foi essa pós-graduação. Marcada por ciclos, superações, emoções, amadurecimento e uma vista de fazer os olhos brilharem.

“[...] Sinto-me nascido a cada momento
para a eterna novidade do Mundo.”

(Alberto Caeiro, 1946)

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	xii
Lista de abreviaturas	xiv
Resumo	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia do <i>diabetes mellitus</i> e da doença renal diabética.....	1
1.2 Podócitos.....	2
1.3 Autofagia e via mTOR: importância e alterações na doença renal diabética.....	3
1.4 Klotho: possível estratégia terapêutica para doença renal diabética	6
1.5 Diretrizes para a terapia da doença renal diabética	7
1.6 Inibidores do cotransportador de sódio e glicose do tipo 2.....	7
1.7 Terapia da doença renal diabética com células-tronco mesenquimais	9
1.8 Modelos murinos de <i>diabetes mellitus</i>	11
1.9 Objetivos.....	13
2 MÉTODOS	15
2.1 Local do estudo	15
2.2 Aspectos éticos e legais	15
2.3 Células-tronco mesenquimais	15
2.4 Camundongos BTBR ^{ob/ob}	16
2.5 Análise metabólica e de função renal.....	19
2.5.1 Coleta de urina	19
2.5.2 Coleta de plasma para quantificação de creatinina	20
2.5.3 Glicemia de jejum	20
2.6 Análises de <i>Western blot</i>	20
2.7 Análises da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real via transcrição reversa (RT-qPCR)	21
2.8 Imunohistoquímica	22
2.9 Análise dos resultados.....	23
3 RESULTADOS	24
3.1 Dados funcionais	24

3.1.1	Análise de glicemia, peso e consumo	24
3.1.2	Análise da diurese, taxa de filtração glomerular e albuminúria.....	26
3.2	Análise de expressão gênica de marcadores da autofagia, via mTOR e Klotho	28
3.2.1	Expressão gênica dos marcadores em relação ao animal BTBR ^{ob/ob}	28
3.3	Expressão proteica dos marcadores	31
3.3.1	Análise da expressão de LC3.....	31
3.3.2	Análise da expressão de LC3 em 6 semanas	33
3.4	Análise da expressão de LC3 através de Imunohistoquímica	35
3.4.1	Expressão cortical total de LC3	35
3.4.2	Expressão glomerular de LC3	35
3.4.3	Expressão medular de LC3	35
3.5	Expressão proteica de s6 fosforilada.....	39
3.5.1	Expressão da <i>ribosomal s6 kinase</i> fosforilada em 6 semanas	40
3.6	Expressão proteica cortical total de Klotho por meio de <i>Western blot</i>	41
3.6.1	Correlação entre <i>micotubule-associated protein light chain 3</i> e Klotho	42
3.7	Análises da expressão de Klotho por meio de Imunohistoquímica.....	43
3.7.1	Expressão cortical total de Klotho	43
3.7.2	Expressão glomerular de Klotho.....	43
3.7.3	Expressão medular de Klotho.....	44
3.7.4	Correlação entre o estresse oxidativo e a expressão de Klotho	48
3.8	Resumo das correlações	52
4	DISCUSSÃO	53
5	CONCLUSÕES	62
6	REFERÊNCIAS	64
	Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. Esquema representativo simplificado das implicações moleculares da hiperglicemia nos desfechos clínicos apresentados na doença renal diabética	6
Figura 2. Mecanismo de ação da empagliflozina.....	9
Figura 3. Esquema representativo da hipótese central do projeto.....	13
Figura 4. Esquema representativo do delineamento experimental in vivo	18
Figura 5. Análise de peso e consumo de ração em camundongos BTBR ^{ob/ob} e WT	26
Figura 6. Análise de dados funcionais renais de camundongos BTBR ^{ob/ob}	28
Figura 7. Análise da expressão gênica, por meio de RT-qPCR, de marcadores das vias da autofagia, mTOR e de Klotho em camundongos BTBR ^{ob/ob} e WT	30
Figura 8. Análise da expressão proteica cortical de LC3 em camundongos BTBR ^{ob/ob} e WT	32
Figura 9. Análise da expressão proteica cortical basal de LC3 em camundongos BTBR ^{ob/ob}	34
Figura 10. Análise da expressão cortical total de LC3 em camundongos BTBR ^{ob/ob} e WT	36
Figura 11. Análise da expressão glomerular de LC3 em camundongos BTBR ^{ob/ob} e WT	37
Figura 12. Análise da expressão medular de LC3 em camundongos BTBR ^{ob/ob} e Wild Type	38
Figura 13. Análise da expressão proteica cortical de s6 fosforilada em camundongos BTBR ^{ob/ob} e WT	39
Figura 14. Análise da expressão proteica cortical basal de s6 fosforilada em camundongos BTBR ^{ob/ob}	40
Figura 15. Análise da expressão proteica cortical de Klotho em camundongos BTBR ^{ob/ob} e WT	42
Figura 16. Correlação entre a razão de LC3 e a expressão proteica de Klotho em camundongos BTBR ^{ob/ob}	43
Figura 17. Análise da expressão cortical total de Klotho em camundongos BTBR ^{ob/ob}	45
Figura 18. Análise da expressão glomerular de Klotho em camundongos BTBR ^{ob/ob}	46
Figura 19. Análise da expressão medular de Klotho em camundongos BTBR ^{ob/ob}	47

Figura 20. Reanálise do dado publicado pelo grupo do estresse oxidativo tecidual através da imunohistoquímica de 4-HNE em camundongos BTBR ^{ob/ob}	49
Figura 21. Correlação entre expressão de Klotho cortical e estresse oxidativo cortical em camundongos BTBR ^{ob/ob}	50
Figura 22. Correlação entre expressão de Klotho glomerular e estresse oxidativo cortical em camundongos BTBR ^{ob/ob}	51
Figura 23. Correlação entre expressão de Klotho medular e estresse oxidativo medular em camundongos BTBR ^{ob/ob}	51
Figura 24. Esquema simplificado representativo das discussões e conclusões do trabalho em cada grupo experimental do estudo.....	60
Figura 25. Esquema simplificado da representação da autofagia no modelo BTBR ^{ob/ob} sem intervenção e com tratamento de empagliflozina, restrição calórica e CTMs	61

Lista de abreviaturas

AAALAC	<i>Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care</i>
AKT	<i>Protein kinase B</i>
ARM	Antagonistas do receptor mineralocorticoide
BTBR	<i>Black and tan brachyury</i>
BTBR ^{ob/ob}	<i>Black and tan brachyury obese</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CETEC	Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia
CTMs	Células-tronco mesenquimais
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DRD	Doença renal diabética
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESRD	<i>End-stage renal disease</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
iSGLT2	Inibidor de SGLT2
LC3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain</i>
MSCs	<i>Mesenchymal stem cells</i>
mTmG	<i>Membrane-localized tdTomato – membrane-localized green fluorescent protein</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
p62/SQSTM1	<i>Sequestosome-1</i>
pb	Pares de base
PGA	Produtos de glicação avançada
pH	Potencial hidrogeniônico
RT-qPCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i>
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
Rictor	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
s6	<i>Ribosomal protein s6</i>
S6K	<i>Ribosome S6 kinase</i>

SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SGLT2	<i>Sodium-glucose co-transporter 2</i>
SPF	<i>Specific pathogen-free</i>
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
WT	<i>Wild type</i>

Resumo

Introdução: A doença renal diabética é a principal causa de doença renal crônica em estágio final no mundo, sendo caracterizada por danos nos diferentes compartimentos renais, em especial, nos podócitos. A desregulação das vias da autofagia e da mTOR são alguns de seus mecanismos fisiopatológicos. Além disso, a expressão reduzida de Klotho – uma proteína renoprotetora – também tem sido associada à essa condição. Nesse sentido, a terapia celular com células-tronco mesenquimais, em sinergia à empagliflozina e à restrição calórica, pode representar uma abordagem eficaz e inovadora para o tratamento desta doença. **Objetivo:** Avaliar o potencial da terapia celular com células-tronco mesenquimais originárias da medula óssea na modulação da autofagia e expressão de Klotho, em sinergia à empagliflozina e à restrição calórica na doença renal diabética. **Métodos:** Como modelo experimental *in vivo*, utilizamos camundongos machos da linhagem BTBR^{ob/ob} com 14-15 semanas e 18-20 semanas de idade. Este é um modelo *knockout* para o gene da leptina; assim, trata-se de um animal obeso que desenvolve *diabetes mellitus* e doença renal diabética, apresentando hiperglicemia e proteinúria de forma tempo-dependente. Os animais foram divididos nos seguintes grupos e tratamentos: BTBR^{ob/ob} (sem tratamento), Empagliflozina, restrição calórica (grupo que recebeu empagliflozina aliada à restrição calórica de 30% em relação ao Grupo Empagliflozina e injeção de salina), restrição calórica + células-tronco mesenquimais (grupo tratado com empagliflozina, restrição calórica e células-tronco mesenquimais). Ao longo do acompanhamento, os animais tiveram sua glicemia de jejum avaliada quinzenalmente, e foram pesados três vezes na semana, sendo esta frequência alterada para pesagem diária posteriormente. Ademais, foi realizada a coleta de urina de todos os animais, a partir da utilização da gaiola metabólica. Ao final do acompanhamento, os animais foram submetidos à eutanásia por overdose anestésica e seus tecidos coletados para análises de expressão gênica, através da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, expressão proteica, através de *Western blot* e análises histológicas, através da imunohistoquímica de LC3 e Klotho. As células-tronco mesenquimais utilizadas compunham o nosso banco biológico, tendo sido obtidas pelo nosso grupo a partir de camundongos Rosa26 mTmG e, previamente, caracterizadas. **Resultados:** A terapia com células-tronco mesenquimais se mostrou eficaz para a redução da glicemia neste modelo animal, embora com tempo limitado. Ela também

atenuou a hiperativação autofágica característica dos estágios iniciais da doença renal diabética – presente em nosso modelo. Por fim, o grupo de terapia celular apresentou maior expressão da proteína Klotho e esta se correlacionou, inversamente, ao estresse oxidativo cortical e medular. A expressão de S6 fosforilada também se apresentou reduzida nessa abordagem terapêutica, sugerindo a modulação da via mTOR.

Conclusão: A autofagia e via mTOR são moduladas pelas células-tronco mesenquimais em combinação à empagliflozina e restrição calórica. Além disso, estes efeitos estão, potencialmente, associados à expressão de Klotho, embora a elucidação deste ponto necessite de estudos futuros complementares.

Descritores: Autofagia; Nefropatias diabéticas; Células-tronco mesenquimais; Proteínas Klotho

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do *diabetes mellitus* e da doença renal diabética

Estima-se que, mundialmente, 589 milhões de pessoas convivam com o *diabetes mellitus* (DM), sendo que, em 2024, aproximadamente 3 milhões de mortes foram associadas à esta doença, segundo a Federação Internacional do Diabetes.⁽¹⁾ Quanto à população brasileira, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes e o Ministério da Saúde, o DM tipo 2 (DM2) afeta cerca de 6,9% de indivíduos,⁽²⁾ sendo este tipo de diabetes o predominante em 90% dos pacientes diabéticos no país.⁽²⁾ Esta desordem metabólica tem etiologia multifatorial, sendo a obesidade um de seus importantes fatores de risco.⁽²⁾ Esta condição está associada a altas taxas de hospitalizações e a impactos financeiros para os pacientes e seus familiares, bem como para o sistema de saúde. O DM resulta em complicações, tais como retinopatia, doenças cardiovasculares e, o tema principal deste trabalho, a doença renal diabética (DRD).⁽³⁾ Constituindo a principal causa de doença renal em estágio final (ESRD - *end-stage renal disease*) mundialmente, a DRD contribui para o aumento dos casos de morbimortalidade, sobretudo por estar associada a complicações cardiovasculares.⁽⁴⁾ Sendo uma doença crônica, a prevalência de DRD tem aumentado com o passar dos anos, especialmente devido ao envelhecimento da população⁽⁵⁾ e ao aumento da prevalência de DM.

Os mecanismos fisiopatológicos de desenvolvimento e progressão da DRD ainda não estão completamente elucidados, mas estão relacionados, dentre outros aspectos, à hiperglicemia e glicotoxicidade sistêmicas características da doença.⁽⁶⁾ Estas resultam, por exemplo, no acúmulo de produtos de glicação avançada (PGA), no estresse oxidativo e na inflamação.⁽⁷⁾ Ademais, há alterações hemodinâmicas e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) no DM, resultando em hipertensão glomerular, além da hiperfiltração glomerular.⁽⁷⁾ A vasoconstrição da arteríola eferente pela Angiotensina-II contribui para a elevação da pressão intraglomerular, que, então, sobrecarrega o glomérulo, contribuindo para sua atrofia e consequente sobrecarga de demais glomérulos.⁽⁸⁾ Esta hipertensão glomerular, em conjunto à hiperglicemia, também contribui para a liberação de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, como a interleucina-1 (IL-1) e *transforming growth factor*- β (TGF- β), de diversas fontes, tais quais das próprias células vasculares, macrófagos residentes e células renais.⁽⁹⁾

As alterações descritas anteriormente favorecem as anormalidades histológicas e funcionais glomerulares observadas na DRD. Dentre elas, encontram-se o espessamento da membrana basal glomerular e tubular, expansão da matriz mesangial, glomeruloesclerose – isto é, acúmulo de matriz extracelular no glomérulo - além de perda de podócitos. Consequentemente, ocorre a redução da taxa de filtração glomerular e albuminúria,⁽¹⁰⁾ dentre outras manifestações clínicas, e a necessidade de diálise, ou transplante renal, pelo paciente.⁽¹¹⁾

1.2 Podócitos

Os podócitos são células epiteliais terminalmente diferenciadas. Eles apresentam prolongamentos citoplasmáticos, os pedicelos, e à interação de protusões podocitárias entre podócitos adjacentes dá-se o nome de fenda diafragmática.⁽¹²⁾ Estas células compõem funcional e estruturalmente a barreira de filtração glomerular, juntamente às células endoteliais e à membrana basal glomerular, sendo que o funcionamento adequado dessa estrutura depende, dentre outros fatores, da integridade morfológica e funcional podocitária.⁽¹³⁾ Ademais, eles também desempenham funções como o suporte estrutural dos capilares glomerulares e a regulação da taxa de filtração glomerular.⁽¹⁴⁾

As proteínas alfa-actinina-4, actina e sinaptopodina são de fundamental importância para a morfologia podocitária. Há, também, as proteínas da fenda diafragmática e que participam da interação de podócitos entre si e com a matriz extracelular, como a nefrina e podocina. Estas interações são importantes para a sobrevivência, adesão celular e organização do citoesqueleto.⁽¹⁵⁾ Deve-se enfatizar a necessidade da manutenção da arquitetura do podócito para sua função, de modo que, mesmo se suas proteínas foram adequadamente expressas, caso não estejam localizadas corretamente, haverá comprometimento da função podocitária.⁽¹²⁾

Devido à ausência da capacidade proliferativa podocitária, lesões nestas células favorecem a disfunção da barreira de filtração glomerular, o que resulta na proteinúria e glomeruloesclerose, por exemplo. Na DRD, os podócitos são alvos de injúrias, sendo a diminuição em seu número presente na progressão da doença,⁽¹³⁾ além de sua disfunção devido à simplificação/retração de seus pedicelos, denominada *foot process effacement*.⁽¹⁶⁾ Dessa forma, estratégias que contribuam para a preservação da função podocitária são de suma importância para preservação da função renal.

1.3 Autofagia e via mTOR: importância e alterações na doença renal diabética

A autofagia é um processo catabólico no qual componentes intracelulares, como proteínas e organelas, são degradados.⁽¹⁷⁾ Esta é uma via, evolutivamente, conservada e regulada por 32 proteínas, denominadas *autophagy related genes* (Atg).⁽¹⁸⁾ Dentre os três tipos existentes de autofagia (macro e microautofagia, e autofagia mediada por chaperonas), o objeto de estudo neste trabalho é a macroautofagia, sendo que o termo “autofagia” será utilizado, a partir deste ponto, para se referir a este processo.

A iniciação da via se dá pela formação do fagóforo, uma estrutura dupla-membrana. Ao longo do seu amadurecimento, a proteína *microtubule-associated protein light chain 3* (LC3) é processada e inserida à esta estrutura, formando o autofagossomo. Deve-se ressaltar que a LC3 é clivada, inicialmente, em LC3-I, a qual, mais adiante, é convertida à LC3-II.⁽¹⁸⁾ Esta última forma de LC3 é aquela inserida no fagóforo, sendo, portanto, este marcador e a razão LC3-I/LC3-II maneiras importantes e comumente utilizadas para avaliação do fluxo autofágico. Por fim, o autofagossomo se funde aos lisossomos, originando a estrutura denominada autofagolisossomo, onde a degradação intracelular ocorre. Nesse sentido, outra proteína que deve ser mencionada é a *sequestosome-1* (p62/SQSTM1). Ela se trata de uma proteína adaptadora que permite a interação da carga a ser degradada com o autofagolisossomo.⁽¹⁸⁾ Assim, estas proteínas são importantes marcadores autofágicos, de modo que altos níveis de LC3-II – um marcador de autofagossomos - concomitantemente a baixos níveis de p62 – um marcador de fluxo autofágico - são esperados diante da autofagia ativa, na qual há a degradação dos autofagossomos. A alta expressão de LC3-II em conjunto a altos níveis de p62, por outro lado, denotam o bloqueio da via em suas etapas finais, no qual ocorre acúmulo tanto de autofagossomos quanto de material a ser degradado.⁽¹⁹⁾

O desequilíbrio da via autofágica se faz presente desde o estágio inicial da DRD⁽²⁰⁾ e contribui para os desfechos observados nesta patologia. A deficiência autofágica, por exemplo, tem sido associada ao aumento do estresse oxidativo, além da inflamação e fibrose, no cenário da DRD.^(21,22) Interessantemente, mesmo em células renais saudáveis, a inibição da autofagia resultou em maior atividade de TGF- β e deposição de colágeno.⁽²³⁾

Em modelos animais de obesidade, por exemplo, o menor fluxo

autofágico elevou as lesões túbulointersticiais.⁽²⁴⁾ Apesar dos podócitos, em condições fisiológicas, apresentarem elevados níveis de autofagia,⁽²⁰⁾ dados na literatura evidenciam que a função desta via não é completamente elucidada nos diferentes tipos celulares renais.⁽²⁴⁾ Revisões recentes têm fortalecido esse ponto ao discutirem a função dual autofágica – protetora ou danosa – nos diferentes compartimentos renais.⁽²⁵⁾ Trabalhos experimentais têm demonstrado que, na lesão renal aguda, a via autofágica é ativada, porém, diante de sua ativação persistente, há indução de fibrose tubular, bem como inflamação intersticial e morte celular.^(22,26)

Sabe-se que, dentre as vias regulatórias da autofagia, a *mammalian target of rapamycin* (mTOR) é a principal, inibindo a iniciação da via autofágica.⁽²⁷⁾ Esta via participa, principalmente, na detecção de nutrientes e forma dois complexos funcionais distintos - *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) e *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2). O primeiro é associado à diferenciação e crescimento celular; o segundo, à reorganização do citoesqueleto e proliferação celular,⁽²⁸⁾ embora sua função ainda seja pouco esclarecida. A via mTORC1, sensível à rapamicina e principal responsável pela inibição da autofagia, é composta, dentre outros elementos, pela proteína *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor), a qual permite, indiretamente, a fosforilação de alvos da mTORC1, como a *ribosomal protein S6 kinase* (S6K), além de regular a localização do complexo mTORC1. A via mTORC2, por sua vez, insensível à rapamicina, é composta, dentre outros elementos, pela *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor), proteína ligante do complexo mTORC2. Dentre os efeitos de sinalização desta via, encontra-se a ativação de *protein kinase B* (AKT), proteína que participa da regulação do metabolismo e crescimento celular.⁽²⁹⁾ Estudos demonstram que a redução da expressão de mTORC2 está relacionada à consequências negativas na morfologia celular.^(30,31)

Considerando-se o cenário da DRD, a literatura evidencia que a hiperativação da via mTOR esteja presente em podócitos desde estágios precoces na doença,^(17,32) o que contribui para a elevação do estresse oxidativo intracelular, por exemplo, devido à menor remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela via autofágica.⁽³³⁾ Além disso, este fato também leva a desfechos como proteinúria, perda podocitária e expansão da área mesangial.^(12,32) A inibição da via mTOR, por outro lado, tem sido relacionada à redução da perda podocitária, bem como de danos histológicos e funcionais, sugerindo que esta possa ser uma estratégia para a prevenção das lesões renais desenvolvidas no DM.^(12,32,33) Adicionalmente, em podócitos, trabalhos indicam

que mTORC2 pode ter a alfa-actinina-4 como alvo, levando à recuperação do citoesqueleto diante de sua *upregulation*, isto é, aumento de sua expressão, em modelos de lesão renal.⁽³⁴⁾ Além disso, a ativação da autofagia e rearranjo do citoesqueleto podocitário através da via mTORC2 em modelos de lesão renal também já foi constatada.⁽³⁵⁾

Há evidências, portanto, de que as vias mTORC1 e 2 tenham efeitos sinérgicos nas lesões podocitárias quando desreguladas, mesmo diante do fato de suas ativações ocorrerem de formas independentes,⁽³³⁾ sendo o equilíbrio entre essas vias importante para a homeostase dos podócitos.⁽³⁵⁾ Deve-se destacar, porém, a importância de ambas as vias para o desenvolvimento renal desde estágios embrionários,⁽³⁶⁾ bem como os efeitos deletérios de sua inibição a depender do momento e contexto da DRD. A deleção de Rictor podocitário em um modelo murino, por exemplo, resultou em maior albuminúria diante do aumento de ingesta proteica pelo animal, conforme descrito por Godel et al., apontando para a relevância de mTORC2 diante do estresse podocitário.⁽³⁷⁾ Este mesmo grupo de pesquisa também realizou o *knockout* podocitário simultâneo de Raptor e Rictor e demonstrou o desenvolvimento renal deficiente, paralelamente à proteinúria, glomeruloesclerose e mortalidade precoce dos animais. Por outro lado, também há um estudo pré-clínico com modelo murino de lesão renal aguda em que foi constatada a modulação da via TGF- β , contribuindo para a fibrose intersticial, pela via de Rictor/mTORC2.⁽³⁸⁾

Em conjunto, os dados ressaltam a dinamicidade das vias, bem como a necessidade de sua elucidação, permitindo que constituam alvos terapêuticos para o tratamento da DRD. O uso de rapamicina, inibidor de mTORC1, por exemplo, restaura a morfologia e função podocitárias.⁽¹²⁾ Apresenta, contudo, diversos efeitos nefrotóxicos uma vez que danos estruturais podocitários já estejam estabelecidos.⁽³⁷⁾ Esta observação, somada à ausência de inibidores seletivos para mTORC2 e divergência nos achados experimentais acerca da ativação das vias a depender do compartimento renal e estágio da DRD considerado fortalece a relevância de estudos pré-clínicos neste cenário, como o atual trabalho. Compreender a modulação das vias possibilita abordagens terapêuticas inovadoras e sinérgicas às atuais.

Na figura 1, pode-se observar, de forma simplificada, as vias mencionadas no contexto hiperglicêmico.

anti-senescência e ser protetiva diante dos danos renais causados pela ativação do SRAA.⁽⁴²⁾

A DRD é uma condição em que a expressão de Klotho se encontra reduzida,⁽⁵⁾ conforme detectado na urina e plasma de pacientes.⁽⁴⁵⁾ Este fato acompanha o declínio da função renal e está relacionado às complicações extrarrenais do DM, presente desde estágios precoces da doença renal. A proteína Klotho, então, pode ser utilizada como um biomarcador precoce de DRD⁽⁴⁶⁾ e indicador de doença renal.⁽⁴⁰⁾

Paralelamente, segundo a literatura e conforme revisado pelo nosso grupo, a indução ao aumento de níveis de Klotho endógenos ou sua administração exógena podem melhorar o funcionamento renal,⁽³⁹⁾ o que a caracteriza como um potencial alvo terapêutico na DRD.

1.5 Diretrizes para a terapia da doença renal diabética

As diretrizes atuais para o tratamento da DRD se baseiam na terapia multifacetada da doença, visando o retardo de sua progressão. A saber, no âmbito não-farmacológico, a mudança nos hábitos de vida do paciente, como controle alimentar e de peso, prática regular de exercícios físicos e a interrupção do hábito de fumar são essenciais. Farmacologicamente, são quatro os pilares de tratamento desta condição, sendo eles, o uso dos inibidores do SRAA, inibidores do *sodium-glucose co-transporter 2* (SGLT2), antagonistas não esteroidais do receptor mineralocorticoide – em destaque, a finerenona – e os agonistas do receptor *glucagon-like peptide-1* (GLP-1).^(47,48)

1.6 Inibidores do cotransportador de sódio e glicose do tipo 2

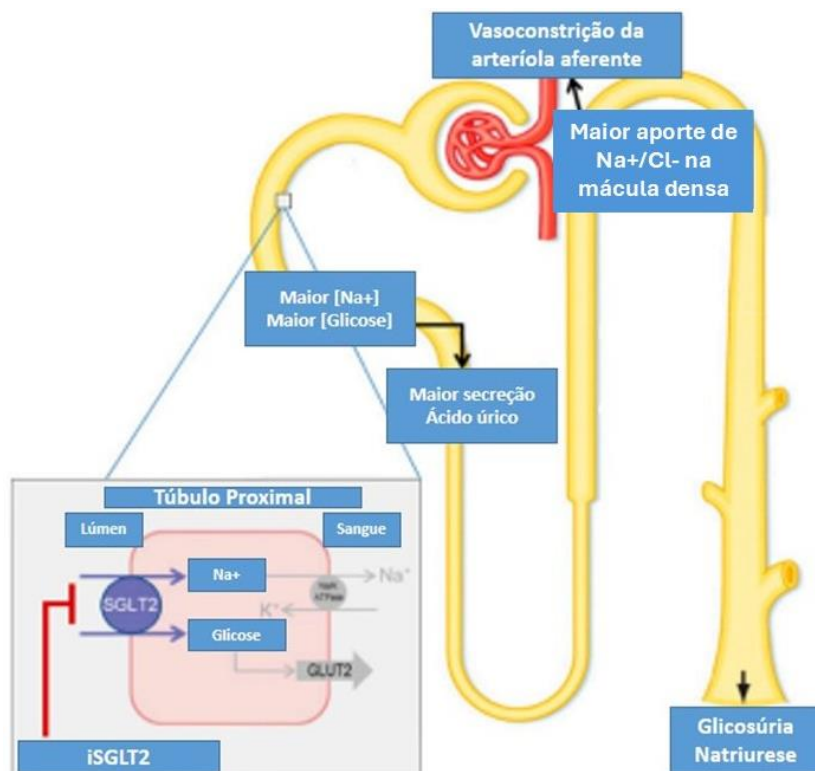
Os inibidores do cotransportador SGLT2 (iSGLT2) representaram um avanço no tratamento da DRD. Seu mecanismo de ação, representado na figura 2, consiste na inibição da reabsorção de glicose e sódio nos túbulos proximais, o que leva à glicosúria, acompanhada pela natriurese, permitindo o controle dos níveis glicêmicos do paciente. Estes medicamentos, portanto, resultam na diminuição da glicotoxicidade local e sistêmica. Contribuem, assim, para a redução do estresse oxidativo, inflamação e fibrose presentes na DRD associados à hiperglicemia e hiperfiltração de glicose

constantes nesta doença.⁽⁴⁹⁾ A empagliflozina se trata de um iSGLT2 de surgimento recente e possui efeitos renoprotetores potentes, resultando em menores taxas de macroalbuminúria e atenuação da hiperfiltração glomerular,⁽⁵⁰⁾ além de redução da pressão intraglomerular.

Além dos efeitos hemodinâmicos, tais quais redução da pressão arterial e da rigidez de artérias, os iSGLT2 possuem, também, efeitos não hemodinâmicos, como propriedades antifibróticas no coração.⁽⁵¹⁾ Nesse sentido, estudos clínicos com a empagliflozina como o EMPA-REG-OUTCOME, EMPEROR-*Reduced* e o EMPA-Kidney, em pacientes com DM e doenças cardiovasculares associadas, demonstraram que o fármaco reduziu as taxas de hospitalização e mortalidade por doença cardiovascular relacionada a essa doença.⁽⁵²⁻⁵⁴⁾ Esses fármacos, portanto, melhoram, também, a condição cardíaca do paciente; é válido ressaltar que, conforme mencionado anteriormente, as doenças cardiovasculares são uma das principais complicações da DRD, contribuindo para a mortalidade dos pacientes nesta condição.

A eficácia do tratamento com a empagliflozina, entretanto, depende da taxa de filtração glomerular (eGFR - *estimated glomerular filtration rate*) apresentada pelo indivíduo, pois seus efeitos dependem da filtração nos glomérulos.⁽⁵⁵⁾ Ademais, há, também, alguns possíveis eventos adversos no seu uso, como maior risco de infecções do trato genitourinário, cetoacidose diabética euglicêmica e hipovolemia em indivíduos idosos e com fatores de predisposição.⁽⁵⁶⁾ Apesar desses aspectos, a empagliflozina é segura para o organismo, sendo um desafio atual no tratamento da DRD o fato deste fármaco não recuperar estruturas renais já danificadas em decorrência da doença até o momento de início da terapia medicamentosa.

Diante deste cenário, é necessário o estudo de novas abordagens terapêuticas para a redução da progressão da DRD que atuem em sinergia com a empagliflozina, potencializando os efeitos positivos da terapia para o paciente.



SGLT2: sodium-glucose cotransporter 2; iSGLT2: inibidor de SGLT2; Na⁺: sódio; Cl⁻: cloreto; K⁺, potássio.

Fonte: Traduzido e adaptado van Bommel EJ, Muskiet MH, Tonneijck L, Kramer MH, Nieuwdorp M, van Raalte DH. SGLT2 Inhibition in the diabetic kidney-from mechanisms to clinical outcome. Clin J Am Soc Nephrol. 2017;12(4):700-10. Figure 2. The SGLT2 inhibitors affect multiple sites in the diabetic kidney; p. 704.⁽⁵⁶⁾

Figura 2. Mecanismo de ação da empagliflozina

1.7 Terapia da doença renal diabética com células-tronco mesenquimais

Estas abordagens terapêuticas são promissoras. Entretanto, não são capazes de restaurar as estruturas já lesionadas até o momento de início do tratamento. Assim, torna-se relevante o estudo de novas abordagens terapêuticas para a DRD que atuem em sinergismo com as opções terapêuticas já utilizadas. Dentre as novas abordagens, destacam-se as células-tronco mesenquimais (CTMs).

Com capacidade de diferenciação em condrócitos, adipócitos e osteócitos,⁽⁵⁷⁾ as CTMs apresentam propriedades angiogênicas, assim como de reconhecimento do tecido lesionado através de seus receptores. Estas células são imunomodulatórias e, além de interagirem com outras células fisicamente, liberam moléculas como citocinas e fatores de crescimento, dentre outros componentes, relacionadas a sua imunomodulação e reparação de tecidos lesionados.⁽⁵⁸⁾ Ademais, as

CTMs liberam, também, vesículas extracelulares, contendo, por exemplo, miRNAs; deste modo, seu secretoma é importante para seu potencial imunomodulatório e de estímulo à sobrevivência celular.⁽⁵⁹⁾ Outro ponto relevante a ser discutido é que as vesículas secretadas pelas CTMs também apresentam capacidade de modular o estresse oxidativo, levando a sua redução.^(60,61)

Estudos em modelos animais têm demonstrado a utilização das CTM em terapias para doenças renais agudas e crônicas, com redução das lesões características nos rins. Uma metanálise com quarenta estudos pré-clínicos, por exemplo, demonstrou a melhora dos parâmetros renais relacionados ao desenvolvimento da DRD, tais como redução de glomeruloesclerose, hipertrofia glomerular, fibrose, estresse oxidativo e inflamação.⁽⁶²⁾ Além disso, quando cultivadas com podócitos em hiperglicose - condição similar à DRD - as CTMs promovem redução da apoptose e elevação do fluxo autofágico nessas células, ao passo que inibem a via mTOR.⁽⁶³⁾ Em relação às células epiteliais tubulares, nas mesmas condições descritas previamente, as CTMs induzem a redução de apoptose e o aumento da expressão de Klotho.⁽⁶⁴⁾

É importante mencionar que as CTMs vêm sendo utilizadas e analisadas em estudos clínicos para outras doenças, como cardiomiopatias. Uma metanálise de trinta e um estudos clínicos – totalizando 1521 participantes - envolvendo falência cardíaca, por exemplo, demonstrou a melhora em parâmetros cardíacos com a terapia celular, como melhora na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, apesar das limitações do estudo.⁽⁶⁵⁾ Igualmente, um estudo conduzido com trinta pacientes com cardiomiopatia isquêmica tratados com CTMs demonstrou melhoras em parâmetros ventriculares e de cicatrização nos locais de aplicação da terapia celular (aplicação transendocardial).⁽⁶⁶⁾ As CTMs têm se demonstrado seguras, como mencionado nestes trabalhos e, também, em outras revisões de grande porte, como a revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos *SafeCell*.⁽⁶⁷⁾ Nela, as células foram associadas à febre transiente, porém, não houve correlação entre a infusão celular e toxicidade sistêmica, infecções e óbito, por exemplo. Considerando-se o cenário renal, uma metanálise recente avaliou trabalhos dos últimos dez anos acerca do uso de CTMs na DRD, através de seu impacto na taxa de filtração glomerular estimada (TFG). Budiman et al.⁽⁶⁸⁾ relataram os efeitos benéficos desta terapia em estudos controlados.

É importante ressaltar que todos estes trabalhos apresentam limitações, como necessidade de ampliação dos efeitos adversos avaliados e presença

de heterogeneidade entre os estudos clínicos, exigindo estudos futuros. Eles, entretanto, fortalecem o potencial das CTMs na clínica e servem como base essencial para o desenvolvimento de novas pesquisas, como este trabalho.

1.8 Modelos murinos de *diabetes mellitus*

As pesquisas do DM *in vivo* são de suma relevância para o estudo de novos alvos e/ou abordagens terapêuticas, bem como dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesta condição, no cenário da complexidade de um organismo vivo. Nesse sentido, existem alguns modelos, especialmente murinos, utilizados para este propósito, conforme revisado em meta-análises recentes.⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾

Brevemente, o DM pode se desenvolver nos animais por indução química ou alterações genéticas. Os camundongos da linhagem C57BL/6, por exemplo, podem apresentar mutações induzidas no gene do receptor da leptina – camundongos db/db – e são, amplamente, utilizados em estudos pré-clínicos.⁽⁷²⁾ Estes animais, entretanto, não reproduzem com grande similaridade as alterações histológicas renais desenvolvidas pelos humanos em tempo viável, como descrito por Hudkins et al.⁽⁷³⁾ Um trabalho, por exemplo, caracterizou a elevação da proteinúria nestes animais apenas entre 8 e 10 meses de idade.⁽⁷⁴⁾

Ainda no âmbito genético, os camundongos da linhagem C57BLKS/J também podem apresentar a mutação db/db e, dessa forma, desenvolverem DM de forma mais acelerada do que o modelo C57BL/6. Ainda assim, sua albuminúria se torna evidente em 12 semanas⁽⁷⁵⁾ e o modelo também apresenta variabilidade genética marcada por alelos de outras linhagens, o que contribui para possíveis fatores de confusão no estudo fisiopatológico da DM.⁽⁷⁶⁾

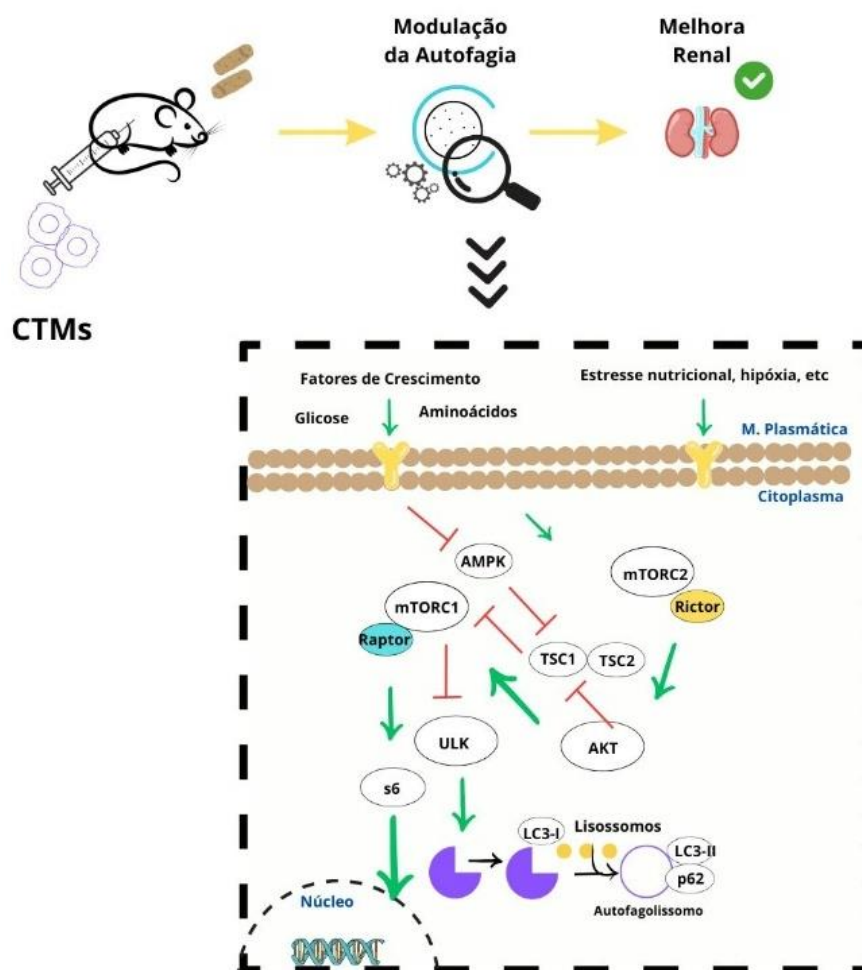
A dieta rica em gordura, aliada ou não a injeções da glicosamina estreptozotocina (STZ), também é uma forma de indução de DM neste modelo. É importante mencionar que a STZ por si só é nefrotóxica e induz lesão renal aguda,⁽⁷⁷⁾ exigindo padronização da dose administrada e podendo ser um fator de confusão nos dados obtidos.

Diante dessas limitações – principalmente, no âmbito de similaridade com a fisiopatologia humana e seu desenvolvimento em tempo viável nos animais,⁽⁷⁸⁾ um modelo murino importante para o estudo da DRD *in vivo* é o camundongo linhagem BTBR

com mutação *ob/ob* - *knockout* para o gene do hormônio leptina. Estes animais, caracterizados por Clee et al.⁽⁷⁹⁾ e com a DRD caracterizada por Hudkins et al.⁽⁷³⁾ apresentam resistência à insulina, além de hiperglicemia e proteinúria que se desenvolvem de forma tempo-dependente.⁽⁷³⁾ Ademais, apresentam obesidade e comprometimento extrarrenal, como no fígado, por exemplo. Histologicamente, estes animais apresentam as características típicas da DRD, como hipertrofia glomerular, expansão de matriz mesangial severa, infiltração inflamatória e perda podocitária, embora os mecanismos que levem a este último desfecho ainda estejam em avaliação.⁽⁷³⁾ Em comparação a outros modelos animais utilizados nos estudos pré-clínicos da DRD, esta linhagem apresenta a progressão mais rápida da doença e com severidade similar aos humanos, sendo, por isso, o modelo animal mais robusto disponível atualmente para o estudo da doença em questão.

Diante do aumento da prevalência de DM devido ao envelhecimento populacional e elevação da obesidade, a terapia celular torna-se aliada como potencial tratamento da DRD, em sinergia a outras abordagens terapêuticas já realizadas. Esta terapia visa a melhora na qualidade de vida e sobrevivência dos pacientes a partir da atenuação dos danos renais. Nesse sentido, estudos pré-clínicos, como o presente trabalho, têm grande relevância por permitirem o fornecimento de dados, principalmente sobre mecanismos fisiopatológicos, para estudos futuros. Ademais, a literatura tem demonstrado como a desregulação da autofagia está presente em diversas patologias, principalmente, em células com baixa/ausência de capacidade proliferativa, tais como os podócitos. Além disso, ainda não há informações acerca deste tópico no modelo animal utilizado, caracterizado por sua robustez.

A terapia com CTMs, aliada à empagliflozina e à restrição calórica, possui potencial para reduzir a hiperativação autofágica na DRD, contribuindo para sua atenuação (Figura 3).



Pretende-se investigar se a terapia com células-tronco mesenquimais, aliada à empagliflozina e à restrição calórica, é capaz de modular a autofagia, com participação da via mTOR no processo, para a manutenção da morfologia e função podocitárias. Esta modulação potencializaria o retardo da progressão da DRD promovido pelas terapias padrão-ouro disponíveis atualmente. CTMs: células-tronco mesenquimais; mTORC1: *mammalian target of rapamycin complex 1*; mTORC2: *mammalian target of rapamycin complex 2*; AMPK: *AMP-activated protein kinase*; TSC1: *tuberous sclerosis complex 1*; TSC2: *tuberous sclerosis complex 2*; AKT: *protein kinase B*; ULK, *Unc-51-like kinases 1*; Raptor: *regulatory-associated protein of mTOR*; Rictor: *rapamycin-insensitive companion of mTOR*; s6: *s6 kinase*; LC3-I e LC3-II: *microtubule-associated protein 1 light chain 3*; p62: *sequestosome 1*.

Fonte: Elaborada com a ferramenta Canva. Disponível em: <https://www.canva.com/>

Figura 3. Esquema representativo da hipótese central do projeto

1.9 Objetivos

1. Avaliar o potencial da terapia celular com células-tronco mesenquimais obtidas da medula óssea, aliadas à empagliflozina e à restrição calórica, na modulação da autofagia *in vivo*, contribuindo para a atenuação da progressão da

doença renal diabética. Em camundongos BTBR^{ob/ob} tratados com empagliflozina, restrição calórica e administração de células-tronco mesenquimais de medula óssea, avaliar glicemia, albuminúria, taxa de filtração glomerular; avaliar a expressão renal de Klotho e de marcadores das vias da autofagia, a saber *microtubule-associated protein light chain 3* - LC3-I e LC3-II - e da via mTOR - como *ribosomal protein* - s6 - fosforilado, *regulatory associated protein of mTOR* – Raptor - *Raptor independent component of mTOR* - Rictor; avaliar a correlação entre os marcadores mencionados, bem como entre eles e os dados funcionais obtidos.

2 MÉTODOS

2.1 Local do estudo

O estudo foi realizado no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, do Hospital Israelita Albert Einstein. Os experimentos *in vivo*, incluindo intervenções e coletas, foram realizados no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC) do Hospital Israelita Albert Einstein, instituição certificada pela *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care* (AAALAC). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as boas práticas de uso de animais em experimentação, segundo padrões internacionais. Os animais foram alocados em um ambiente considerado estéril, denominado *specific pathogen-free* (SPF), com regulação da luminosidade (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro), temperatura, umidade, circulação de ar nas caixas e controle de ruído, além da utilização da paramentação adequada pela equipe de pesquisa e equipe técnica.

2.2 Aspectos éticos e legais

O registro, no Sistema Gerenciador de Projeto de Pesquisa (SGPP) sob o número 4845-21, e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Hospital Israelita Albert Einstein, sob número 4845-21, precederam seu início.

2.3 Células-tronco mesenquimais

As CTMs utilizadas foram extraídas previamente pelo grupo, constituindo nosso banco de células. Brevemente, conforme descrito por Sávio-Silva et al.,⁽⁸⁰⁾ as células foram extraídas da medula óssea femoral e tibial de camundongos Rosa 26/mTmG (Jackson Laboratories, JAX) na idade de 4 a 8 semanas e, posteriormente, cultivadas em meio DMEM/F12 contendo 20% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% de penicilina e estreptomicina (Invitrogen). Foram, então, caracterizadas por sua morfologia similar aos fibroblastos, pela aderência ao plástico em condições

padrão de cultura, imunofenotipagem por citometria de fluxo para análise da presença de moléculas de superfície CD29, CD90, CD105, CD44 e ausência de CD34, CD45 e CD31, e análise de multidiferenciação celular em adipócitos, condrócitos e osteócitos *in vitro*.⁽⁵⁷⁾

2.4 Camundongos BTBR^{ob/ob}

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BTBR, homozigotos para o *knockout* do gene da leptina, BTBR^{ob/ob}. Os animais foram obtidos da empresa *The Jackson Laboratory* (JAX stock #004824) e mantidos no biotério, com constante renovação das colônias. Conforme mencionado na sessão “1 Introdução”, este modelo animal desenvolve hiperglicemia e proteinúria de forma tempo-dependente, bem como obesidade e alterações renais histológicas. Os animais machos apresentam albuminúria e hiperglicemia significativas a partir da oitava semana de idade.⁽⁷³⁾

A administração de ração contendo empagliflozina (Jardiance®, Boehringer Ingelheim) na dose de 25mg/kg de ração/dia, começou na sexta semana de idade - conforme padronizado no estudo piloto do nosso grupo, período em que os animais apresentam aumento dos níveis glicêmicos.⁽⁷³⁾ A dose de empagliflozina já é utilizada na prática clínica, tendo em vista um de nossos objetivos experimentais de mimetizar este aspecto. A restrição calórica de 30% da quantidade de ração em relação ao Grupo Empagliflozina foi complementar ao uso deste iSGLT2⁽⁸¹⁾ e da terapia celular, tendo sido iniciada na quinta semana de idade dos animais para seu condicionamento. Deve-se ressaltar que esta abordagem foi escolhida tendo por base um trabalho realizado por Tanaka et al. com este modelo animal, em que a restrição calórica trouxe benefícios no controle glicêmico, bem como antioxidantes e anti-inflamatórios renais.⁽⁸¹⁾

A administração das CTMs foi realizada nos camundongos de 8 a 10 semanas de idade, com empagliflozina e restrição calórica. Os *vials* de células foram rapidamente descongelados; células com viabilidade igual ou superior a 80%, avaliada pelo método azul de Tripan, seguiram para utilização. Os camundongos receberam, com intervalo de uma a duas semanas, duas doses de 1.200.000 CTMs ressuspensas em soro fisiológico aquecido por via intraperitoneal, conforme já realizado em trabalhos prévios do grupo e observado benefícios como segurança e controle da hiperglicemia.^(80,82)

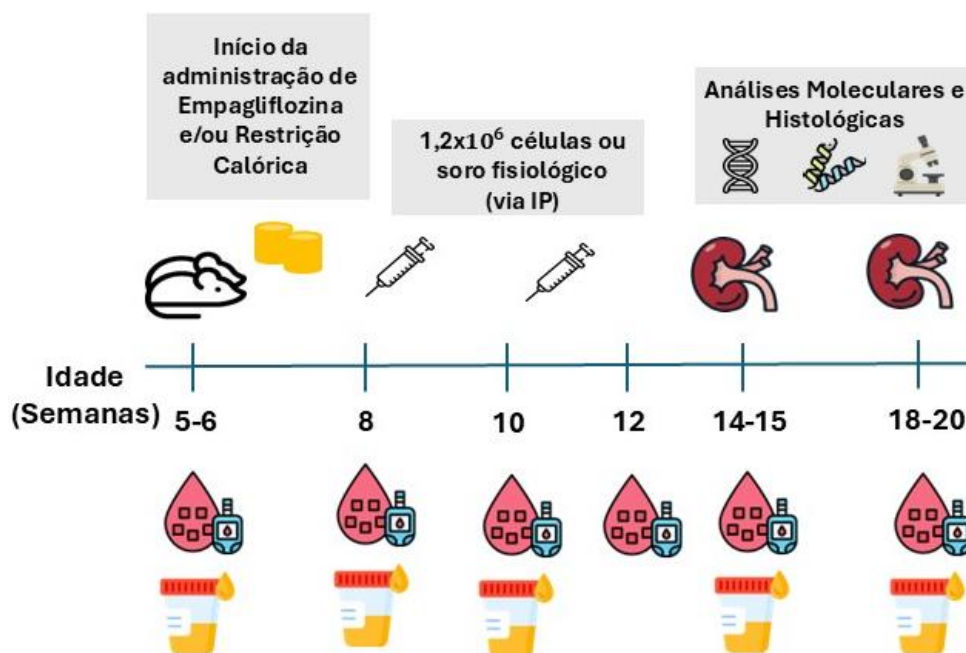
Os animais foram acompanhados até os *time-points* finais de 14 - 15 semanas e 18 - 20 semanas, com eutanásia realizada através da sobrecarga do anestésico inalatório isoflurano (Isoforine®, Cristália, Brasil). A eutanásia foi seguida pela perfusão dos animais com soro fisiológico e subsequente coleta dos rins dos animais. Como controle negativo, animais BTBR^{ob/ob} sem nenhuma intervenção terapêutica foram utilizados e acompanhados nos mesmos *time-points*.

Foram alocados, randomicamente, 6 animais em cada grupo, conforme representado na figura 4.

Baseado no princípio da ética em experimentação animal dos 4R's – redução, reposição, refinamento e responsabilidade – dados de animais *wild type* (WT) constituíam o repositório do grupo.

Os camundongos foram pesados três vezes na semana, medida que foi, posteriormente, refinada para pesagem diária. Ademais, devido à sensibilidade do modelo para acompanhamento a longo prazo, associada a características como hipotermia, possíveis infecções genito-urinárias e maior risco de desidratação devido ao aumento da diurese induzida pela empagliflozina, implementamos um *checklist* de avaliação diária de todos os animais em experimentação.⁽⁸³⁾ Mediante necessidade e após coletas de plasma, os animais foram reidratados com solução ringer-lactato por via dorsal.

A



B



(A) Esquema simplificado do protocolo de tratamento experimental, mensuração de glicemia e coleta de plasma e urina. (B) Representação dos grupos experimentais, a saber, (1) Grupo BTBR^{ob/ob} controle, denominado "BTBR^{ob/ob}"; (2) Grupo BTBR^{ob/ob} tratado com empagliflozina, denominado "empagliflozina"; (3) Grupo BTBR^{ob/ob} tratado com empagliflozina e restrição calórica de 30% em relação ao Grupo Empagliflozina e aplicação intraperitoneal de soro fisiológico, denominado "Restrição Calórica"; (4) Grupo BTBR^{ob/ob} tratado com empagliflozina, em restrição calórica e aplicação intraperitoneal de células-tronco mesenquimais, denominado "Restrição+CTMs". IP: Intraperitoneal.

Fonte: Elaborada com a ferramenta Canva. Disponível em: <https://www.canva.com/>

Figura 4. Esquema representativo do delineamento experimental *in vivo*

Os animais BTBR^{ob/ob} são identificados a partir de seu fenótipo e, também, genótipo. Assim, conforme publicado previamente por Beyertedt et al.,⁽⁸²⁾ nosso grupo realizou a genotipagem dos animais a partir da coleta de uma amostra tissular de sua orelha ou cauda. Brevemente, o tecido foi lisado por 1 hora com utilização do tampão 25mM NaOH /0,2Mm-*Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) a 98°C. A adição posterior de 40mM Tris-HCl pH 5,5 foi realizada para interromper este processo, seguida pela centrifugação das amostras a 10.000 RPM a 4°C. Finalizado o processo de extração, as amostras foram preparadas para PCR com utilização do MasterMix (ThermoScientific, EUA) e *primers*, conforme especificado a seguir:

Primers (Sigma-Aldrich, EUA):

IMR1151: TGTCCAAGATGGACCAGACTC

ACAGGTTCTACCTGGTCTGAG

IMR1152: ACTGGTCTGAGGCAGGGAGCA

TGACCAGACTCCGTCCCTCGT

Por fim, a enzima de restrição Ddel (#R0175S, Promega-EUA) foi utilizada para digestão do material a 37°C. Como peso molecular, utilizamos o padrão *DNA-ladder* de 50 pares de base (pb) (#K0171, ThermoFisher, EUA). A partir da obtenção da foto do gel no fotodocumentador IBright 1500 (Invitrogen, EUA), identificamos as bandas de 55 e 100pb, correspondentes ao animal BTBR^{ob/ob}, as bandas de 55, 100 e 155pb correspondentes aos animais heterozigotos e apenas a banda de 155pb para animais BTBR WT.

2.5 Análise metabólica e de função renal

2.5.1 Coleta de urina

Foi realizada a gaiola metabólica dos animais, de 4-7 horas, para coleta de urina em 5-6, 7-8, 9-10, 14-15 e 18-20 semanas de idade. A dosagem de creatinina urinária foi realizada a partir do analisador bioquímico Cobas Mira Plus (Roche, Suíça). A albuminúria, por sua vez, foi quantificada por dois *kits* específicos de ELISA

(#ab207620 e #ab108792, Abcam, EUA) e previamente publicada por Beyertedt et al.⁽⁸²⁾ Neste trabalho, os dados de albuminúria foram reanalisados estatisticamente, devido à ausência de um grupo experimental em relação à publicação mencionada.

2.5.2 Coleta de plasma para quantificação de creatinina

Realizou-se a coleta de plasma dos animais a partir do plexo ocular nas idades de 6, 8, 10, 14 e 18-20 semanas. Este material foi analisado para dosagem da creatinina sérica, através do analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus (Roche, Suíça). Os dados do Grupo RC de 18-20 semanas foram, previamente, publicados por Beyerstedt et al.⁽⁸²⁾

2.5.3 Glicemia de jejum

A glicemia, após jejum de 6h, foi mensurada quinzenalmente nos animais, a partir da quinta ou sexta semana de vida com o aparelho Accu-Chek (Roche, Suíça). Os dados do Grupo RC de 18-20 semanas foram, previamente, publicados por Beyerstedt et al.⁽⁸²⁾

2.6 Análises de *Western blot*

O córtex renal foi obtido através da secção longitudinal das amostras de tecido renal coletadas e armazenadas em -80°C até o momento do uso. Uma vez isolados, os lisados proteicos foram preparados no tampão de lise Pierce™ RIPA Buffer (#89901, ThermoScientific, EUA) com os inibidores de protease e fosfatase (#P8340-1ML e #P5726-1ML, Sigma-Aldrich, EUA), seguindo protocolo do fabricante. Para a lise mecânica dos tecidos, foi utilizado o Omni Tissue Homogenizer (Omni International, PerkinElmer, EUA), seguido por gelo e centrifugação à velocidade máxima por 15-20 minutos para separação dos debris tissulares. A proteína dos lisados foi quantificada através do reagente Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (#5000006, Bio-Rad Laboratories, EUA), com a utilização do aparelho VarioskanLux e *software* SkanIt RE 6.0.1. As amostras foram preparadas mediante necessidade de uso

com adição de Laemmli Buffer 4x (#1610747, Bio-Rad Laboratories, EUA), sendo desnaturada a 94°C por 5 minutos, posteriormente – com exceção das amostras para análises de s6 que não foram aquecidas. Para aplicação no gel, foram utilizadas 50µg de proteína em *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) de 10 e 15%, seguidas por transferência *overnight* para membrana de nitrocelulose de 0,45µm (#1620115, Bio-Rad Laboratories, EUA). Utilizamos o corante Ponceau-S 0,5% para verificação das bandas após transferência. As membranas foram, então, bloqueadas com 5% BSA e incubadas, *overnight*, a 4°C, com os anticorpos primários descritos a seguir. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (#A9169-2ML, Sigma-Aldrich, EUA) por 1 hora à temperatura ambiente, com exceção dos experimentos para análise de s6. Os anticorpos primários e diluições utilizados foram LC3 1:1000 (#PA1-16931, Invitrogen, EUA), Phospho s6 (Ser235, ser236) 1:500 (#MA5-15140, Invitrogen, EUA), Klotho 1:1000 (#MA5-32784, Invitrogen, EUA), β-actina 1:10.000 (#PA1-183, Invitrogen, EUA). Para a revelação, utilizamos o reagente Clarity™ Western ECL Substrate (#170-5060, Bio-Rad Laboratories, EUA) e o aparelho ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories, EUA). Deve-se ressaltar que, como o anticorpo LC3 é capaz de detectar ambas as formas desta proteína (LC3-I e LC3-II), realizamos a análise de sua razão – sendo este um método comumente utilizado, apesar de suas limitações,⁽⁸⁴⁾ para análise do fluxo autofágico – bem como suas análises isoladamente. A densitometria se deu por análise no *software* Image Lab 6.1.0 build 7 (Bio-Rad Laboratories, EUA).

2.7 Análises da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real via transcrição reversa (RT-qPCR)

Foi realizada a extração de RNA, seguida por RT-qPCR, das amostras tissulares para avaliação quantitativa da expressão dos marcadores de interesse, mencionados abaixo. Como gene endógeno, seguindo padronizações já realizadas pelo nosso grupo, utilizamos o gene da beta-glucoronidase (GUSB). As amostras foram mantidas em RNA Later (Sigma-Aldrich, EUA) para preservação do material e congeladas a -80°C até a extração do RNA a partir da utilização do *kit* RNeasy mini *kit* (#74106, QIAGEN, EUA) do Omni Tissue Homogenizer (Omni International, PerkinElmer, EUA). A síntese de cDNA e sua amplificação foram feitas, respectivamente, com a

utilização dos *kits* High-Capacity cDNA Reverse Transcription *kit* (#4368813, Applied Biosystems, EUA) e TaqMan™ Gene Expression Assays (#4331182, Applied Biosystems, EUA) e pelo aparelho QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems, EUA), utilizando o *software* QuantStudio™ Real-Time PCR *software* V1.2.

Foram avaliados os seguintes marcadores:

Marcadores da autofagia:

- LC3: Mm00458724_m1 Map1lc3 – Taqman;
- p62: Mm00500417_m1 Gtf2h1 – Taqman.

Klotho

- Klotho: Mm00502002_m1 Kl – Taqman.

Marcadores da via mTORC 1 e 2:

- S6: Mm00436395_m1 Rps6ka1 – Taqman;
- Raptor: Mm01242613_m1 Raptor – Taqman;
- Rictor: Mm013073_m1 Rictor – Taqman.

Gene endógeno:

GUSB: Mm01197698_m1- Taqman.

2.8 Imunohistoquímica

Secções renais de 3,5µm de espessura foram analisadas com a utilização do *kit* EnVision FLEX High pH *kit* (#K8000, Dako, Carpinteria, CA, USA), sob microscopia de campo claro e através do *software* Cell Sens (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan). Para a análise cortical e medular, cinco secções foram, randomicamente, analisadas para cada animal em aumento de 20x. Para a análise glomerular, 20-30 glomérulos foram, randomicamente, selecionados e analisados em aumento de 40x. Os anticorpos primários Klotho 1:200 e LC3 1:400 (#MA5-32784; #PA1-16931, respectivamente, Invitrogen, EUA) foram incubados *overnight* à temperatura de 4°C; o anticorpo secundário foi incubado por uma hora à temperatura ambiente.

2.9 Análise dos resultados

Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (média $\pm$ EPM). Para análise de normalidade, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Em caso de dados normais, realizou-se a análise *one-way* ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey, para análise de única variável. Em caso de medidas repetidas, realizou-se a análise *two-way* ANOVA ou teste de modelo misto, seguidos por teste de Tukey.

Em casos de não-normalidade, foram realizadas análises estatísticas de Kruskal-Wallis, seguida ou não por pós-teste de comparações múltiplas de Dunn, para comparação de mais de dois grupos. Para comparações de dois grupos, foi utilizada a análise estatística de Mann-Whitney. Valores-p $<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A estatística foi feita com a utilização do *software* GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad *software*, San Diego, CA).

Ressaltamos que alguns dos dados, como mencionado anteriormente, foram publicados recentemente por Beyerstedt et al.,⁽⁸²⁾ e tiveram suas análises estatísticas refeitas neste trabalho devido à remoção de um grupo experimental.

3 RESULTADOS

3.1 Dados funcionais

3.1.1 Análise de glicemia, peso e consumo

Conforme demonstrado na tabela 1, item A, em 5-6 semanas de idade, o Grupo RC iniciou o protocolo com a glicemia reduzida em comparação ao Grupo BTBR^{ob/ob} ($p=0,04$), que seguiu reduzida até 8 semanas ($p=0,01$), assim como o Grupo R ($p=0,02$). Nesta última idade, o Grupo RC também apresentou glicemia reduzida em comparação ao Grupo Empagliflozina ($p=0,03$). Em 10 semanas, entretanto, observou-se redução de glicemia somente no Grupo RC em comparação ao Grupo Empagliflozina ($p=0,02$).

Em 12 – 14 semanas, em comparação ao Grupo BTBR^{ob/ob}, a glicemia se apresentou reduzida nos grupos Empagliflozina ($p=0,02$; $p=0,01$, respectivamente), R ($p=0,002$; $p<0,0001$, respectivamente) e RC ($p<0,0001$ em ambas as idades). Nestas idades, o Grupo RC também apresentou menor glicemia do que o Grupo Empagliflozina ($p=0,008$; $p=0,0019$, respectivamente).

Observamos maior valor glicêmico no Grupo BTBR^{ob/ob} em 14 semanas, comparativamente a 5-6, 10 e 18-20 semanas ($p=0,01$; $p=0,03$ e $p=0,02$, respectivamente). No Grupo Empagliflozina, por sua vez, observamos aumento significativo da glicemia em 10 semanas comparativamente a 5-6 semanas. No Grupo R, a glicemia se mostrou mais elevada em 12 semanas em comparação a 5-6 semanas ($p=0,02$). Por fim, no Grupo RC, a glicemia apresentou maiores dosagens em 8 semanas, comparativamente a 5-6 semanas ($p=0,02$), enquanto demonstrou maior glicemia em 10 semanas comparativamente a 12 e 14 semanas ($p=0,01$ em ambos os casos).

Em 16-20 semanas, não foi observada diferença estatística da glicemia entre os grupos.

A variação da glicemia, por sua vez, (Tabela 1, item B) se mostrou maior no Grupo BTBR^{ob/ob} em 14 semanas comparativamente a 10 semanas ($p=0,03$). No Grupo RC, por outro lado, observou-se maior variação da glicemia em 10 semanas comparativamente a 12 e 14 semanas ($p=0,02$; $p=0,01$, respectivamente).

Tabela 1. Análise de glicemia e variação de glicemia em camundongos BTBR^{ob/ob}

	BTBR ^{ob/ob}	Empagliflozina	Restrição calórica (R)	Restrição+CTMs (RC)
A - Grupo/idade (semanas)				
5-6	292,16±40,51	261,54±32,15	169,00±10,38	164,66±8,76*
8	368,16±35,44	312,25±21,26	233,36±21,16*	235,00±14,55*&
10	359,41±36,71	334,75±22,64	263,50±27,24	248±16,38&
12	431,91±33,53	305,33±24,23*	263,50±22,58*	203,25±13,37***&
14	471,50±29,54	332,33±30,43*	233,54±26,67***	181±13,95***&
16	355,16±33,70	266,83±26,02	267,33±32,85	219,16±31,28
18-20	296,75±17,57	262,33±23,05	307,80±42,61	266,16±47,03
B - Grupo/variação (%)				
8	36,66±10,98	43,35±22,82	37,32±13,81	54,06±13,66
10	72,76±14,30	42,73±13,96	45,14±16,05	71,58±15,87 ^{e,f}
12	89,65±20,98	28,44±11,91	45,40±14,56	41,83±14,08
14	80,15±21,83*	40,29±15,20	26,04±12,70	24,86±13,96
16	80,15±29,50	30,01±31,38	49,34±19,53	27,95±19,97
18-20	56,90±27,73	21,58±24,65	78,24±35,75	51,87±23,54

Foi realizada análise de modelo misto, seguida por comparações múltiplas de Tukey, sendo * *versus* BTBR^{ob/ob}; & *versus* empagliflozina; # *versus* restrição calórica; b *versus* R+CTMs. Os dados são representativos de n=6-12. Os dados do Grupo RC em 18-20 semanas foram, previamente, publicados por Beyertedt et al.⁽⁸²⁾ (A) Mensuração quinzenal da glicemia de jejum, em mg/dL, nos camundongos BTBR^{ob/ob} em diferentes grupos experimentais e idades. (B) Variação da glicemia, em porcentagem, em relação à idade basal de 5-6 semanas, sendo *p<0,05 *versus* BTBR^{ob/ob}; & p<0,05 *versus* empagliflozina; ***p<0,01 *versus* BTBR^{ob/ob}; e, p=0,0232 *versus* RC em 12 semanas; f, p=0,0148 *versus* RC em 14 semanas. R: restrição calórica; CTMs: células-tronco mesenquimais; RC: restrição calórica + células-tronco mesenquimais.

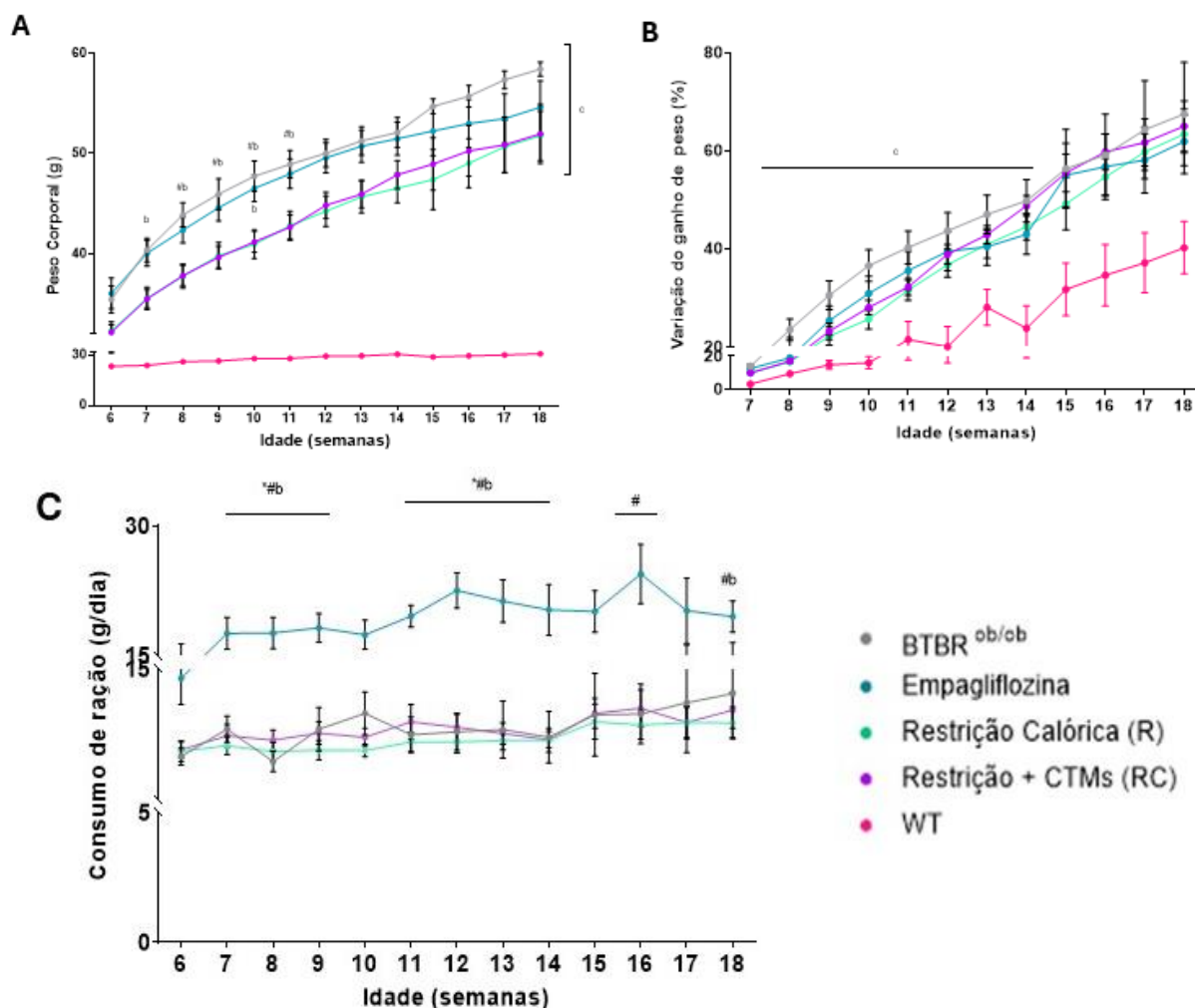
As análises de peso corporal, por sua vez, demonstraram maiores valores (p<0,05) deste parâmetro em todos os grupos experimentais ao longo do protocolo em comparação ao Grupo WT (Figura 5A e B). De forma geral, todos os grupos apresentaram progressão de peso acompanhando seu envelhecimento, inclusive os animais WT. O Grupo BTBR^{ob/ob} apresentou maior variação de peso, em relação aos seus valores basais de 5-6 semanas, comparativamente ao Grupo WT de 7 a 14 semanas de idade (p<0,05), assim como os grupos R e RC nas idades de 7-8 semanas e 12-14 semanas.

O Grupo Empagliflozina, por outro lado, apresentou maior variação de peso em relação ao basal (p<0,05) em 7, 12 e 14 semanas somente em comparação ao Grupo WT.

Observamos, de 7 a 11 semanas, maior peso no Grupo BTBR^{ob/ob} em comparação aos grupos R e RC (p<0,05). Em 10 semanas, por sua vez, o Grupo Empagliflozina apresentou maior peso do que o Grupo RC (p=0,004).

Em relação ao consumo de ração (Figura 5C), observamos que o Grupo Empagliflozina apresentou maior ingesta (p<0,05) em 7 a 9 semanas e 11 a 14 semanas em comparação aos grupos BTBR^{ob/ob}, R e RC. Em 16 semanas, o Grupo

Empagliflozina também apresentou maior consumo de ração comparativamente ao Grupo R, assim como em 18 semanas, quando comparado aos grupos R e RC.



Os dados de peso e variação de peso correspondentes ao Grupo RC de 18-20 semanas foram, previamente, publicados por Beyerstedt et al.⁽⁸²⁾ (A) Dados de peso corporal, em gramas. (B) Análise da variação de peso corporal, em porcentagem. (C) Análise do consumo de ração, em gramas/dia. Foi realizada a análise estatística de modelo misto, seguida por comparações múltiplas de Tukey, sendo * $p < 0,05$ versus BTBR^{ob/ob}; & $p < 0,05$ versus empagliflozina; # $p < 0,05$ versus R; b $p < 0,05$ versus RC; c $p < 0,05$ versus WT. Os dados são representativos de $n=6-12$.

Figura 5. Análise de peso e consumo de ração em camundongos BTBR^{ob/ob} e WT

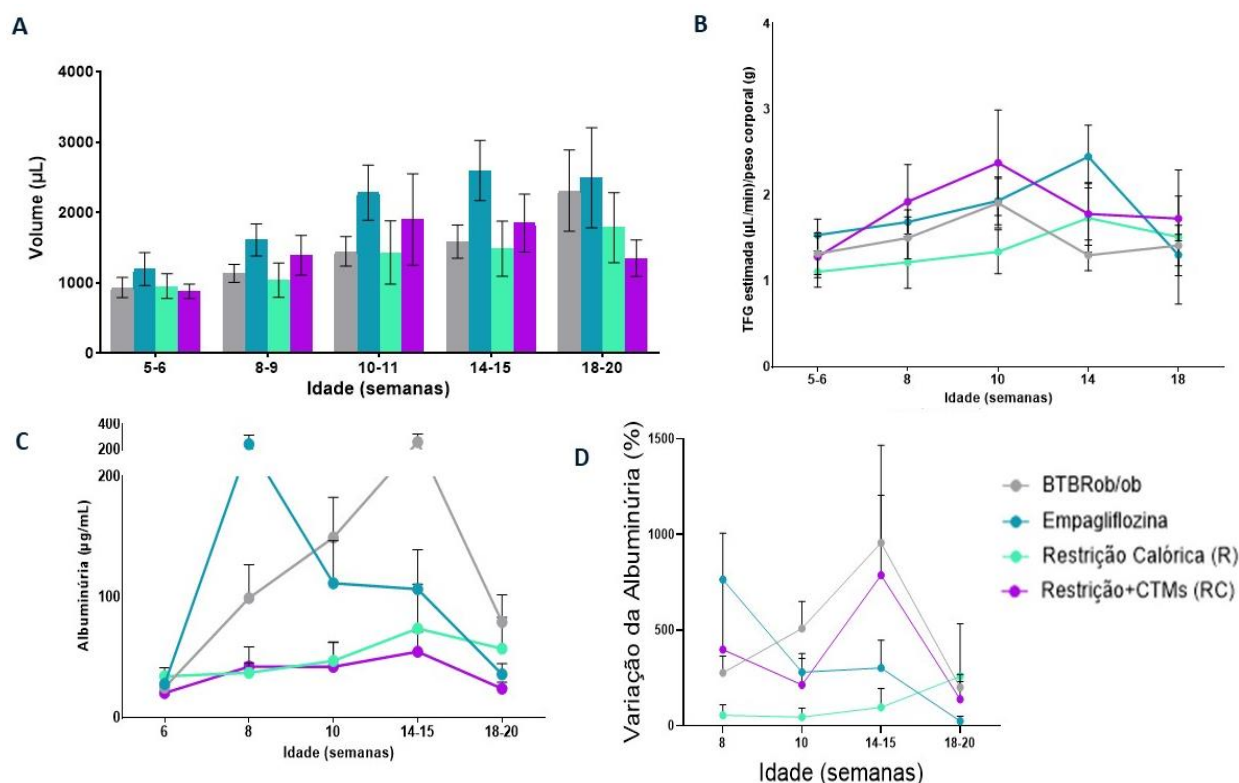
3.1.2 Análise da diurese, taxa de filtração glomerular e albuminúria

Em relação à diurese (Figura 6A), observamos valores similares entre os grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R e RC ($p > 0,05$), bem como sua elevação em 18-20 semanas de idade ($2310,00\mu\text{L} \pm 577,58$; $2491,66\mu\text{L} \pm 717,19$; $1783,33\mu\text{L} \pm 498,94$; $1350,00\mu\text{L} \pm 259,16$, respectivamente) em todos os grupos comparativamente à idade

basal de 5 – 6 semanas, apesar da falta de significância estatística ($933,33\mu\text{L} \pm 142,13$; $1195,83\mu\text{L} \pm 234,96$; $951,25\mu\text{L} \pm 175,96$; $879,16\mu\text{L} \pm 100,27$, respectivamente).

Também não observamos significância estatística na taxa de filtração glomerular estimada (Figura 6B) entre os grupos, embora em 14 semanas, tenhamos observado um pico deste parâmetro no Grupo Empagliflozina ($2,45\mu\text{L}/\text{min}/\text{g} \pm 0,36$), acompanhado pelo menor valor apresentado pelo Grupo BTBR^{ob/ob} ($p > 0,05$) ($1,30\mu\text{L}/\text{min}/\text{g} \pm 0,18$). Nesta idade, os grupos R e RC apresentaram valores, respectivamente, de $1,73\mu\text{L}/\text{min}/\text{g} \pm 0,40$ e $1,78\mu\text{L}/\text{min}/\text{g} \pm 0,36$.

Por fim, os dados de albuminúria (Figura 6C e 6D) conforme, previamente, publicados por Beyerstedt et al.,⁽⁸²⁾ demonstram ausência de significância estatística entre grupos. A análise da variação da albuminúria idade a idade também apresentou a mesma conclusão. Deve-se mencionar, porém, que o Grupo BTBR^{ob/ob} apresenta elevação deste parâmetro até 14-15 semanas, quando apresenta seu valor máximo ($p > 0,05$) de $260,16\mu\text{g}/\text{mL} \pm 62,86$, ao passo que o Grupo Empagliflozina demonstra pico ($p > 0,05$) em 8 semanas, com albuminúria de $243,69\mu\text{g}/\text{mL} \pm 70,90$. Os grupos R e RC, por outro lado, não apresentam o mesmo padrão de elevação, demonstrando valores, respectivamente, de $74,04\mu\text{g}/\text{mL} \pm 36,71$ e $54,82\mu\text{g}/\text{mL} \pm 16,17$ nesta idade.



Os dados são representativos de $n=6-12$. Os dados do Grupo RC de 18-20 semanas foram, previamente, publicados por Beyertedt et al.⁽⁸²⁾ Os dados de albuminúria foram publicados anteriormente por Beyertedt et al.; as análises estatísticas foram refeitas neste trabalho devido à remoção de um grupo. (A) Diurese, em μL , mensurada a partir do uso de gaiola metabólica. (B) Taxa de filtração glomerular estimada, normalizada pelo peso corporal. (C) Albuminúria, em μL , mensurada através de ELISA, previamente publicada por Beyerstedt et al. e com análises estatísticas refeitas neste trabalho. (D) Variação, em porcentagem, da albuminúria em relação à idade basal de 5-6 semanas. Foram realizadas análises de modelo misto ou 2-way ANOVA, seguidas por comparações múltiplas de Tukey. As linhas contínuas representam $p < 0,05$.

Fonte: Traduzido e adaptado de Beyerstedt S, Franco ML, Carlos AK, Arjona J, Josefi-Rocha GR, Barbosa BS, et al. Combining sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor with mesenchymal stem cells and brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT) transplantation to mitigate the progression of diabetic kidney disease: a pre-clinical approach. *Stem Cell Res Ther.* 2025;16(1):254. Fig.1. Metabolic and renal functional parameters in the experimental groups; p. 5.⁽⁸²⁾

Figura 6. Análise de dados funcionais renais de camundongos BTBR^{ob/ob}

3.2 Análise de expressão gênica de marcadores da autofagia, via mTOR e Klotho

3.2.1 Expressão gênica dos marcadores em relação ao animal BTBR^{ob/ob}

Conforme observado na figura 7A, em 14-15 semanas, os Grupos Empagliflozina, R, RC e WT apresentaram expressão de LC3 de $0,84 \pm 0,24$; $0,87 \pm 0,23$; $0,62 \pm 0,16$; $1,78 \pm 1,31$. A expressão de p62 (Figura 7B), por sua vez, nos grupos foi de, respectivamente, $0,78 \pm 0,35$; $0,80 \pm 0,12$; $0,76 \pm 0,37$ e $1,32 \pm 0,13$. Não foi constatada diferença estatística entre os grupos e idades.

Em 18-20 semanas, a expressão de LC3 nos grupos Empagliflozina, R, RC e WT foi de, respectivamente, $2,91 \pm 1,44$; $3,42 \pm 1,14$; $2,79 \pm 0,57$ e $1,07 \pm 0,15$. E expressão de p62 apresentada foi, respectivamente, de $1,28 \pm 0,23$; $1,49 \pm 0,19$; $1,28 \pm 0,19$ e $0,69 \pm 0,13$. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos e idades.

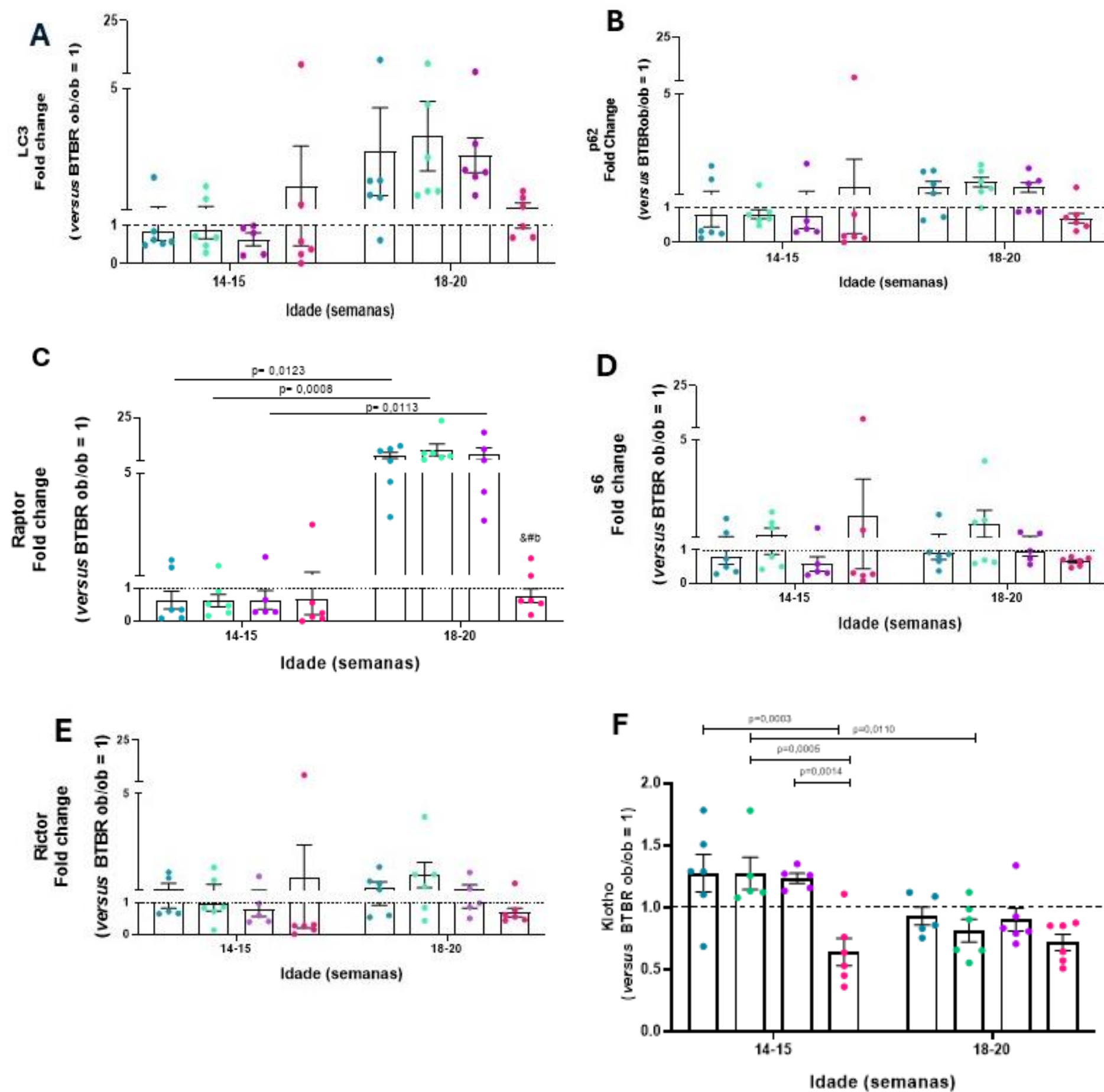
Em relação à via mTORC1, a expressão de Raptor como visto na figura 7C, se apresentou nos grupos Empagliflozina, R, RC e WT nos valores de $0,64 \pm 0,27$; $0,62 \pm 0,18$; $0,64 \pm 0,28$; $0,67 \pm 0,47$, respectivamente. Em 18-20 semanas, os valores foram, respectivamente, de $7,50 \pm 1,47$; $9,98 \pm 2,77$; $8,25 \pm 2,77$ e $0,77 \pm 0,20$. O Grupo Empagliflozina apresentou expressão maior de Raptor nesta idade em relação à idade anterior ($p=0,012$), bem como o Grupo R ($p=0,0008$) e RC ($p=0,0113$). Nesta idade, em comparação ao Grupo WT, os grupos Empagliflozina, R e RC também apresentaram expressão elevada ($p=0,009$; $p=0,0003$ e $p=0,005$, respectivamente).

A expressão de S6, por sua vez, como demonstrado na figura 7D, em 14-15 semanas os grupos Empagliflozina, R, RC e WT se apresentaram, respectivamente, como $0,80 \pm 0,23$; $1,13 \pm 0,26$; $0,58 \pm 0,21$ e $1,91 \pm 1,48$. Em 18-20 semanas, os valores foram, respectivamente, de $0,93 \pm 0,21$; $1,57 \pm 0,55$; $0,9 \pm 0,12$ e $0,65 \pm 0,05$. Não foi observada significância estatística.

Por fim, na figura 7E, observamos que, em 14-15 semanas, a expressão de Rictor nos grupos Empagliflozina, R, RC e WT se apresentou, respectivamente, nos valores de $1,05 \pm 0,24$; $0,98 \pm 0,25$; $0,78 \pm 0,22$ e $1,54 \pm 1,34$. Em 18-20 semanas, por sua vez, os valores foram de, respectivamente, $1,13 \pm 0,22$; $1,63 \pm 0,52$; $1,02 \pm 0,20$ e $0,68 \pm 0,13$. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos e idades.

Em relação à expressão de Klotho, conforme previamente avaliado por Beyerstedt et al.,⁽⁸²⁾ mas ainda não publicado, conforme observado na figura 7F, em 14-15 semanas, os grupos Empagliflozina, R, RC e WT apresentaram, respectivamente, expressão de $1,27 \pm 0,15$; $1,27 \pm 0,13$; $1,23 \pm 0,04$ e $0,64 \pm 0,11$. Nesta idade, os grupos Empagliflozina, R e RC apresentaram expressão de Klotho mais elevada que o Grupo WT ($p=0,0003$; $p=0,0005$ e $p=0,0014$, respectivamente).

Em 18-20 semanas, por sua vez, a expressão nos grupos foi de, respectivamente, $0,93 \pm 0,07$; $0,81 \pm 0,09$; $0,90 \pm 0,09$ e $0,71 \pm 0,06$. O Grupo R apresentou menor expressão de Klotho quando comparado a 14-15 semanas de idade ($p=0,0110$).



• BTBR^{ob/ob} • Empagliflozina • Restrição Calórica (R) • Restrição + CTMs (RC) • WT

O Grupo BTBR^{ob/ob} foi considerado como sendo 1. Foram realizadas as análises estatísticas de modelo misto, seguidas por comparações múltiplas de Tukey e/ou Sidak. As linhas contínuas representam $p < 0,05$. Os dados são representativos de $n = 5-6$. (A) Análise da expressão de LC3. (B) Análise da expressão de p62. (C) Análise da expressão de Raptor. (D) Análise da expressão de Rictor. (E) Análise da expressão de s6. (F) Análise da expressão de Klotho. LC3: *microtubule-associated protein 1 light chain 3*; p62: *sequestosome 1*; Raptor s6; Rictor.

Figura 7. Análise da expressão gênica, por meio de RT-qPCR, de marcadores das vias da autofagia, mTOR e de Klotho em camundongos BTBR^{ob/ob} e WT

3.3 Expressão proteica dos marcadores

3.3.1 Análise da expressão de LC3

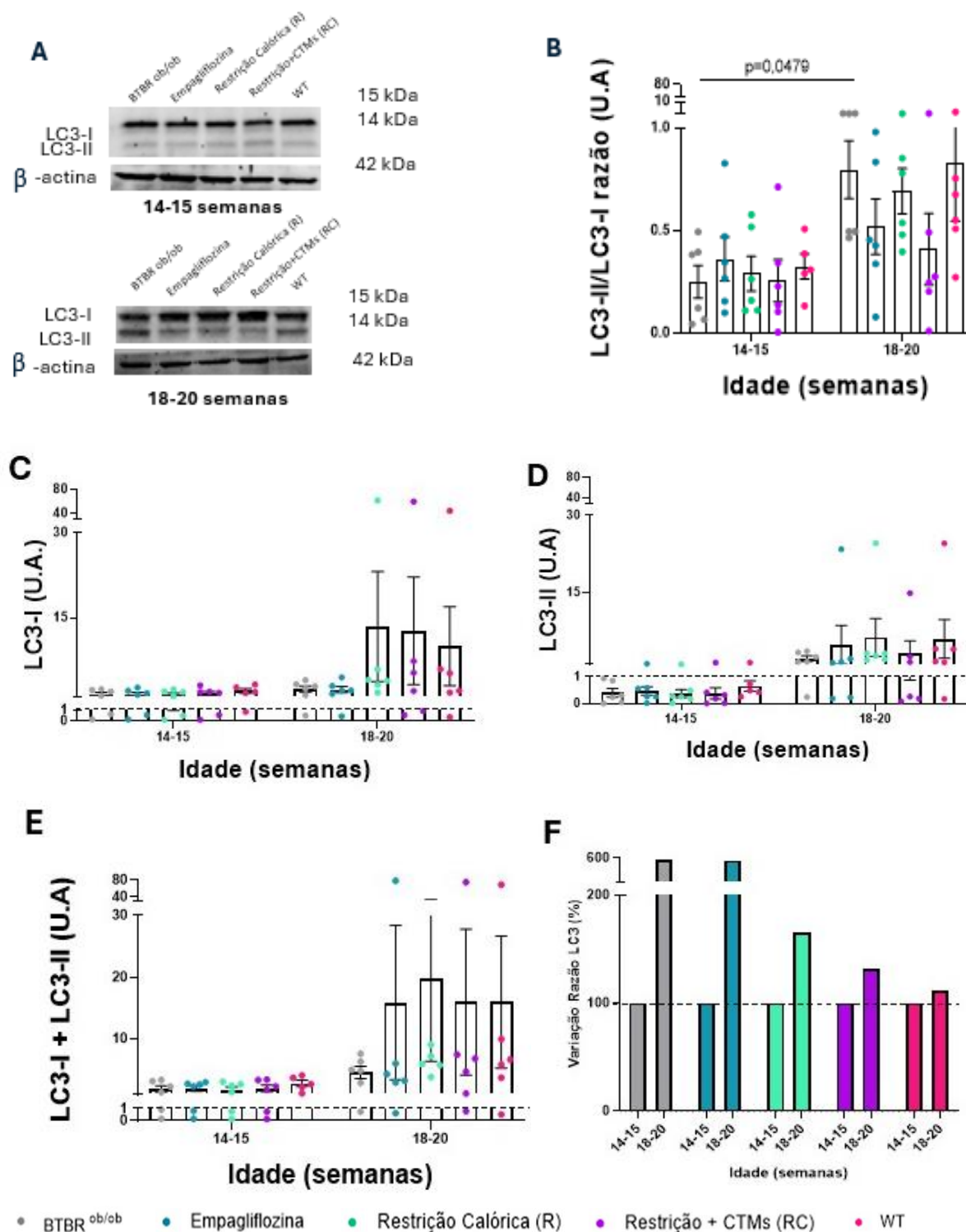
Como demonstrado na figura 8A e B, os grupos BTBR^{ob/ob}, empagliflozina, R, RC e WT em 14-15 semanas apresentaram a razão de LC3 correspondente a, respectivamente, $0,25 \pm 0,80$; $0,36 \pm 0,10$; $0,29 \pm 0,8$; $0,25 \pm 0,10$ e $0,32 \pm 0,06$. Em 18-20 semanas, por sua vez, os mesmos grupos apresentaram valores, respectivamente, de $0,79 \pm 0,14$; $0,51 \pm 0,13$; $0,69 \pm 0,11$; $0,40 \pm 0,17$ e $0,82 \pm 0,28$. O Grupo BTBR^{ob/ob} demonstrou maior razão de LC3 em 18-20 semanas ($p=0,0479$).

As análises de LC3-I isoladamente, conforme ilustrado na figura 8C, nos grupos BTBR^{ob/ob}, empagliflozina, R, RC e WT apresentaram expressão, respectivamente, de $1,43 \pm 0,37$; $1,42 \pm 0,38$; $1,32 \pm 0,36$; $1,52 \pm 0,42$; $2,06 \pm 0,40$. Em 18-20 semanas, a expressão correspondeu a, respectivamente, $2,39 \pm 0,52$; $2,27 \pm 0,55$; $13,44 \pm 9,71$; $12,68 \pm 9,51$ e $9,98 \pm 6,97$. Não foi identificada significância estatística entre os grupos e idades.

As análises de LC3-II, por sua vez, conforme visto na figura 8D, por outro lado, demonstraram sua expressão nos mesmos grupos, respectivamente, de $0,40 \pm 0,16$; $0,47 \pm 0,15$; $0,37 \pm 0,14$; $0,38 \pm 0,20$ e $0,65 \pm 0,19$. Em 18-20 semanas, os valores foram, respectivamente, de $2,11 \pm 0,51$; $4,79 \pm 3,74$; $6,24 \pm 3,68$; $3,23 \pm 2,36$ e $5,95 \pm 3,77$. Não foi observada significância estatística entre os grupos e idades.

Já as análises de soma de LC3-I e LC3-II (Figura 8E) demonstraram em 14-15 semanas de idade nos grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R, RC e WT os valores de $1,83 \pm 0,51$; $1,69 \pm 0,46$; $1,91 \pm 0,53$; $2,71 \pm 0,52$ e $1,89 \pm 0,45$. Em 18-20 semanas, por sua vez, os valores nos mesmos grupos foi de $4,51 \pm 0,99$; $19,68 \pm 13,39$; $15,92 \pm 11,83$; $15,94 \pm 10,71$ e $15,85 \pm 12,50$.

Por fim, conforme demonstrado na figura 8F, a variação, em porcentagem, da razão de LC3 nos grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R, RC e WT em 18-20 semanas, comparativamente a 14-15 semanas, foi de 584,09, 564,77, 165,34, 131,51 e 112,06%.



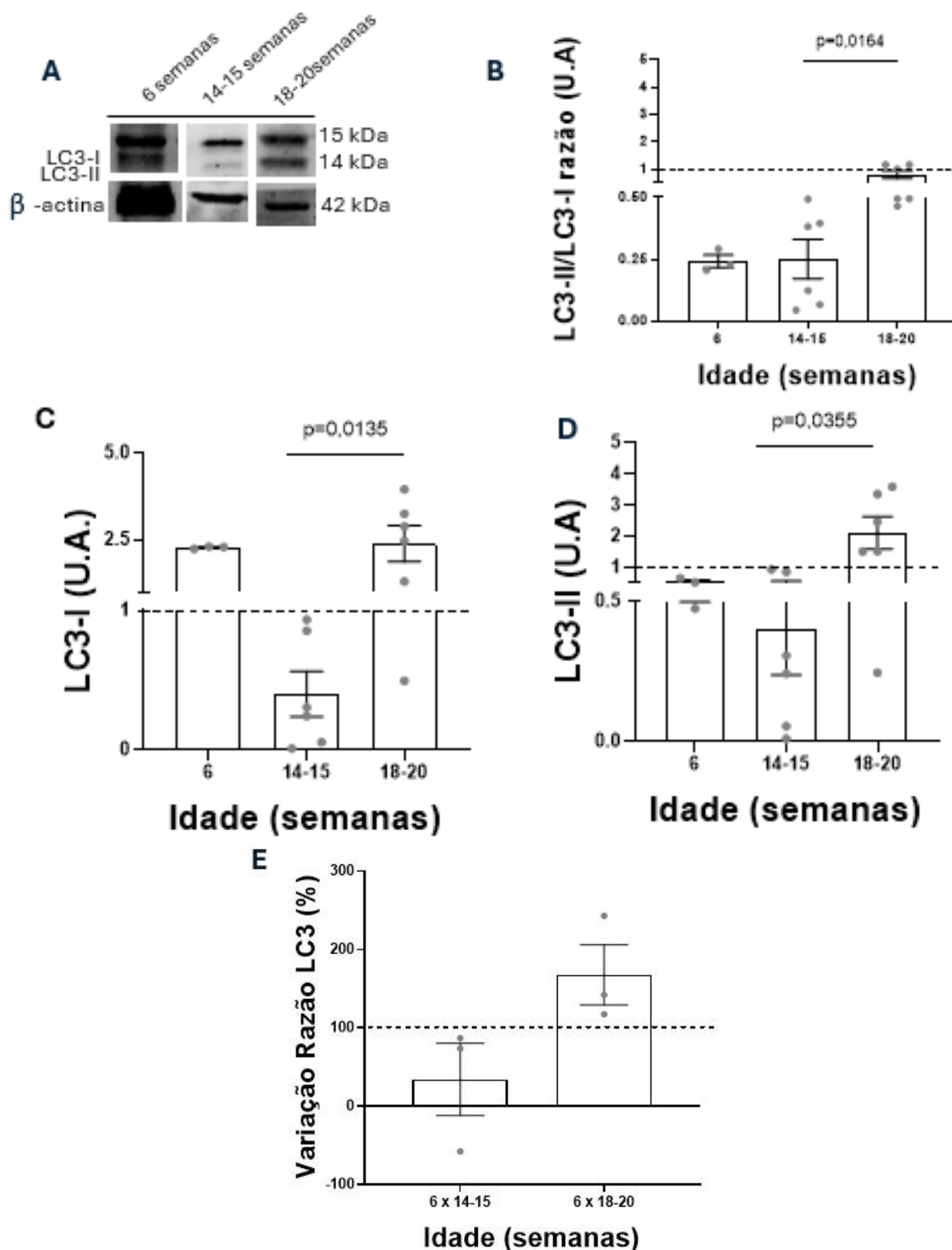
Foram realizadas análises estatísticas de modelo misto, seguidas de comparações múltiplas de Tukey e/ou Sidak. A linha contínua representa $p=0,0479$. Os dados são representativos de $n=5-6$. (A) Análise da expressão de LC3-I e LC3-II por meio de *Western blot*. (B) Razão da expressão de LC3-II/LC3-I em diferentes grupos. (C) Quantificação isolada da expressão de LC3-I. (D) Quantificação isolada da expressão de LC3-II. (E) Soma das quantificações de LC3-I e LC3-II. (F) Variação, em porcentagem, da expressão da razão de LC3-II/LC3-I de 18-20 semanas em comparação a 14-15 semanas.

Figura 8. Análise da expressão proteica cortical de LC3 em camundongos BTBR^{ob/ob} e WT

3.3.2 Análise da expressão de LC3 em 6 semanas

Diante dos resultados obtidos e da lacuna existente na literatura, resolvemos explorar como a expressão de LC3 se dava na idade basal dos camundongos BTBR^{ob/ob}. Conforme ilustrado na figura 9A e B, os animais em 5-6, 14-15 e 18-20 semanas apresentaram, respectivamente, razão de LC3 de $0,24 \pm 0,02$; $0,25 \pm 0,07$ e $0,79 \pm 0,14$. Em 18-20 semanas, a razão foi maior do que em 14-15 semanas ($p=0,01$). Isoladamente, conforme observado na figura 9C e D a expressão de LC3-I nos mesmos grupos e idades foi de, respectivamente, $2,28 \pm 0,02$; $0,40 \pm 0,16$ e $2,39 \pm 0,52$, enquanto a expressão de LC3-II foi de $0,55 \pm 0,05$; $0,40 \pm 0,16$ e $2,11 \pm 0,51$. Tanto a forma LC3-I quanto LC3-II apresentaram maior expressão em 18-20 semanas em comparação a 14-15 semanas ($p=0,01$; $p=0,03$, respectivamente).

A variação, em porcentagem, da razão de LC3 em 6 semanas, comparativamente a 14-15 semanas e 18-20 semanas, foi correspondente a $34,01\% \pm 46,13$ e $167,30\% \pm 38,40$, respectivamente (Figura 9E).



Foi realizada análise estatística de Kruskal-Wallis para comparação de três grupos, seguida pela comparação múltipla de Dunn, e de Mann-Whitney para a de dois grupos. As linhas contínuas representam $p < 0,05$. Os dados são representativos de $n=3-6$. (A) Géis *Western blot* de LC3-I e LC3-II. (B) Razão de LC3-II/LC3-I. (C) Análise da expressão isolada de LC3-I. (D) Análise da expressão isolada de LC3-II. (E) Variação, em porcentagem, da razão de LC3-II/LC3-I de 6 semanas em comparação a 14-15 semanas e 18-20 semanas.

Figura 9. Análise da expressão proteica cortical basal de LC3 em camundongos BTBR^{ob/ob}

3.4 Análise da expressão de LC3 através de Imunohistoquímica

3.4.1 Expressão cortical total de LC3

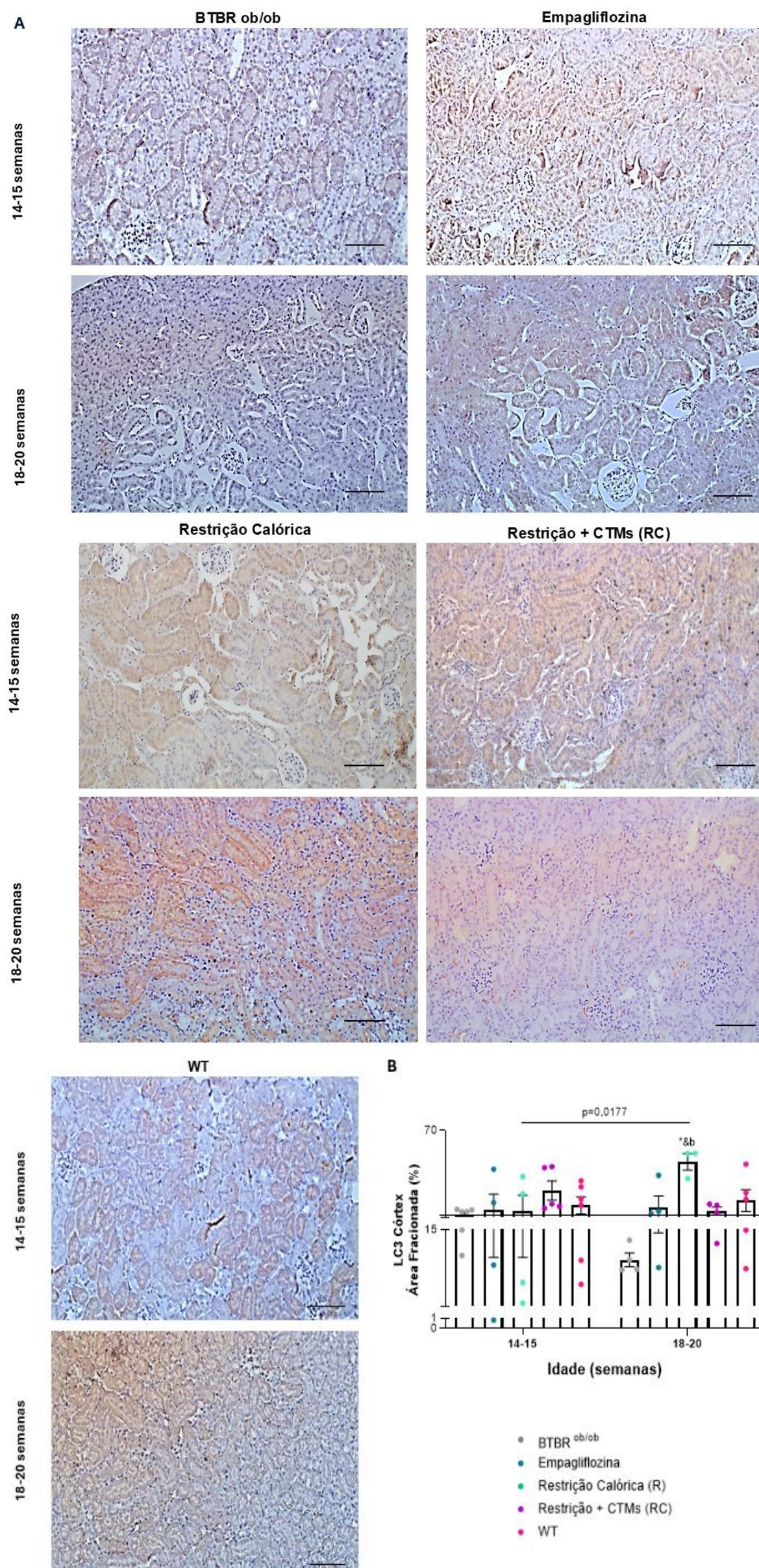
Conforme demonstrado na figura 10A e B, os grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R, RC e WT apresentaram expressão cortical de LC3 correspondente a, respectivamente, 17,11±1,56; 19,84±9,87; 19,45±9,52; 32,10±6,06 e 22,79±5,43%. Em 18-20 semanas, por sua vez, os valores foram, respectivamente, de 9,51±1,26; 21,59±7,12; 50,22±5,30; 19,23±2,54 e 25,75±7,03%. Nesta idade, o Grupo R apresentou elevação da expressão cortical de LC3 em comparação à idade anterior (p=0,017) e ao Grupo Empagliflozina (p=0,046). O Grupo Empagliflozina, por outro lado, apresentou maior valor deste parâmetro nesta idade em comparação ao Grupo WT (p=0,026).

3.4.2 Expressão glomerular de LC3

Conforme observado na figura 11A e B, em relação à expressão glomerular de LC3, os grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R, RC e WT em 14-15 semanas apresentaram valores, respectivamente, de 3,90±0,95; 4,38±1,36; 3,96±0,62; 2,60±0,74 e 6,58±1,45%. Em 18-20 semanas, por sua vez, os valores foram, respectivamente, de 1,52±0,28; 1,09±0,29; 2,76±1,20; 4,35±2,17 e 0,75±0,43%. O Grupo WT apresentou expressão reduzida deste parâmetro em relação a 14-15 semanas de idade (p=0,22).

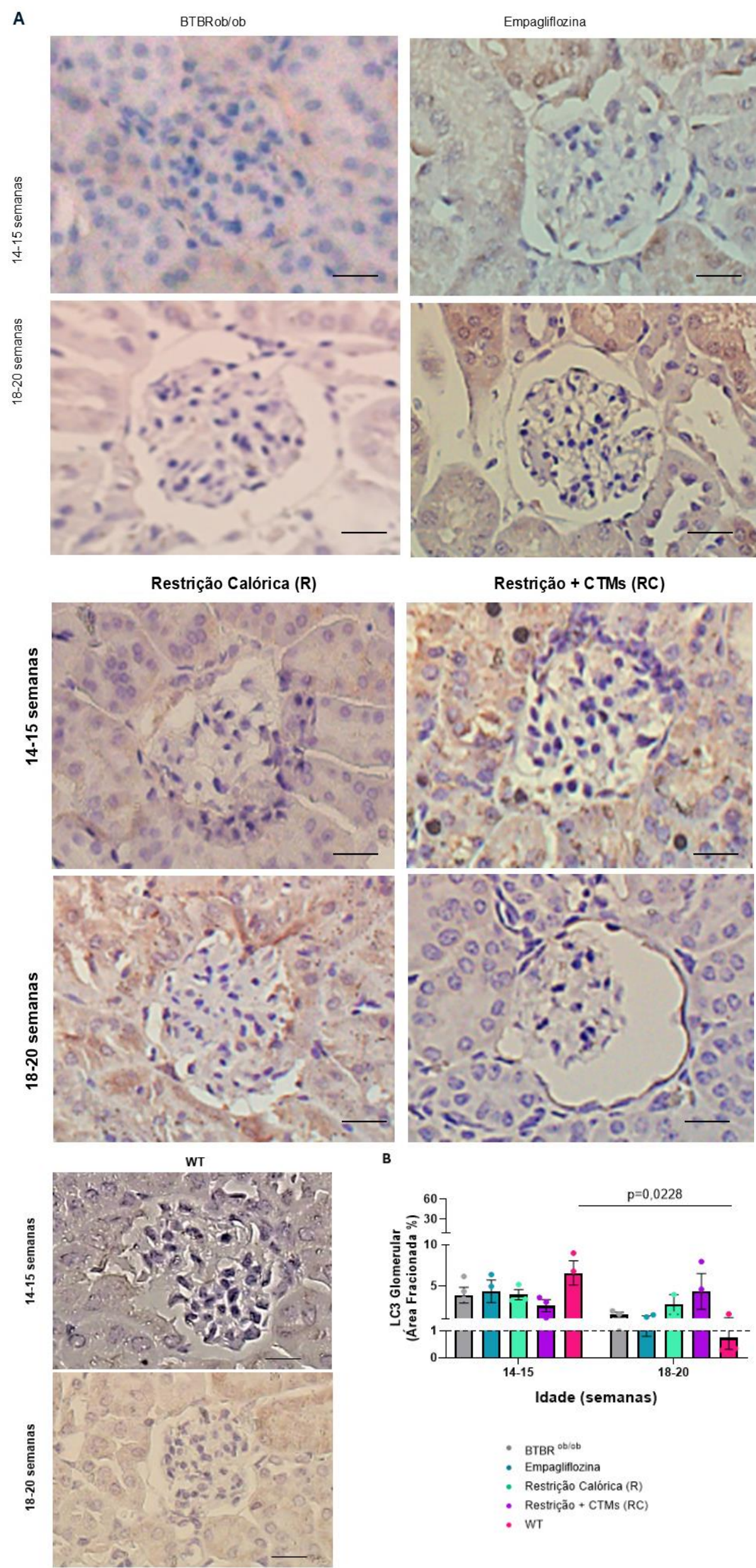
3.4.3 Expressão medular de LC3

A expressão medular de LC3 nos grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R, RC e WT, conforme ilustrado na figura 12A e B, em 14-15 semanas de idade foi de, respectivamente, 9,11±0,27; 16,45±11,80; 14,40±11,31; 20,84±9,73; 8,21±2,68%. Em 18-20 semanas, por sua vez, os grupos apresentaram valores correspondentes a, respectivamente, 5,10±1,87; 13,69±4,20; 48,29±9,05; 12,55±1,85 e 2,86±0,69%. Nesta idade, o Grupo R apresentou maior expressão de LC3 medular comparativamente a 14-15 semanas (p=0,019), bem como em comparação aos grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, RC e WT (p=0,005; p=0,0159; p=0,012 e p=0,0046, respectivamente).



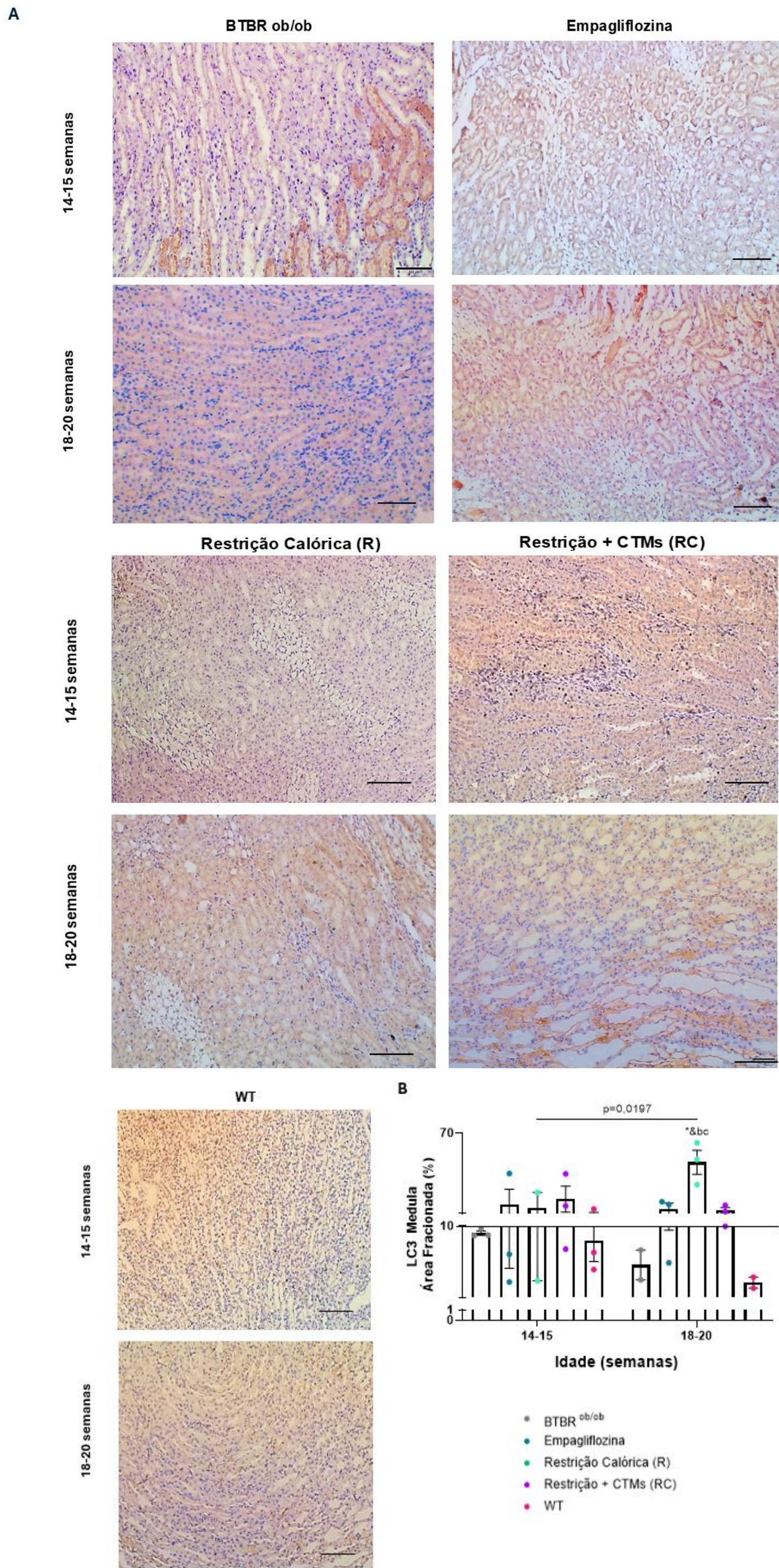
Foi realizada análise estatística de modelo misto, seguida por comparações múltiplas de Tukey e/ou Sidak, sendo * $p < 0,05$ versus BTBR^{ob/ob}, & $p < 0,05$ versus empagliflozina, b $p < 0,05$ versus RC, c $p < 0,05$ versus WT. Os dados são representativos de $n=3-6$. As barras de escala representam 50 μm . (A) Imagens histológicas representativas. (B) Quantificação da marcação.

Figura 10. Análise da expressão cortical total de LC3 em camundongos BTBR^{ob/ob} e WT



Foi realizada análise estatística de modelo misto, seguida por comparações múltiplas de Tukey e/ou Sidak. A linha contínua representa $p < 0,05$. Os dados são representativos de $n=2-4$. As barras de escala representam $50\mu\text{m}$. (A) Imagens histológicas representativas. Destaca-se a marcação rara e, quando presente, difusa nos grupos BTBRob/ob, bem como nos grupos Empagliflozina e R, seguida por marcação, predominantemente, parietal no Grupo RC e WT. (B) Quantificação da marcação.

Figura 11. Análise da expressão glomerular de LC3 em camundongos BTBRob/ob e WT

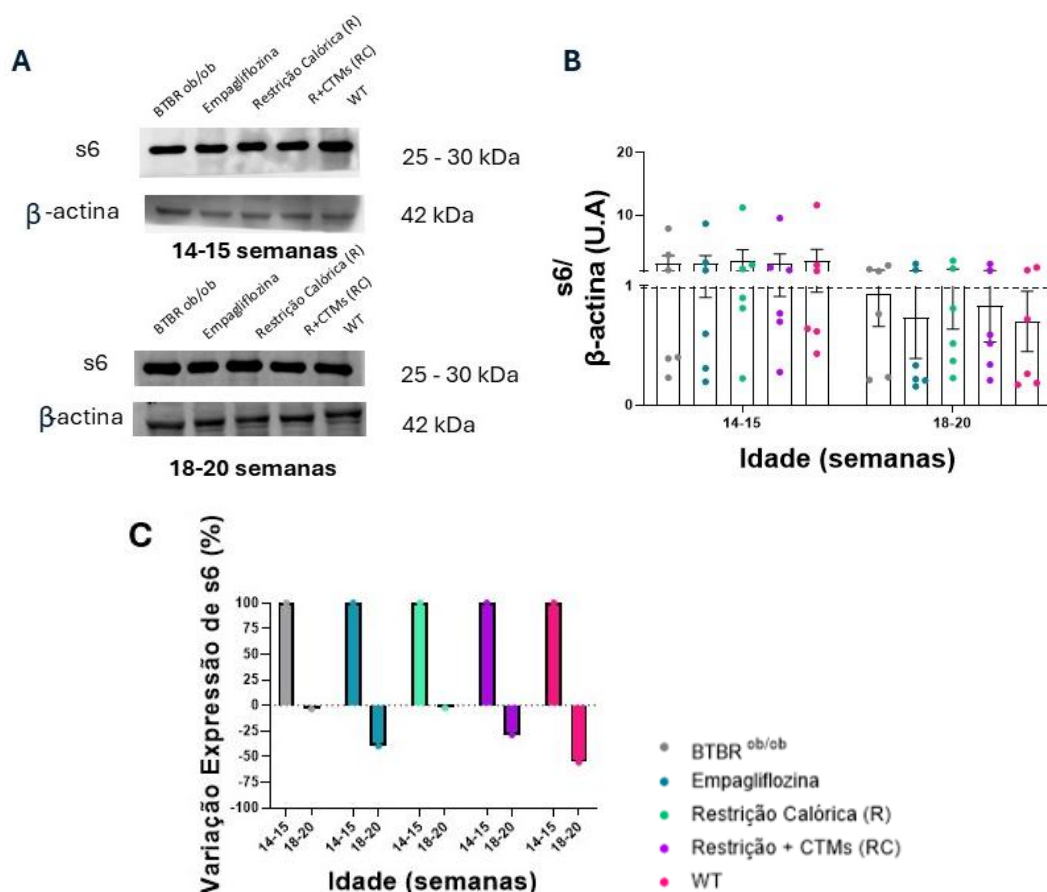


Foi realizada análise estatística de modelo misto, seguida por comparações múltiplas de Tukey e/ou Sidak, sendo * $p < 0,05$ versus BTBR^{ob/ob}, & $p < 0,05$ versus empagliflozina, b $p < 0,05$ versus RC, c $p < 0,05$ versus WT. Os dados são representativos de n=2-3. As barras de escala representam 50µm. (A) Imagens histológicas representativas. (B) Quantificação da marcação.

Figura 12. Análise da expressão medular de LC3 em camundongos BTBR^{ob/ob} e Wild Type

3.5 Expressão proteica de s6 fosforilada

Conforme ilustrado na figura 13A e B, não observamos significância estatística entre os grupos em nenhuma das idades avaliadas, embora o Grupo Empagliflozina apresente um potencial decréscimo em 18-20 semanas em comparação a 14-15 semanas de idade ($0,73 \pm 0,34$; $2,23 \pm 1,32$, respectivamente; $p > 0,05$), representando redução de 39,40% (Figura 13C). Igualmente, os grupos RC e WT também apresentaram valores potencialmente diminuídos ($p > 0,05$) em 18-20 semanas comparativamente a 14-15 semanas de idade ($0,83 \pm 0,30$ versus $2,36 \pm 1,44$ e $0,70 \pm 0,25$ versus $2,74 \pm 1,79$, respectivamente), o que representou redução de 28,37 e 55,26%, respectivamente.



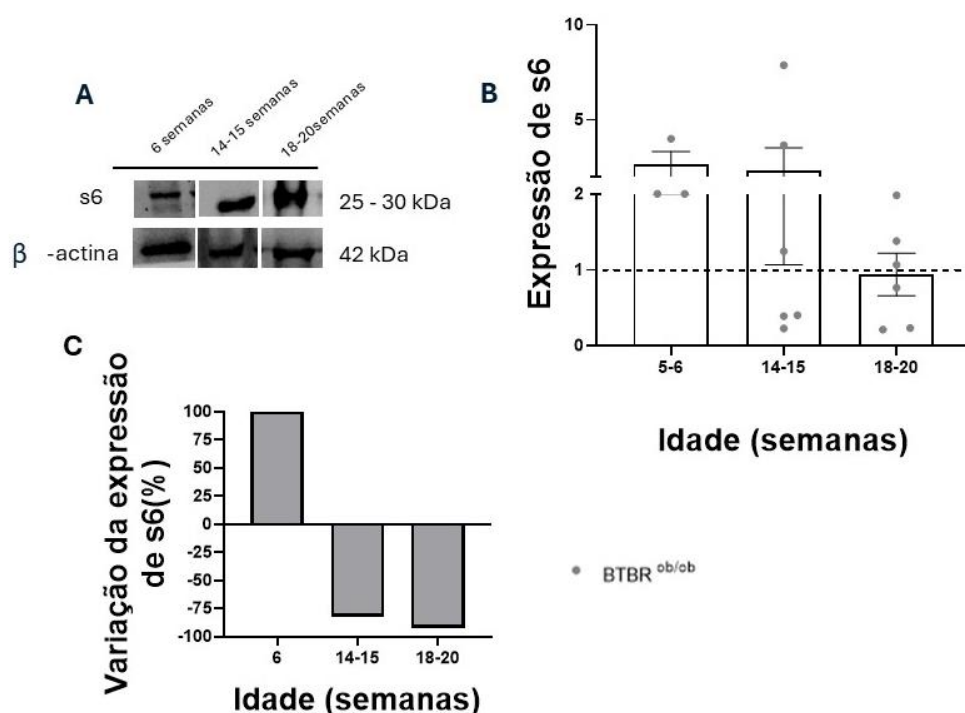
Foram realizadas análises estatísticas de modelo misto, seguidas por comparações múltiplas de Tukey e/ou de Sidak. Não foi observada significância estatística. Os dados são representativos de $n=6$. (A) Géis de *Western blot* representativos de 14-15 e 18-20 semanas. (B) Quantificação da expressão de s6 fosforilada. (C) Cálculo da variação, em porcentagem, da expressão de s6 fosforilada dos grupos experimentais em 18-20 semanas em comparação a 14-15 semanas.

Figura 13. Análise da expressão proteica cortical de s6 fosforilada em camundongos BTBR^{ob/ob} e WT

3.5.1 Expressão da *ribosomal s6* kinase fosforilada em 6 semanas

Tendo em vista os dados obtidos, analisamos, também, a expressão de s6 fosforilada em 5-6 semanas de idade no Grupo BTBR^{ob/ob} (Figura 14 A e B). Nesta idade inicial, os animais apresentaram expressão correspondente a $2,66 \pm 0,66$, enquanto em 14-15 e 18-20 semanas, por sua vez, apresentaram valores de $2,30 \pm 1,23$ e $0,94 \pm 0,28$, respectivamente.

A análise da variação da expressão entre as idades demonstrou redução média da expressão de s6 fosforilada em 14-15 semanas, comparativamente a 6 semanas, de $82,50\% \pm 5,90$ e $92,19\% \pm 13,97$, respectivamente (Figura 14C).

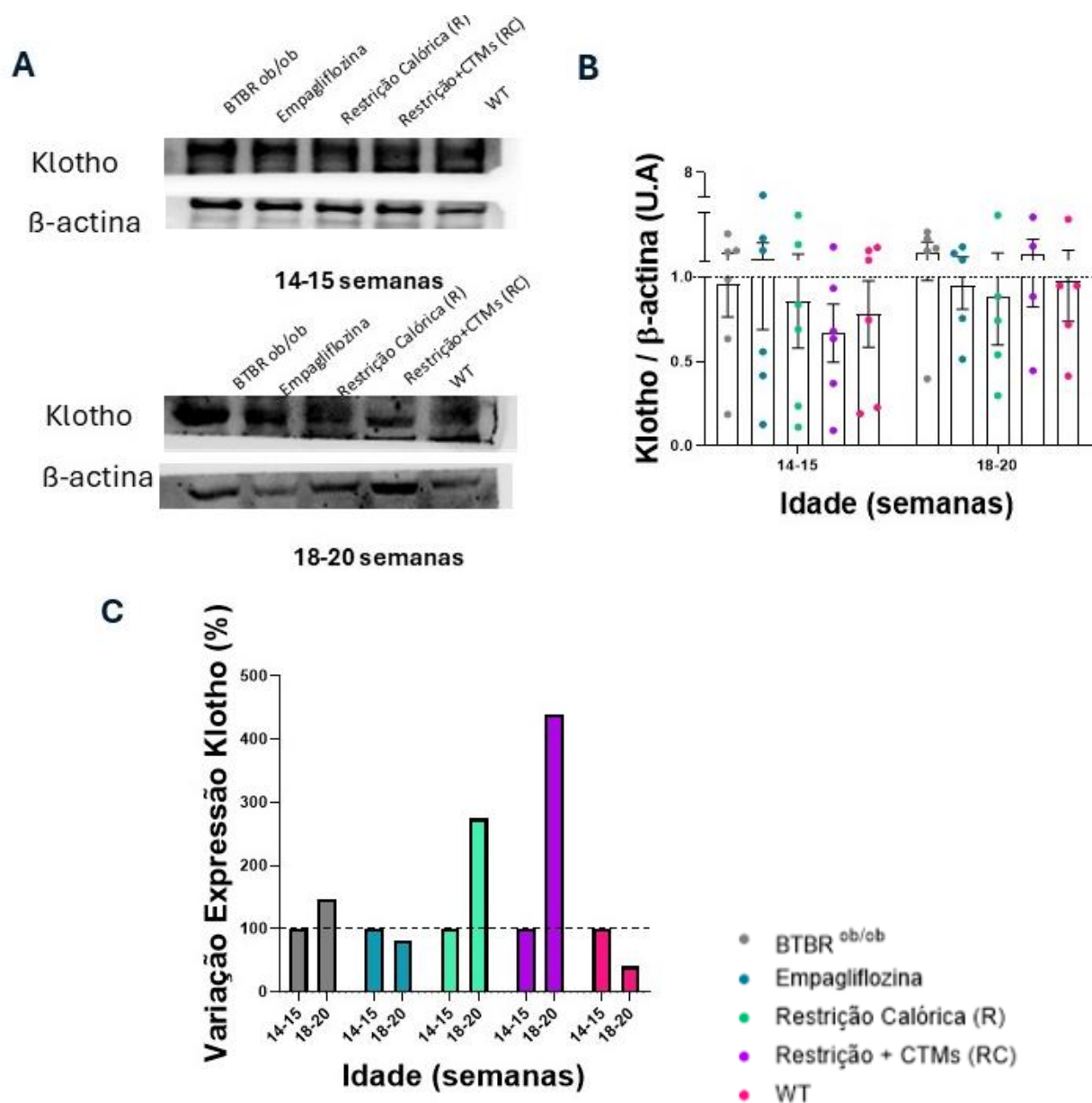


Foi realizada análise estatística de Kruskal-Wallis, seguida pela comparação múltipla de Dunn para a comparação de três grupos; não foi observada significância estatística. Os dados são representativos de $n=3-6$. (A) Géis de *Western blot*. (B) Quantificação da expressão de s6 fosforilada. (C) Variação, em porcentagem, da expressão de s6 fosforilada no Grupo BTBR^{ob/ob} de 14-15 semanas e 18-20 semanas comparativamente a 6 semanas.

Figura 14. Análise da expressão proteica cortical basal de s6 fosforilada em camundongos BTBR^{ob/ob}

3.6 Expressão proteica cortical total de Klotho por meio de *Western blot*

Conforme demonstrado na figura 15A e B, a análise da expressão de Klotho nos grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R, RC e WT e, 14-15 semanas foi correspondente a, respectivamente, $0,96 \pm 0,19$; $1,03 \pm 0,34$; $0,86 \pm 0,28$; $0,66 \pm 0,17$ e $0,78 \pm 0,19$. Em 18-20 semanas, por sua vez, a expressão nos grupos foi correspondente a, respectivamente, $1,18 \pm 0,20$; $0,94 \pm 0,14$; $0,88 \pm 0,28$; $1,13 \pm 0,31$ e $0,97 \pm 0,24$. A variação, em porcentagem, nesta idade em comparação a 14-15 semanas nos grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R, RC e WT, respectivamente, foi de 147,48; 20,99; 274,21; 439,22 e 40,50%, conforme observado na figura 15C.

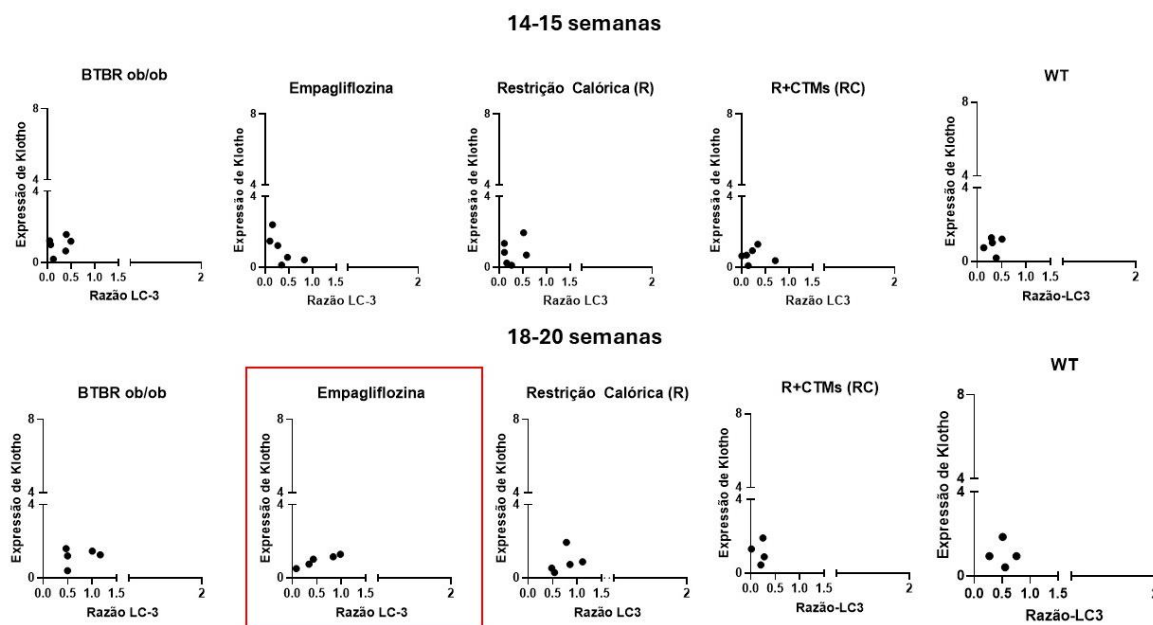


Foram realizadas análises estatísticas de modelo misto, seguida por comparações múltiplas de Tukey, nas quais não foi observada significância estatística. Os dados são representativos de n=5-6. (A) Géis representativos de *Western blot*. (B) Quantificação da expressão proteica de Klotho. (C) Cálculo da variação, em porcentagem, da expressão de Klotho em 18-20 semanas em comparação a 14-15 semanas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 15. Análise da expressão proteica cortical de Klotho em camundongos BTBR^{ob/ob} e WT

3.6.1 Correlação entre *micotubule-associated protein light chain 3* e Klotho

Conforme observado na figura 16, a expressão de Klotho se mostrou positivamente correlacionada à razão de LC3.



Correlação de Spearman entre expressão de LC3 e Klotho. No Grupo Empagliflozina em 18-20 semanas, foi observada correlação de $r=1,0$ e $p=0,0167$. Os dados são representativos de $n=5-6$.

Figura 16. Correlação entre a razão de LC3 e a expressão proteica de Klotho em camundongos BTBR^{ob/ob}

3.7 Análises da expressão de Klotho por meio de Imunohistoquímica

3.7.1 Expressão cortical total de Klotho

Conforme demonstrado na figura 17A e B, a expressão cortical de Klotho em 14-15 semanas de idade nos grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R, RC e WT foi, respectivamente, de $4,46 \pm 1,13$; $4,55 \pm 0,76$; $3,64 \pm 0,68$; $4,02 \pm 0,85$; $1,12 \pm 0,79\%$. Em 18-20 semanas, por sua vez, a expressão foi correspondente a, respectivamente, $1,93 \pm 0,37$; $3,66 \pm 0,70$; $2,14 \pm 0,75$; $1,35 \pm 0,60$ e $3,75 \pm 0,55\%$. Nesta idade, o Grupo WT apresentou menor expressão de Klotho em comparação ao Grupo BTBR^{ob/ob} e empagliflozina ($p=0,046$ e $p=0,0385$, respectivamente).

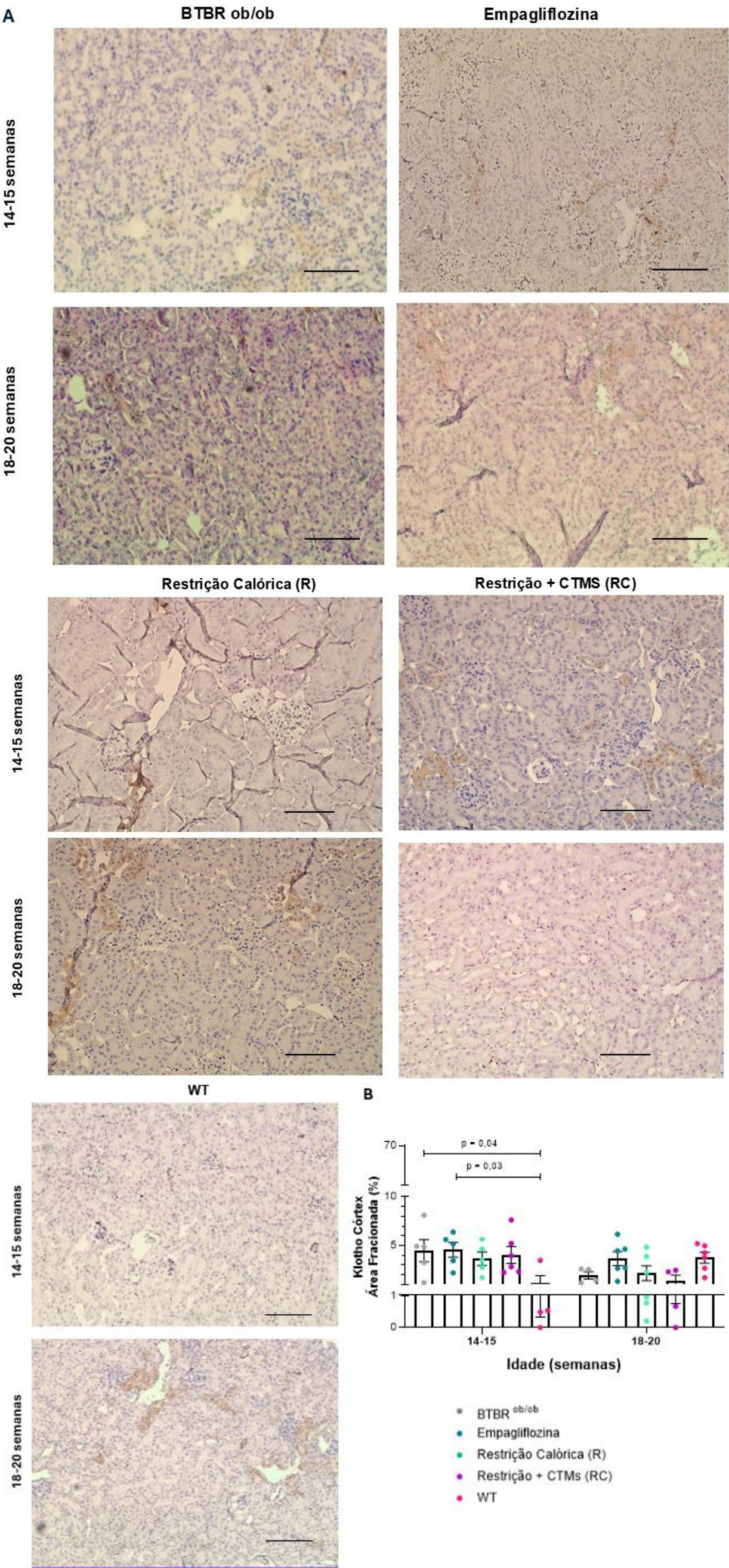
3.7.2 Expressão glomerular de Klotho

As análises glomerulares, conforme visto na figura 18A e B, demonstraram nos grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R, RC e WT em 14-15 semanas correspondente a $1,25 \pm 0,60$; $0,58 \pm 0,13$; $1,15 \pm 0,49$; $0,52 \pm 0,17$ e $0,25 \pm 0,051\%$. Em

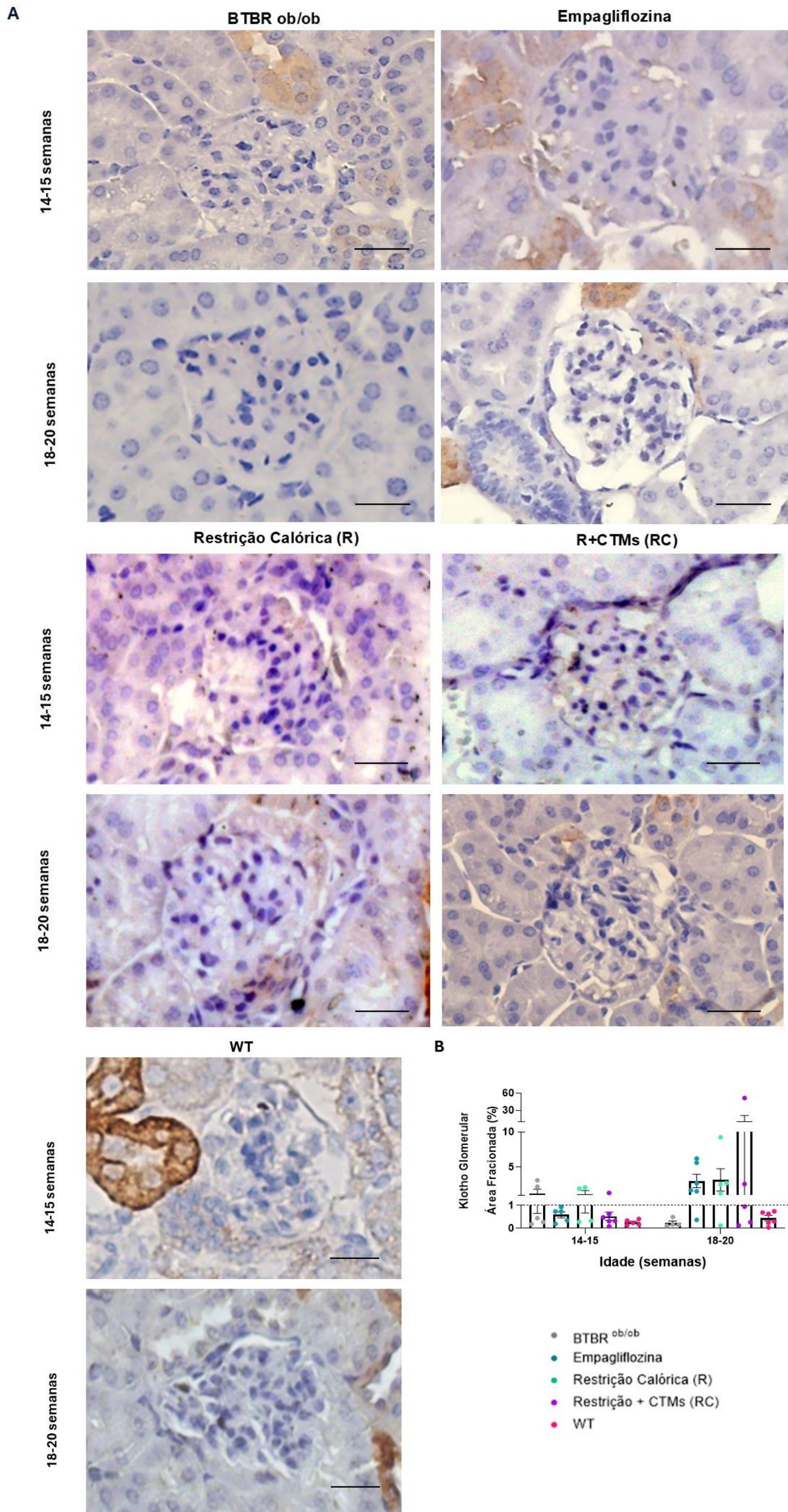
18-20 semanas, por sua vez, os valores foram de, respectivamente, $0,23 \pm 0,08$; $3,03 \pm 0,96$; $3,18 \pm 1,58$; $11,07 \pm 10,09$ e $0,44 \pm 0,11\%$.

3.7.3 Expressão medular de Klotho

As análises medulares, conforme visto na figura 19A e B, demonstraram expressão de Klotho nos grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R, RC e WT em 14-15 semanas correspondente a $4,75 \pm 3,74$; $5,41 \pm 2,75$; $6,48 \pm 1,85$; $9,53 \pm 1,69$ e $2,62 \pm 2,62\%$. Em 18-20 semanas, por sua vez, os valores foram de, respectivamente, $1,87 \pm 1,53$; $4,55 \pm 1,61$; $4,33 \pm 2,55$; $4,47 \pm 2,69$ e $8,58 \pm 4,02\%$.

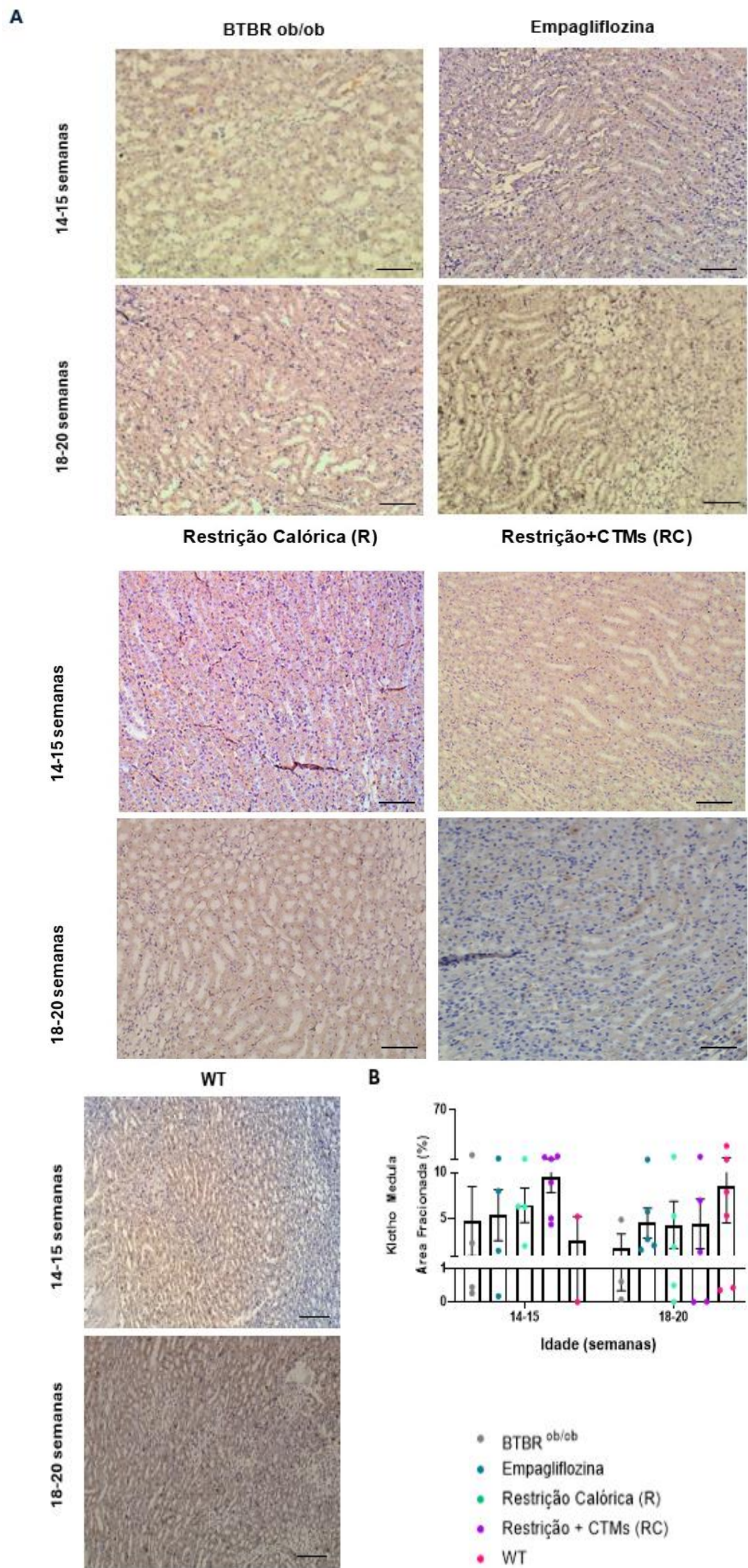


Foi realizada análise estatística de modelo misto, seguida por comparações múltiplas de Tukey e/ou Sidak. As linhas contínuas representam $p < 0,05$. Os dados são representativos de $n = 4-6$. As barras de escala representam $50\mu\text{m}$. (A) Imagens histológicas representativas. (B) Quantificação da expressão. **Figura 17.** Análise da expressão cortical total de Klotho em camundongos BTBR^{ob/ob}



Destaca-se a marcação rara nos grupos BTBR^{ob/ob}, seguida pelo Grupo Empagliflozina. O Grupo R apresentou marcação glomerular mais intensa em ambos os *time-points*, assim como o Grupo RC apresentou tal perfil em 14-15 semanas de idade. No Grupo WT, a marcação glomerular de Klotho se mostrou mais atenuada em ambas as idades. Foi realizada análise estatística de modelo misto, seguida por comparações múltiplas de Tukey e/ou Sidak. Os dados são representativos de n=4-6. As barras de escala representam 50µm. (A) Imagens histológicas representativas. (B) Quantificação da marcação.

Figura 18. Análise da expressão glomerular de Klotho em camundongos BTBR^{ob/ob}



Foi realizada análise estatística de modelo misto, seguida por comparações múltiplas de Tukey. Os dados são representativos de n=2-6. As barras de escala representam 50µm. (A) Imagens histológicas representativas. (B) Quantificação da marcação.

Figura 19. Análise da expressão medular de Klotho em camundongos BTBR^{ob/ob}

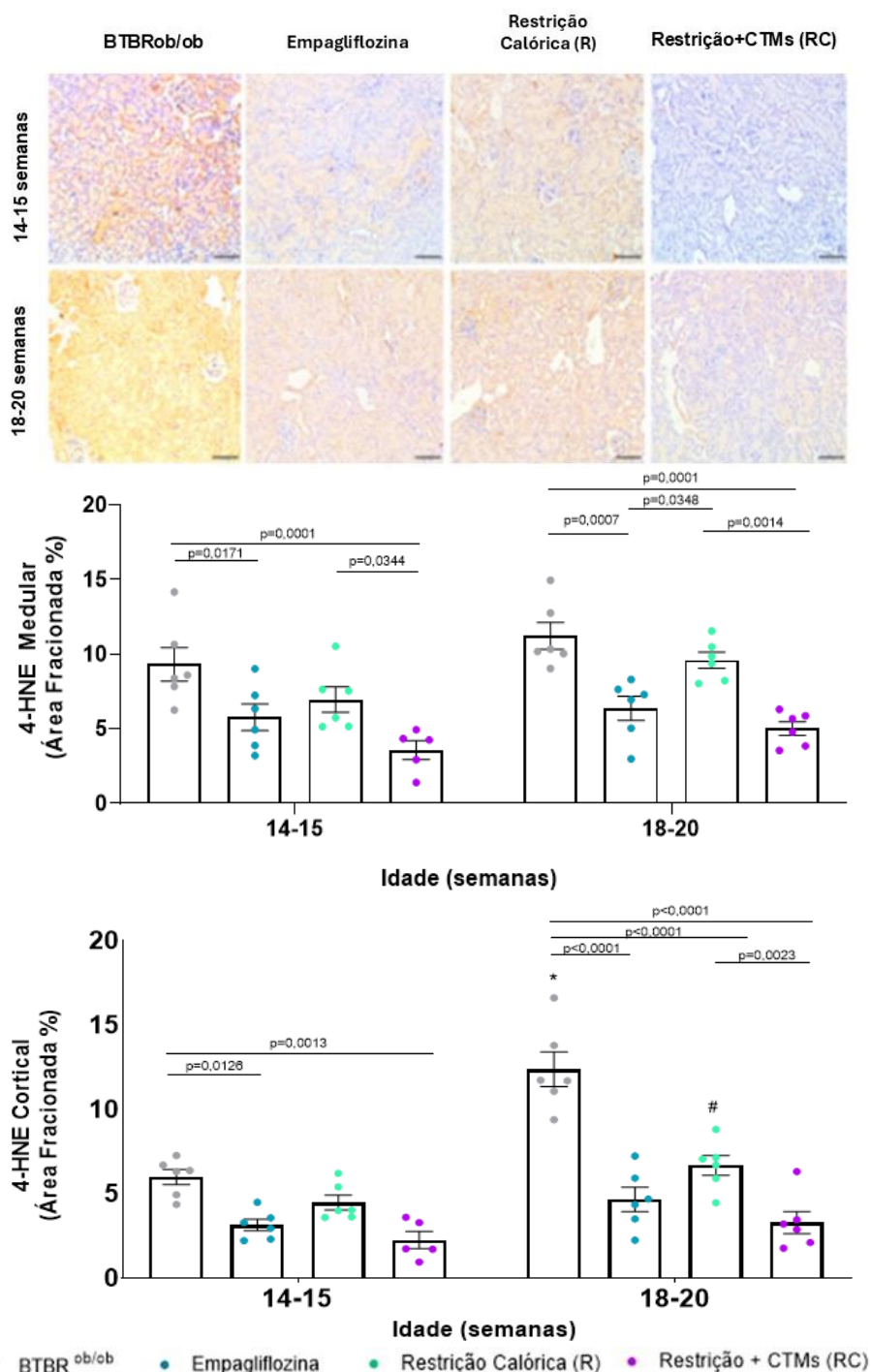
3.7.4 Correlação entre o estresse oxidativo e a expressão de Klotho

Conforme previamente publicado por Beyerstedt et al.⁽⁸²⁾ e com as análises estatísticas refeitas neste trabalho, devido à remoção de um grupo experimental, em 14-15 semanas, o Grupo BTBR^{ob/ob} apresentou a maior taxa de estresse oxidativo cortical - $5,97 \pm 0,45\%$ (Figura 20). O Grupo Empagliflozina, por sua vez, apresentou valores de $3,12 \pm 0,34\%$; o Grupo R, de $4,46 \pm 0,43\%$ e, por fim, o Grupo RC, de $2,24 \pm 0,50\%$. Nesta idade e compartimento, o estresse oxidativo foi reduzido no Grupo Empagliflozina e RC em comparação ao BTBR^{ob/ob} ($p=0,0126$; $p=0,0013$, respectivamente).

Em 18-20 semanas, os valores apresentados foram de, respectivamente, $12,36 \pm 1,02$, $4,64 \pm 0,72$, $6,66 \pm 0,58$ e $3,27 \pm 0,66\%$. O Grupo BTBR^{ob/ob} apresentou o maior estresse oxidativo cortical nesta idade em comparação aos grupos Empagliflozina, R e RC (todos com $p<0,001$). O Grupo RC também apresentou menor estresse oxidativo comparativamente ao Grupo R ($p=0,0023$). Por fim, o Grupo BTBR^{ob/ob} e R apresentaram aumento significativo do estresse oxidativo em 18-20 semanas em comparação a 14-15 semanas ($p<0,001$ e $p=0,0252$, respectivamente).

No compartimento medular, por sua vez, as taxas de estresse oxidativo em 14-15 semanas nos grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R e RC foram de, respectivamente, $9,31 \pm 1,12$, $5,76 \pm 0,89$, $6,95 \pm 0,84$ e $3,57 \pm 0,63\%$. O Grupo BTBR^{ob/ob} apresentou o maior estresse oxidativo medular comparativamente ao Grupo Empagliflozina ($p=0,0171$) e RC ($p=0,0001$). O Grupo R também apresentou maior valor neste parâmetro em relação ao Grupo RC ($p=0,0344$).

Em 18-20 semanas, os valores para os grupos BTBR^{ob/ob}, Empagliflozina, R e RC foram de, respectivamente, $11,21 \pm 0,89$; $6,36 \pm 0,81$; $9,58 \pm 0,55$ e $5,00 \pm 0,46\%$. Similarmente à idade anterior, o Grupo BTBR^{ob/ob} apresentou maior estresse oxidativo medular quando comparado aos grupos Empagliflozina e RC ($p=0,0007$; $p<0,0001$, respectivamente). O Grupo R, por sua vez, também apresentou maior valor neste parâmetro em comparação aos grupos Empagliflozina e RC ($p=0,0348$; $p=0,0014$, respectivamente).

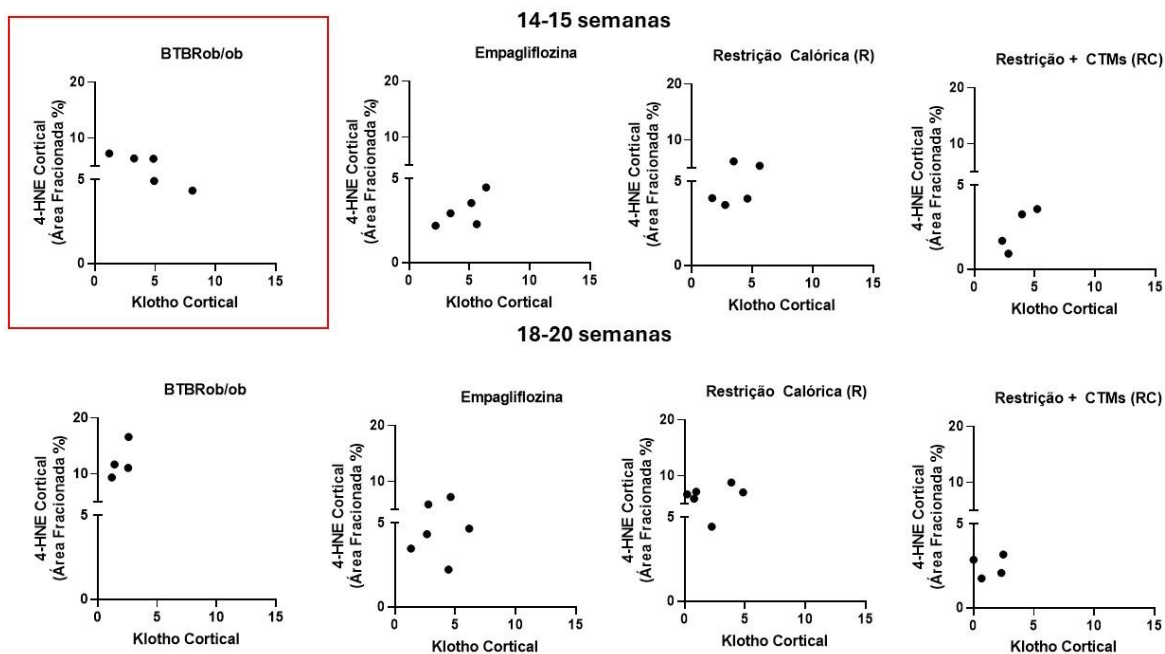


Imagens histológicas representativas e sua quantificação da marcação. Dados previamente publicados por Beyertedt et al.,⁽⁸²⁾ com repetição de análises estatísticas devido à remoção de um dos grupos experimentais. Foi realizada análise estatística de modelo misto, seguida por comparações múltiplas de Tukey e/ou Sidak, sendo * $p < 0,0001$ versus BTBR^{ob/ob} de 14-15 semanas; # $p = 0,0252$ versus restrição calórica de 14-15 semanas. Os dados são representativos de $n=6$.

Fonte: Traduzida e adaptada de Beyerstedt S, Franco ML, Carlos AK, Arjona J, Josefi-Rocha GR, Barbosa BS, et al. Combining sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor with mesenchymal stem cells and brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT) transplantation to mitigate the progression of diabetic kidney disease: a pre-clinical approach. Stem Cell Res Ther. 2025;16(1):254. Fig.6. Immunohistochemical analysis of tissue oxidative stress via lipid peroxidation using 4-HNE; p. 10.⁽⁸²⁾

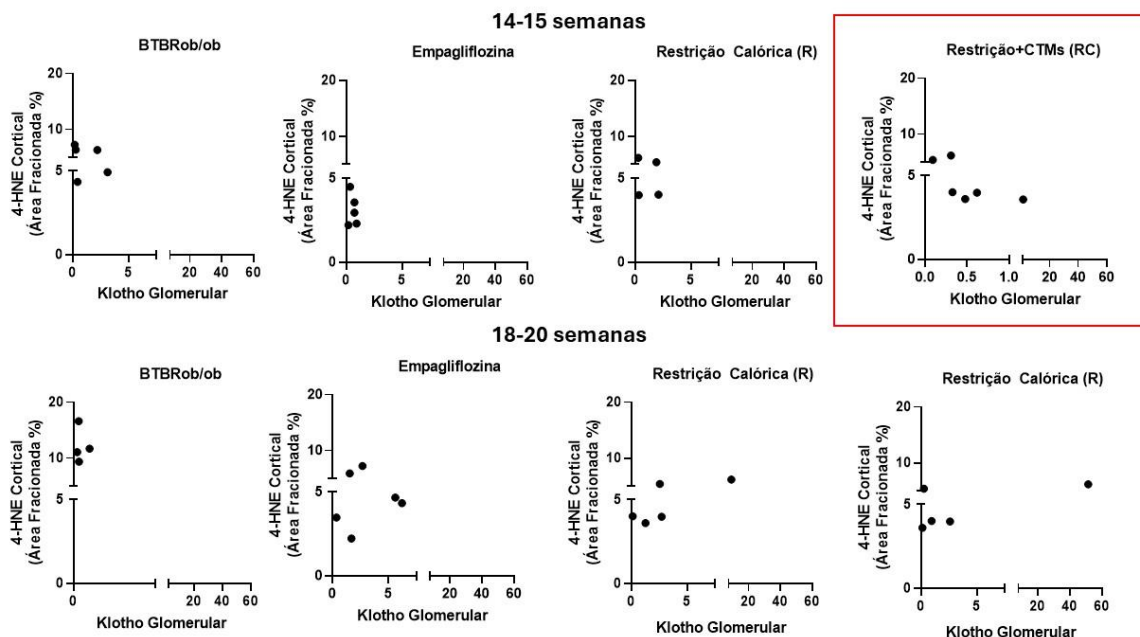
Figura 20. Reanálise do dado publicado pelo grupo do estresse oxidativo tecidual através da imunohistoquímica de 4-HNE em camundongos BTBR^{ob/ob}

Conforme observado nas figuras 21, no Grupo BTBR^{ob/ob} em 14-15 semanas, observamos correlação de Spearman negativa entre o estresse oxidativo cortical e a expressão de Klotho cortical, $r=-0,88$ e $p=0,03$. No Grupo RC, por sua vez, em 14-15 semanas, observamos correlação de Spearman negativa entre o estresse oxidativo cortical e a marcação de Klotho glomerular, $r=-0,88$ e $p=0,03$ (Figura 22). Por fim, em relação ao compartimento medular, no Grupo RC em 14-15 semanas, observamos correlação de Spearman negativa entre o estresse oxidativo medular e a marcação de Klotho medular, $r=1,0$ e $p=0,016$, enquanto em 18-20 semanas, no mesmo grupo, observamos correlação negativa, $r=-1,0$ e $p=0,016$ (Figura 23).



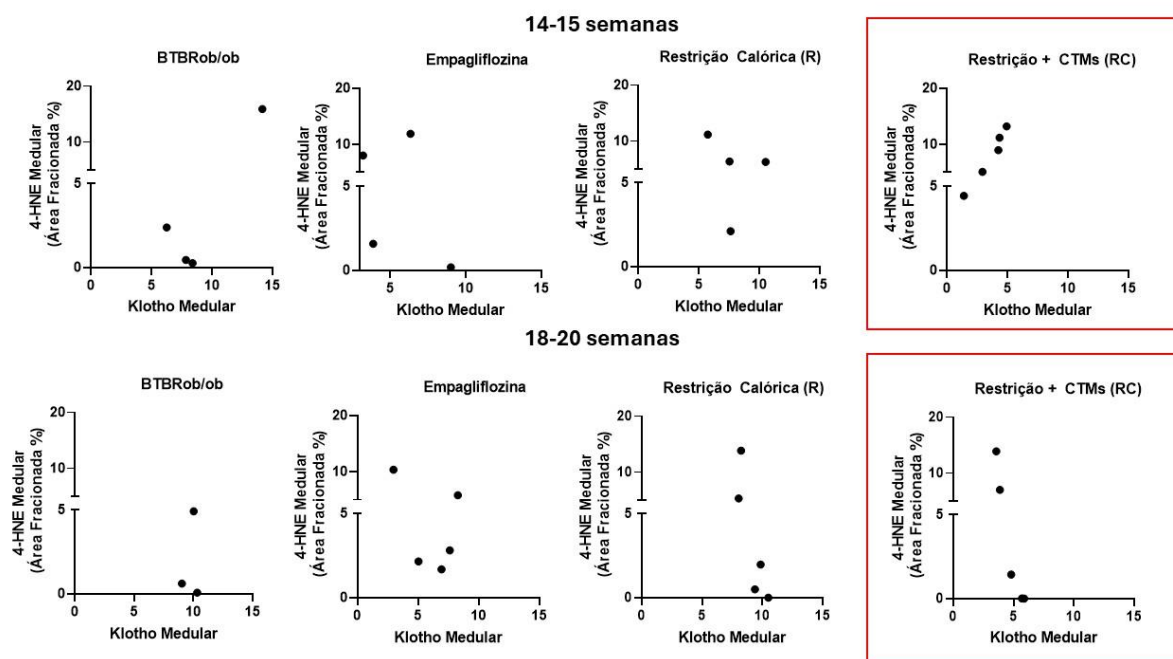
Análise de correlação de Spearman entre expressão de Klotho cortical e estresse oxidativo cortical. Em 14-15 semanas, foi observada correlação negativa no Grupo Restrição+CTMs com $r=-0,88$ e $p=0,033$. Os dados são representativos de $n=5-6$.

Figura 21. Correlação entre expressão de Klotho cortical e estresse oxidativo cortical em camundongos BTBR^{ob/ob}



Análise de correlação de Spearman entre expressão de Klotho glomerular e estresse oxidativo cortical. Em 14-15 semanas, foi observada correlação negativa no Grupo Restrição+CTMs com $r=-0,88$ e $p=0,033$. Os dados são representativos de $n=5-6$.

Figura 22. Correlação entre expressão de Klotho glomerular e estresse oxidativo cortical em camundongos BTBRob/ob



Análise de correlação de Spearman entre expressão de Klotho medular e estresse oxidativo medular. Em 14-15 semanas, foi observada correlação positiva no Grupo Restrição+CTMs, $r=1,0$ e $p=0,016$; em 18-20 semanas, foi observada correlação negativa no Grupo Restrição+CTMs, $r=-1,0$ e $p=0,016$. Os dados são representativos de $n=3-5$.

Figura 23. Correlação entre expressão de Klotho medular e estresse oxidativo medular em camundongos BTBRob/ob

3.8 Resumo das correlações

Observamos, nas tabelas 2 e 3, um resumo das correlações de Spearman encontradas nos diferentes grupos em 14-15 semanas e 18-20 semanas de idade, respectivamente. Os traços de menos ("-") simbolizam ausência de correlação entre as variáveis.

Tabela 2. Resumo das correlações de Spearman realizadas entre as variáveis na idade de 14-15 semanas para os animais BTBR^{ob/ob} em diferentes grupos experimentais

Variável	Albuminúria	Razão LC3	LC3 Cortical	LC3 Medular	Klotho	Klotho Cortical	Klotho Medular	p-s6
Glicemia	-	-	-	-	-	-	-	-
Peso	-	-	-	-	-	-	-	-
TFG	-	-	-	-	-	-	-	-
Albuminúria	-	-	-	-	-	-	-	-
Estresse oxidativo cortical	-	-	-	-	-	r= -1,0; p= 0,016 (Grupo Controle)	r=-0,88; p=0,033 (Grupo RC)	-
Estresse oxidativo medular	-	-	-	-	-	-	r=1,0; p=0,016 (Grupo RC)	-
Razão LC3	-	-	-	-	-	-	-	-
p-s6	-	-	-	-	-	-	-	-
Klotho	-	-	-	-	-	-	-	-

Os traços negativos "-" indicam ausência de correlação.

Tabela 3. Resumo das correlações de Spearman realizadas entre as variáveis na idade de 18-20 semanas para os animais BTBR^{ob/ob} em diferentes grupos experimentais

Variável	Albuminúria	Razão LC3	LC3 Cortical	LC3 Medular	Klotho	Klotho Cortical	Klotho Medular	p-s6
Glicemia	-	-	-	-	-	-	-	-
Peso	-	-	-	-	-	-	-	-
TFG	-	-	-	-	-	-	-	-
Albuminúria	-	-	-	-	-	-	-	-
Estresse oxidativo cortical	-	-	-	-	-	-	-	-
Estresse oxidativo medular	-	-	-	-	-	-	r=-1,0; p=0,016 (Grupo RC)	-
Razão LC3	-	-	-	-	-	-	-	-
p-s6	-	-	-	-	-	-	-	-
Klotho	-	r=1,0; p=0,016 (Grupo Empagliflozina)	-	-	-	-	-	-

Os traços negativos correspondem à ausência de correlação.

4 DISCUSSÃO

A complexidade fisiopatológica da DRD tem sido atual alvo de pesquisas, tanto da Ciência Básica, quanto da Aplicada. Diante do envelhecimento da população brasileira, acompanhado pela inversão no padrão de doenças infecciosas pelas doenças crônicas não-transmissíveis ao longo dos anos,⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ este tópico ganha ainda mais relevância, uma vez que a incidência da DRD – uma doença crônica - tem se elevado.

O presente trabalho teve como objetivo principal investigar a autofagia e a proteína Klotho, bem como a via mTOR, no modelo *in vivo* mais robusto de DRD e obesidade disponível atualmente. Combinando a empagliflozina e a restrição calórica às CTMs, objetivamos mimetizar a prática clínica e estudar a modulação das vias mencionadas a partir das abordagens terapêuticas realizadas. Deve-se ressaltar que não foram encontrados trabalhos na literatura abrangendo o sinergismo das terapias realizadas até o presente momento. Essa lacuna fortalece a originalidade e importância deste estudo.

Observamos em nossos dados que a glicemia apresentou, em 14 semanas, seu maior pico no Grupo BTBR^{ob/ob}, marcando um ponto crítico da DRD. O Grupo RC também acompanhou esta tendência e, embora tenha iniciado o protocolo com índices glicêmicos já mais baixos em relação ao grupo sem tratamento, observamos que a progressão da glicemia também ocorreu, como visto em 10 e 18 semanas. Os resultados, porém, demonstraram controle tempo-dependente da glicemia, de forma sustentada, na terapia celular de 12 a 14 semanas. Paralelamente, em 14 semanas, o Grupo RC apresentou o menor pico glicêmico em comparação aos demais, acompanhando o padrão do Grupo Empagliflozina, apesar da ingesta de medicação ter sido menor em relação a este último, devido à restrição calórica. As duas infusões de células foram realizadas, intencionalmente, antes do momento esperado do pico da albuminúria em nosso modelo⁽⁷³⁾ – conforme também observamos - e, de forma satisfatória, resultaram na melhora da glicemia, acompanhado pelo menor valor de albuminúria – apesar da falta de significância estatística neste último parâmetro – no Grupo RC. Estes resultados, recentemente publicados por nosso grupo⁽⁸²⁾ e que foram alvos de novas estatísticas neste trabalho, sinalizam a provável melhora no microambiente renal promovida pela terapia

realizada. É interessante notar que, assim como um dos trabalhos utilizados por nós como base para a restrição calórica,⁽⁸¹⁾ nossos resultados demonstraram controle glicêmico pela empagliflozina e, também, pela restrição calórica em 12 e 14 semanas. Porém quando as células foram adicionadas ao tratamento, este efeito foi potencializado, conforme observado pela significância estatística com o valor-p de 0,0001 no Grupo RC nestas idades.

Ainda abordando a glicemia, observamos que os grupos R e RC apresentam nova elevação glicêmica em 18-20 semanas comparativamente à idade anterior ($p > 0,05$). Este dado torna interessante o acompanhamento dos animais em *time-point* superior ao avaliado neste projeto, bem como novas infusões de CTMs. Enfatizamos que o desenho experimental, da maneira como foi proposto e realizado, focaliza nos estágios iniciais da DRD; a abordagem mais longínqua poderia explorar suas fases tardias, embora o modelo experimental utilizado não desenvolva fibrose de forma significativa.

Nesse sentido, observamos, também, o aumento do peso corporal em todos os grupos ao longo de seu envelhecimento. Esse dado ressalta a necessidade, bem como importância, de terapias multialvos na DRD, ainda que medidas farmacológicas consideradas padrão-ouro – como a empagliflozina – sejam realizadas. Por esse motivo, reconhecemos que a inclusão de exercícios físicos nos animais, por exemplo, seria um cenário relevante.

A fim de iniciarmos a exploração da fisiopatologia da doença no modelo animal, realizamos a RT-qPCR para os marcadores de autofagia, mTOR e Klotho. A níveis de expressão gênica, a potencial elevação do LC3 nos grupos Empagliflozina, R e RC sugerem sua maior autofagia. Em contrapartida, observamos, também, a expressão significativamente elevada de Raptor, um importante marcador da via mTORC1 nos mesmos grupos, a qual possa se dever à compensação da ativação da via, visto que a expressão de s6, seu alvo *downstream*, tenha mantido sua expressão.

Os resultados do *Western blot* corroboram com o aumento do fluxo autofágico no Grupo BTBR^{ob/ob} com o decorrer da história natural da DRD, conforme demonstrado em outro trabalho de nosso grupo.⁽⁸⁰⁾

A elevação de LC3-II, conforme observado, entretanto também pode se dever à estagnação autofágica, o que resulta em acúmulo de autofagossomos e desta isoforma de LC3 nas células. A autofagia é uma via dinâmica, complexa,

principalmente, devido a suas múltiplas etapas e funções a depender do microambiente e tipo celular. Esta complexidade também se traduz nas técnicas utilizadas, as quais apresentam diversas limitações quanto às suas conclusões, conforme explorado na literatura ao longo da realização do trabalho. Notavelmente, o uso de inibidores, por exemplo, é interessante, porém também podem afetar a viabilidade e comportamento celular, apresentando um ponto negativo acerca de seu uso.⁽⁸⁴⁾ Nesse sentido, a análise da razão entre LC3-II e LC3-I é amplamente realizada, quando possível, e correlacionada a outros métodos, principalmente o de imunofluorescência, em que é possível observar e quantificar a formação de autofagossomos.⁽¹⁹⁾

É importante ressaltar que os trabalhos recentes disponíveis na literatura que utilizaram o mesmo anticorpo de LC3 para *Western blot* utilizado no presente projeto não apresentaram consenso na forma de quantificação do LC3. Foi verificada a quantificação da razão LC3-II/LC3-I; de LC3-I e LC3-II mensuradas isoladamente e apresentadas no mesmo trabalho; somente de LC3-II. É válido mencionar, também, que um dos trabalhos não pôde detectar a forma LC3-II. Ademais, os valores indicados pela densitometria do *Western blot* também se mostraram baixos, conforme observado neste projeto, também. Sendo assim, as análises apresentadas estão consistentes e compatíveis com outros dados disponíveis, embora nem todos correspondam ao cenário renal e de DRD.⁽⁸⁵⁻⁹³⁾

Com base nesses estudos, optamos em apresentar tanto as formas isoladas de LC3, quanto sua razão e soma, em conjunto aos dados de imunohistoquímica – na qual a distinção entre as formas LC3-I e LC3-II não é possível, justificando a apresentação da soma de ambas nas análises de *Western blot* também.

Apesar deste ponto, conseguimos observar com esse trabalho a dualidade da regulação da via da autofagia, a depender do microambiente e do compartimento em que as células estão inseridas. Fundamental para células com ausência de capacidade proliferativa como os podócitos, observamos, de fato, a expressão potencialmente elevada de LC3-I e LC3-II nos animais BTBR^{ob/ob} de 5-6 semanas, ou seja, antes do estabelecimento da DRD esperado para o modelo.⁽⁷³⁾ Em 14-15 semanas, por outro lado, observamos a expressão menos acentuada de LC3-I neste grupo, seguida por sua elevação em 18-20 semanas, assim como o LC3-II. Em 18-20 semanas, os valores de LC3-I e LC3-II se tornam similares, apontando tanto para a maior ativação da via, quanto para sua perda de funcionalidade ao longo da

história natural da DRD. Nesse sentido, o estudo proteico do marcador p62 enriqueceria esta discussão, permitindo a análise mais assertiva do fluxo autofágico.

Além disso, tendo em vista a progressão da obesidade, a hiperativação da via mTORC1 – uma das principais contrarreguladoras da autofagia – é esperada; a expressão de S6 fosforilada se mantém no grupo sem tratamento. Diante das condições de maior estresse intracelular, como observado pelo aumento do estresse oxidativo, por exemplo, a demanda pela autofagia também se eleva; em hiperativação, porém, esta via resulta em morte celular. Nesse sentido, observamos a albuminúria elevada no Grupo BTBR^{ob/ob} juntamente à redução da TFG em 18-20 semanas. Estes resultados funcionais convergem com as observações moleculares obtidas e com a literatura acerca destes pontos, conforme revisado recentemente por Zhong et al.⁽⁹⁴⁾

Sendo o modelo utilizado neste trabalho correspondente às fases iniciais do DM e da DRD, espera-se elevação da autofagia, seguida por sua estagnação,^(25,95) como sugerido pelos nossos dados.

Visando avaliar a compartimentalização da via, realizamos as análises de imunohistoquímica para o LC3. É importante ressaltar que, enquanto no *Western blot* foi possível diferir entre as formas LC3-I e LC3-II, na imunohistoquímica (bem como na RT-qPCR) este discernimento não foi possível. Por outro lado, esta técnica histológica fornece a rica análise anatômica e compartimentalizada do alvo de estudo, sendo um ponto positivo em relação ao *Western blot*, e justificando a utilização de ambos os métodos.

Ainda assim, observamos redução da marcação cortical e medular de LC3, bem como sua marcação rara e difusa nos glomérulos do grupo sem tratamento. O resultado aponta para a degradação dos autofagossomos, diante do maior fluxo autofágico no grupo, o que corrobora com as observações anteriormente discutidas.

No grupo de terapia celular – RC – o controle sustentado da hiperglicemia por 4 semanas provavelmente tenha contribuído para a melhora do microambiente renal, conforme observado na menor albuminúria e maior TFG observada neste grupo em comparação ao controle, embora sem significância estatística. De fato, a redução do estresse oxidativo em ambos os *time-points* avaliados converge com estas observações, bem como a redução da ativação de S6 em 18-20 semanas, acompanhando o comportamento do Grupo Empagliflozina.

Interessantemente, além da ausência de aumento do fluxo autofágico no mesmo padrão do grupo sem tratamento, como visto no *Western blot* e na imunohistoquímica, a marcação de LC3 se mostrou mais presente nos glomérulos, especialmente nas células glomerulares parietais. Esse dado aponta, de forma interessante, para a autofagia funcional neste grupo, ao passo que não temos a mesma observação no grupo DRD, em que a via se apresenta de maneira disfuncional (danosa). Alguns trabalhos experimentais, em pacientes e no mesmo modelo animal utilizado neste projeto, sugerem que as células parietais glomerulares possam se diferenciar em podócitos no DM, diante de lesões severas.^(96,97) É importante ressaltar, no entanto, que este tópico ainda está em estudo atualmente e que ainda não há consenso sobre a função das células glomerulares parietais no cenário de doenças renais, pois trabalhos também demonstram sua ativação associada à moléculas inflamatórias, conforme revisado por um grupo de pesquisa chinês.⁽⁹⁸⁾

Ainda sobre a autofagia, as CTMs são potenciais moduladoras positivas autofágicas.^(99,100) Neste estudo, porém, os estágios da DRD são iniciais, momento em que, conforme publicado pelo nosso grupo em 2021⁽⁸⁰⁾ e visto, novamente, neste projeto, a autofagia se apresenta hiperativada. Desta maneira, em *time-points* mais tardios do que 18-20 semanas e com novas infusões de CTMs nestes, seria possível explorar como esta modulação ocorre.

Em relação à proteína Klotho, de forma inesperada, encontramos expressão mantida no Grupo BTBR^{ob/ob} através do *Western blot*, e na imunohistoquímica, sua expressão foi ainda maior que os animais saudáveis WT em 14-15 semanas. Considerando-se novamente as idades do modelo, é possível que, se observássemos Klotho em idades mais tardias, veríamos seu decréscimo, conforme sugerido pelo aumento de sua expressão no grupo saudável em 18-20 semanas. Sendo Klotho relacionada ao envelhecimento,⁽¹⁰¹⁾ essa observação corrobora a idade que estamos trabalhando com este modelo. Ademais, os camundongos BTBR^{ob/ob} apresentam hipertrofia glomerular e tubular, devido à obesidade e hiperglicemia crônicas; nesse sentido, trabalhos prévios e recentes do grupo demonstraram, por exemplo, a maior expressão de SGLT2 e de marcadores podocitários como alfa-actinina4, nefrina e sinaptopodina nos animais.^(82,102) Esta observação também pode justificar os níveis de Klotho encontrados no Grupo BTBR^{ob/ob}.

Em concordância com a literatura, conforme exploramos em nossa revisão narrativa publicada em 2021,⁽³⁹⁾ observamos que o estresse oxidativo cortical se mostrou menor diante da maior expressão de Klotho cortical em 14-15 semanas no Grupo BTBR^{ob/ob}, embora não tenhamos avaliado a causalidade entre ambas as variáveis.

É interessante resgatar que, nesta mesma idade e grupo, a expressão de LC3 glomerular se mostrou rara e difusa. No Grupo RC, por sua vez, a expressão glomerular de LC3 – que se mostrou, majoritariamente, parietal – se correlacionou negativamente com o estresse oxidativo cortical. Na medula do grupo RC, por outro lado, em 14-15 semanas, a correlação foi positiva, denotando que os níveis de Klotho aumentados convergiram com o estresse oxidativo medular elevado, de forma inesperada. Em 18-20 semanas, este padrão se inverte e a expressão de Klotho glomerular passa a se correlacionar negativamente com o estresse oxidativo cortical.

Em relação à expressão medular de Klotho, nas análises das lâminas, observamos marcação significativa em comparação aos tecidos negativos, porém, segundo a literatura, esta proteína não é amplamente encontrada neste compartimento renal, embora alguns trabalhos demonstrem sua expressão medular.^(103,104) Nesse sentido, seria necessário detalhar esta análise ainda mais em tipos de túbulos marcados e com experimentos complementares, como, por exemplo, imunofluorescência com colocação para marcadores tubulares e de ductos coletores.

Estes dados mostram, na prática, a dinamicidade da autofagia diante da história natural da DRD e da intervenção no Grupo RC, bem como a importância do microambiente na funcionalidade de Klotho e vice-versa. Como mencionado, não avaliamos a causalidade entre as variáveis, somente correlações de Spearman (devido à sua distribuição). Com base na literatura e nos trabalhos anteriores do grupo, porém, observamos que o controle glicêmico em 14-15 semanas contribui para o menor estresse oxidativo neste grupo e idade. Como consequência, há menor demanda para ativação autofágica e retardo de sua elevação, contrastando com o Grupo BTBR^{ob/ob}, assim como maior preservação renal observada pelos dados funcionais e correlação inversa de Klotho – a proteína renoprotetora de nosso interesse - com estresse oxidativo cortical. Mesmo diante da elevação da glicemia e peso em 18-20 semanas neste grupo, há, também, a redução da expressão de s6

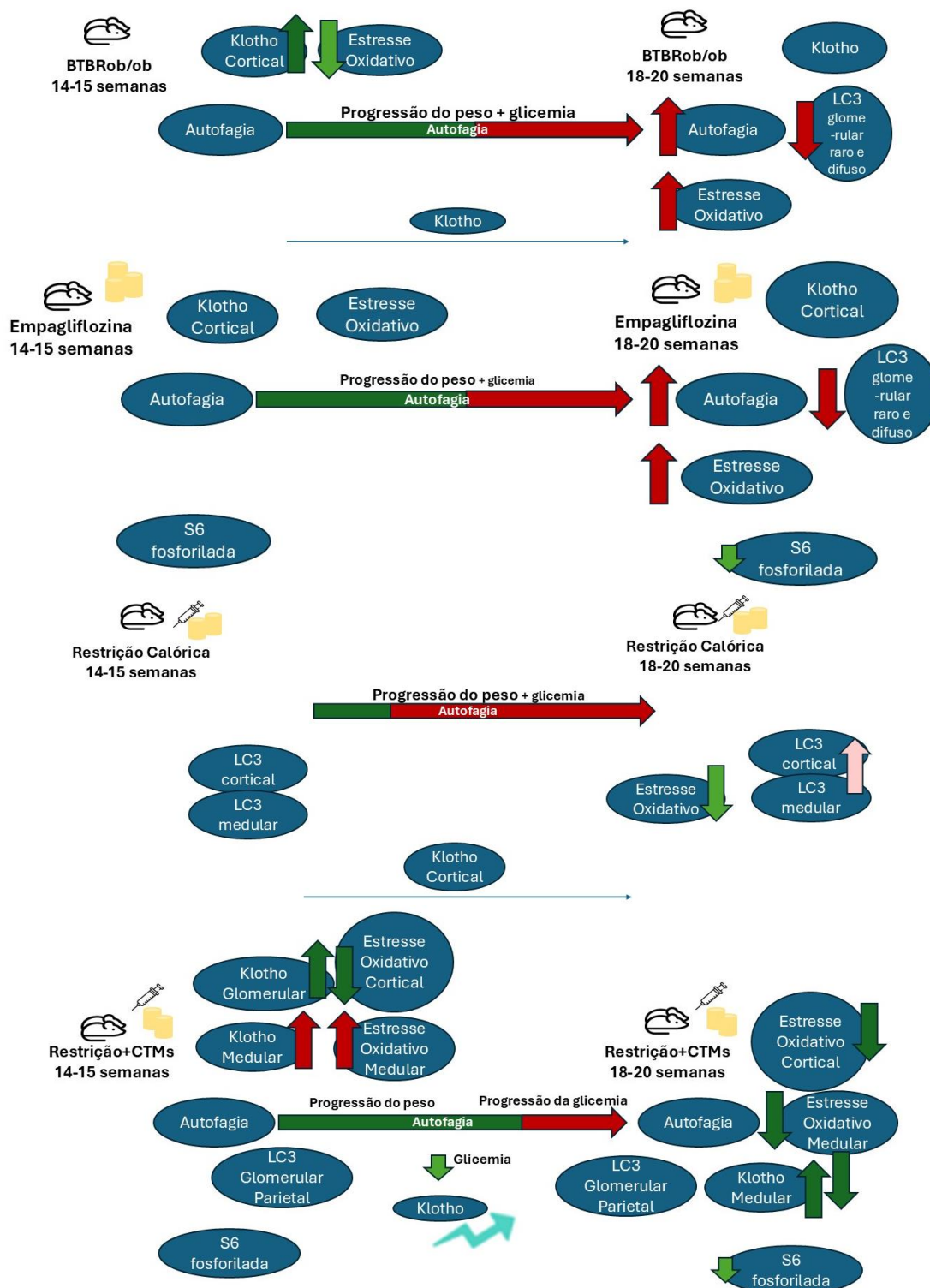
fosforilada em comparação a 14-15 semanas, similarmente ao Grupo Empagliflozina, nesta idade. Diante do retardo no dano tecidual no Grupo RC, a proteína Klotho pode ter sido favorecida em sua preservação e função, conforme observado pelas correlações apresentadas nesta idade e grupo.

É válido ressaltar que a empagliflozina, de acordo com a literatura, promove o fluxo autofágico, bem como a inibição da via mTORC1. Além de termos observado a redução da fosforilação de S6 em 18 semanas, conforme abordado anteriormente, observamos, também, a correlação positiva de Klotho e fluxo autofágico neste grupo e idade. Este fármaco também atenua o estresse oxidativo renal no cenário do DM. Nosso achado fortalece essas observações. Interessantemente, as CTMs aliadas à restrição calórica trazem padrões de modulação das vias de forma similar ao Grupo Empagliflozina, com o adicional do controle glicêmico – dado não observado no Grupo Empagliflozina no tempo avaliado - embora não tenham sido observadas correlações nos mesmos parâmetros de forma idêntica. Paralelamente, apesar da restrição calórica realizada com administração de empagliflozina, sem as células, ter controlado o estresse oxidativo, este achado só ocorreu em 18-20 semanas e em níveis mais elevados do que os apresentados pelo Grupo RC. O Grupo R também não apresentou controle glicêmico sustentado como o Grupo RC.

Os dados, entretanto, são promissores, e apontam para o potencial da terapia celular na atenuação da hiperativação autofágica presente nos estágios iniciais da DRD, bem como na modulação da via mTOR. Ademais, o trabalho também fortalece que estes efeitos estejam associados à expressão de Klotho, embora a relação de causalidade não tenha sido avaliada e, portanto, exija estudos futuros.

Observamos, nas figuras 24 e 25, demonstrações visuais que sintetizam a discussão e conclusão do trabalho.

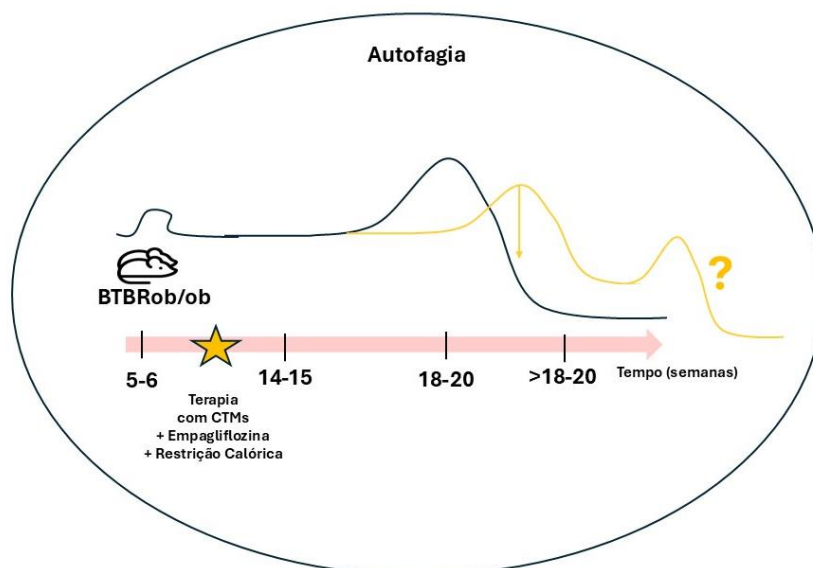
Apesar disso, o trabalho também apresenta limitações, como a ausência do estudo de p62 a níveis proteicos, o baixo N experimental no corte medular em algumas análises devido à perda do tecido ao longo da imunohistoquímica e a não utilização de inibidores e/ou abordagens genéticas para estudo das vias, como o silenciamento gênico. Em conjunto, os dados reforçam a necessidade de estudos futuros, bem como fortalecem sua relevância.



No grupo sem tratamento (linha azul escuro) observamos a elevada ativação da autofagia em 5-6 semanas – provavelmente, fisiológica - enquanto em 18-20 semanas, observamos a hiperativação inicial da via diante do estresse intracelular – patológica - seguida por sua provável disfunção futura. A intervenção com CTMs (linha amarela) atenua a hiperativação observada, diante do menor estresse intracelular presente. Ao modular a via, a terapia celular, potencialmente, contribui para o papel protetor da autofagia neste cenário. O estudo em idades superiores às avaliadas neste trabalho permitiria investigar como a autofagia se manifesta diante da terapia celular a longo prazo. CTMs: células-tronco mesenquimais.

Fonte: Elaborada com a ferramenta Canva. Disponível em: <https://www.canva.com/>

Figura 24. Esquema simplificado representativo das discussões e conclusões do trabalho em cada grupo experimental do estudo



CTMs: células-tronco mesenquimais.

Fonte: Elaborada com a ferramenta Canva. Disponível em:

<https://www.canva.com/>

Figura 25. Esquema simplificado da representação da autofagia no modelo BTBRob/ob sem intervenção e com tratamento de empagliflozina, restrição calórica e CTMs

5 CONCLUSÕES

1. A terapia com células-tronco mesenquimais, empagliflozina e restrição calórica é capaz de reduzir, significativamente, a glicemia de forma tempo-dependente de 12 a 14 semanas de idade, na fase crítica da doença renal diabética. Este dado não foi observado pelas terapias isoladamente neste trabalho e em trabalhos prévios do grupo;

2. O peso dos animais, apesar de ter se mostrado reduzido no Grupo RC em algumas idades, não apresentou redução significativa de forma sustentada. Por outro lado, todos os grupos apresentaram peso maior em comparação ao grupo saudável em todos os grupos experimentais;

3. Os dados de expressão proteica demonstram aumento da razão LC3-II/LC3-I no Grupo BTBR^{ob/ob}, sugerindo maior ativação da autofagia na história natural da DRD, bem como provável estagnação futura, apontando para a perda de sua funcionalidade e seu papel dual na DRD;

4. Os dados de histologia demonstram que, no grupo saudável, a marcação glomerular de *microtubule-associated light chain protein 3* decai, ao passo que no grupo restrição calórica, a marcação cortical e medular se eleva. Em relação à marcação, esta se mostrou predominantemente parietal no Grupo RC;

5. Os níveis proteicos de Klotho se mostram similares entre todos os grupos e *time-points*. Histologicamente, a expressão cortical se mostrou elevada nos grupos BTBR^{ob/ob} e Empagliflozina em comparação aos animais WT;

6. O trabalho traz o potencial das células-tronco mesenquimais aliadas à restrição calórica e à Empagliflozina no controle do estresse oxidativo, em conjunto com a correlação entre a melhora do microambiente e a expressão de Klotho, um aspecto que ainda não havia sido observado na literatura neste modelo;

7. O potencial translacional do trabalho consiste na elucidação de vias moduladas por terapias inovadoras, como as células-tronco mesenquimais e tradicionais, como a empagliflozina e restrição calórica, permitindo o estudo da sinergia entre elas. Este fato possibilita tanto o fornecimento de dados para estudos clínicos amplos, quanto potencialização de abordagens terapêuticas disponíveis;

8. Os resultados são promissores, inéditos na literatura e incentivam novos estudos acerca das vias avaliadas em diferentes contextos, como o estudo *in vitro* e com inibidores.

6 REFERÊNCIAS

1. International Diabetes Federation. The diabetes atlas. Available from: <https://diabetesatlas.org/>
2. Ministério da Saúde. Diabetes (diabetes mellitus). Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2025 [2025 Nov 13]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/diabetes>
3. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes; 2019-2020.
4. Muskiet MH, Tonneijck L, Smits MM, Kramer MH, Heerspink HJ, van Raalte DH. Pleiotropic effects of type 2 diabetes management strategies on renal risk factors. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(5):367–81.
5. Buchanan S, Combet E, Stenvinkel P, Shiels PG. Klotho, aging, and the failing kidney. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:560.
6. Chaudhuri A, Ghanim H, Arora P. Improving the residual risk of renal and cardiovascular outcomes in diabetic kidney disease: a review of pathophysiology, mechanisms, and evidence from recent trials. *Diabetes Obes Metab*. 2022;24(3):365–76.
7. Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc*. 2018;117(8):662–75.
8. Stanton RC. Sodium glucose transport 2 (SGLT2) inhibition decreases glomerular hyperfiltration: is there a role for SGLT2 inhibitors in diabetic kidney disease? *Circulation*. 2014;129(5):542–4.
9. Brosius FC 3rd. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy. *Rev Endocr Metab Disord*. 2008;9(4):245–54.
10. Badal SS, Danesh FR. New insights into molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2014;63(2 Suppl 2):S63–83.
11. Piccoli GB, Grassi G, Cabiddu G, Nazha M, Roggero S, Capizzi I, et al. Diabetic kidney disease: a syndrome rather than a single disease. *Rev Diabet Stud*. 2015;12(1-2):87–109.
12. Inoki K, Mori H, Wang J, Suzuki T, Hong S, Yoshida S, et al. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2181–96.
13. Nagata M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int*. 2016;89(6):1221–30.
14. Kreidberg JA. Podocyte differentiation and glomerulogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(3):806–14.
15. Grahammer F, Schell C, Huber TB. The podocyte slit diaphragm—from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(10):587–98.
16. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2006;69(12):2131–47.
17. Tang C, Livingston MJ, Liu Z, Dong Z. Autophagy in kidney homeostasis and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2020;16(9):489–508.
18. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010;221(1):3–12.
19. Bio-Techne. Autophagy. 2024 [2025 Nov 13]. Available from: <https://www.bio-techne.com/research-areas/autophagy>

20. Yang D, Livingston MJ, Liu Z, Dong G, Zhang M, Chen JK, et al. Autophagy in diabetic kidney disease: regulation, pathological role and therapeutic potential. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(4):669–88.
21. Lin TA, Wu VC, Wang CY. Autophagy in Chronic Kidney Diseases. *Cells.* 2019;8(1):61.
22. Bhatia D, Choi ME. Autophagy and mitophagy: physiological implications in kidney inflammation and diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2023;325(1):F1–21.
23. Kim SI, Na HJ, Ding Y, Wang Z, Lee SJ, Choi ME. Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)- β 1. *J Biol Chem.* 2012;287(15):11677–88.
24. Yamahara K, Kume S, Koya D, Tanaka Y, Morita Y, Chin-Kanasaki M, et al. Obesity-mediated autophagy insufficiency exacerbates proteinuria-induced tubulointerstitial lesions. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(11):1769–81.
25. Stanigut AM, Tuta L, Pana C, Alexandrescu L, Suceveanu A, Blebea NM, et al. Autophagy and mitophagy in diabetic kidney disease-a literature review. *Int J Mol Sci.* 2025;26(2):806.
26. Livingston MJ, Dong Z. Autophagy in acute kidney injury. *Semin Nephrol.* 2014;34(1):17–26.
27. Leventhal JS, Wyatt CM, Ross MJ. Recycling to discover something new: the role of autophagy in kidney disease. *Kidney Int.* 2017;91(1):4–6.
28. Khodir SA, Samaka RM, Ameen O. Autophagy and mTOR pathways mediate the potential renoprotective effects of vitamin D on Diabetic nephropathy. *Int J Nephrol.* 2020;2020:7941861.
29. Alayev A, Holz MK. mTOR signaling for biological control and cancer. *J Cell Physiol.* 2013;228(8):1658–64.
30. Loewith R, Jacinto E, Wulschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell.* 2002;10(3):457–68.
31. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004;6(11):1122–8.
32. Iwata W, Unoki-Kubota H, Kato H, Shimizu A, Matsumoto M, Imasawa T, et al. Podocyte-specific deletion of tubular sclerosis complex 2 promotes focal segmental glomerulosclerosis and progressive renal failure. *PLoS One.* 2020;15(3):e0229397.
33. Yasuda-Yamahara M, Kume S, Maegawa H. Roles of mTOR in diabetic kidney disease. *Antioxidants.* 2021;10(2):321.
34. Gomes SA, Hare JM, Rangel EB. Kidney-derived c-kit⁺ cells possess regenerative Potential. *Stem Cells Transl Med.* 2018;7(4):317–24.
35. Rangel EB, Gomes SA, Kanashiro-Takeuchi R, Saltzman RG, Wei C, Ruiz P, et al. Kidney-derived c-kit⁺ progenitor/stem cells contribute to podocyte recovery in a model of acute proteinuria. *Sci Rep.* 2018;8(1):14723.
36. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev Cell.* 2006;11(6):859–71.
37. Gödel M, Hartleben B, Herbach N, Liu S, Zschiedrich S, Lu S, et al. Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2197–209.

38. Li J, Ren J, Liu X, Jiang L, He W, Yuan W, et al. Rictor/mTORC2 signaling mediates TGF β 1-induced fibroblast activation and kidney fibrosis. *Kidney Int.* 2015;88(3):515–27.
39. Franco ML, Beyerstedt S, Rangel EB. Klotho and mesenchymal stem cells: a review on cell and gene therapy for chronic kidney disease and acute kidney disease. *Pharmaceutics.* 2021;14(1):11.
40. Lu X, Hu MC. Klotho/FGF23 axis in chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Dis (Basel).* 2017;3(1):15–23.
41. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev.* 2012;92(1):131–55.
42. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and chronic kidney disease. *Contrib Nephrol.* 2013;180:47–63.
43. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science.* 2005;310(5747):490–3.
44. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, et al. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem.* 2011;286(10):8655–65.
45. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Kuro-o M, Moe OW. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int.* 2010;78(12):1240–51.
46. Lousa I, Reis F, Beirão I, Alves R, Belo L, Santos-Silva A. New potential biomarkers for chronic kidney disease management-a review of the literature. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):43.
47. Stevens PE, Ahmed SB, Carrero JJ, Foster B, Francis A, Hall RK, et al. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2024 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2024;105(4 4S):S117–314.
48. Naaman SC, Bakris GL. Diabetic nephropathy: update on pillars of therapy slowing progression. *Diabetes Care.* 2023;46(9):1574–86.
49. Barutta F, Bernardi S, Gargiulo G, Durazzo M, Gruden G. SGLT2 inhibition to address the unmet needs in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2019;35(7):e3171.
50. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, Fitchett D, von Eynatten M, Mattheus M, et al.; EMPA-REG OUTCOME Investigators. Empagliflozin and progression of kidney disease in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2016;375(4):323–34.
51. Maack C, Lehrke M, Backs J, Heinzl FR, Hulot JS, Marx N, et al. Heart failure and diabetes: metabolic alterations and therapeutic interventions: a state-of-the-art review from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association-European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2018;39(48):4243–54.
52. 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.
53. Seferović PM, Coats AJ, Ponikowski P, Filippatos G, Huelsmann M, Jhund PS, et al. European Society of Cardiology/Heart Failure Association position paper on the role and safety of new glucose-lowering drugs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2020;22(2):196–213.
54. Herrington WG, Staplin N, Wanner C, Green JB, Hauske SJ, Emberson JR, et al.; The EMPA-KIDNEY Collaborative Group. Empagliflozin in patients with chronic kidney disease. *N Engl J Med.* 2023;388(2):117–27.

55. Doshi SM, Friedman AN. Diagnosis and management of type 2 diabetic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(8):1366–73.
56. van Bommel EJ, Muskiet MH, Tonneijck L, Kramer MH, Nieuwdorp M, van Raalte DH. SGLT2 inhibition in the diabetic kidney-from mechanisms to clinical outcome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(4):700–10.
57. 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.
58. Choi JR, Pingguan-Murphy B, Wan Abas WA, Yong KW, Poon CT, Noor Azmi MA, et al. In situ normoxia enhances survival and proliferation rate of human adipose tissue-derived stromal cells without increasing the risk of tumourigenesis. *PLoS One*. 2015;10(1):e0115034.
59. Sávio-Silva C, Soinski-Sousa PE, Balby-Rocha MT, Lira AO, Rangel EB. Mesenchymal stem cell therapy in acute kidney injury (AKI): review and perspectives. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2020;66 Suppl 1:s45-s54.
60. Tsuji K, Kitamura S, Wada J. Immunomodulatory and regenerative effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in renal diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):756.
61. Huang Y, Yang L. Mesenchymal stem cells and extracellular vesicles in therapy against kidney diseases. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):219.
62. Hickson LJ, Abedalqader T, Ben-Bernard G, Mondy JM, Bian X, Conley SM, et al. A systematic review and meta-analysis of cell-based interventions in experimental diabetic kidney disease. *Stem Cells Transl Med*. 2021;10(9):1304–19.
63. Sun J, Zhao F, Zhang W, Lv J, Lv J, Yin A. BMSCs and miR-124a ameliorated diabetic nephropathy via inhibiting notch signalling pathway. *J Cell Mol Med*. 2018;22(10):4840–55.
64. Ni W, Fang Y, Xie L, Liu X, Shan W, Zeng R, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells transplantation alleviates renal injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(11):842–53.
65. Fisher SA, Doree C, Mathur A, Martin-Rendon E. Meta-analysis of cell therapy trials for patients with heart failure. *Circ Res*. 2015;116(8):1361–77.
66. Suncion VY, Ghersin E, Fishman JE, Zambrano JP, Karantalis V, Mandel N, et al. Does transendocardial injection of mesenchymal stem cells improve myocardial function locally or globally? An analysis from the Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis (POSEIDON) randomized trial. *Circ Res*. 2014;114(8):1292–301.
67. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al.; Canadian Critical Care Trials Group. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One*. 2012;7(10):e47559.
68. Budiman KY, Pura L, Afiatin A, Supriyadi R. Stem cell intervention and eGFR dynamics in chronic kidney disease, tracking renal function improvement: a systematic review and meta-analysis. *Int J Innov Res Scientific Studies*. 2025;8(5):1317–28.
69. Janapati YK, Junapudi S. Progress in experimental models to investigate the in vivo and in vitro antidiabetic activity of drugs. *Animal Model Exp Med*. 2024;7(3):297–309.
70. Couturier A, Calissi C, Cracowski JL, Sigaudou-Roussel D, Khouri C, Roustit M. Mouse models of diabetes-related ulcers: a systematic review and network meta-analysis. *EBioMedicine*. 2023;98:104856.

71. Zheng J, An Y, Du Y, Song Y, Zhao Q, Lu Y. Effects of short-chain fatty acids on blood glucose and lipid levels in mouse models of diabetes mellitus: a systematic review and network meta-analysis. *Pharmacol Res.* 2024;199:107041.
72. Tesch GH, Nikolic-Paterson DJ. Recent insights into experimental mouse models of diabetic nephropathy. *Nephron, Exp Nephrol.* 2006;104(2):e57–62.
73. 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.
74. Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Tesch GH. Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury. *Kidney Int.* 2004;65(1):116–28.
75. Cohen MP, Masson N, Hud E, Ziyadeh F, Han DC, Clements RS. Inhibiting albumin glycation ameliorates diabetic nephropathy in the db/db mouse. *Exp Nephrol.* 2000;8(3):135–43.
76. Mao HZ, Roussos ET, Péterfy M. Genetic analysis of the diabetes-prone C57BLKS/J mouse strain reveals genetic contribution from multiple strains. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762(4):440–6.
77. Tay YC, Wang Y, Kairaitis L, Rangan GK, Zhang C, Harris DC. Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? *Kidney Int.* 2005;68(1):391–8.
78. Breyer MD, Böttinger E, Brosius FC 3rd, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, et al.; AMDCC. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(1):27–45.
79. Clee SM, Nadler ST, Attie AD. Genetic and genomic studies of the BTBR ob/ob mouse model of type 2 diabetes. *Am J Ther.* 2005;12(6):491–8.
80. Sávio-Silva C, Soinski-Sousa PE, Simplício-Filho A, Bastos RM, Beyerstedt S, Rangel ÉB. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in a pre-clinical model of diabetic kidney disease and obesity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):1546.
81. Tanaka S, Sugiura Y, Saito H, Sugahara M, Higashijima Y, Yamaguchi J, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition normalizes glucose metabolism and suppresses oxidative stress in the kidneys of diabetic mice. *Kidney Int.* 2018;94(5):912–25.
82. Beyerstedt S, Franco ML, Carlos AK, Arjona J, Josefi-Rocha GR, Barbosa BS, et al. Combining sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor with mesenchymal stem cells and brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT) transplantation to mitigate the progression of diabetic kidney disease: a pre-clinical approach. *Stem Cell Res Ther.* 2025;16(1):254.
83. Unnikrishnan AG, Kalra S, Purandare V, Vaslawala H. Genital infections with sodium glucose cotransporter-2 inhibitors: occurrence and management in patients with type 2 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab.* 2018;22(6):837–42.
84. Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol.* 2010;221(2):117–24.
85. An YW, Liu HQ, Zhou ZQ, Wang JC, Jiang GY, Li ZW, et al. Sinoporphyrin sodium is a promising sensitizer for photodynamic and sonodynamic therapy in glioma. *Oncol Rep.* 2020;44(4):1596–604.
86. Balkrishna A, Mulay VP, Verma S, Srivastava J, Lochab S, Varshney A. Penta-o-galloyl- β -D-glucose in pistacia integerrima targets AMPK-ULK1 and ERK/STAT3 signaling axes to induce ROS-independent autophagic cell death in human lung cancer cells. *Front Pharmacol.* 2022;13:889335.

87. Ikeh KE, Lamkin EN, Crompton A, Deutsch J, Fisher KJ, Gray M, et al. REV1 Inhibition Enhances Radioresistance and Autophagy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5290.
88. Javidnia M, Hebron ML, Xin Y, Kinney NG, Moussa CE. Pazopanib reduces phosphorylated tau levels and alters astrocytes in a mouse model of tauopathy. *J Alzheimers Dis*. 2017;60(2):461–81.
89. Pereira DM, Simões AE, Gomes SE, Castro RE, Carvalho T, Rodrigues CM, et al. MEK5/ERK5 signaling inhibition increases colon cancer cell sensitivity to 5-fluorouracil through a p53-dependent mechanism. *Oncotarget*. 2016;7(23):34322–40.
90. Rutledge CA, Lagranha C, Chiba T, Redding K, Stolz DB, Goetzman E, et al. Metformin preconditioning protects against myocardial stunning and preserves protein translation in a mouse model of cardiac arrest. *J Mol Cell Cardiol Plus*. 2023;4:100034.
91. Schwarze K, Kribben A, Ritter O, Müller GA, Patschan D. Autophagy activation in circulating proangiogenic cells aggravates AKI in type I diabetes mellitus. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;315(4):F1139–48.
92. Wang S, Qian H, Zhang L, Liu P, Zhuang D, Zhang Q, et al. Inhibition of calcineurin/NFAT signaling blocks oncogenic H-Ras induced autophagy in primary human keratinocytes. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:720111.
93. Xavier JM, Morgado AL, Solá S, Rodrigues CM. Mitochondrial translocation of p53 modulates neuronal fate by preventing differentiation-induced mitochondrial stress. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(7):1009–24.
94. Zhong S, Wang N, Zhang C. Podocyte death in diabetic kidney disease: potential molecular mechanisms and therapeutic targets. *Int J Mol Sci*. 2024;25(16):9035.
95. Li QR, Xu HY, Ma RT, Ma YY, Chen MJ. Targeting autophagy: a promising therapeutic strategy for diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Diabetes Ther*. 2024;15(10):2153–82.
96. Gaut JP, Hoshi M, Jain S, Liapis H. Claudin 1 and nephrin label cellular crescents in diabetic glomerulosclerosis. *Hum Pathol*. 2014;45(3):628–35.
97. Pichaiwong W, Hudkins KL, Wietecha T, Nguyen TQ, Tachaudomdach C, Li W, et al. Reversibility of structural and functional damage in a model of advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(7):1088–102.
98. Su H, Chen S, He FF, Wang YM, Bondzie P, Zhang C. New insights into glomerular parietal epithelial cell activation and its signaling pathways in glomerular diseases. *BioMed Res Int*. 2015;2015:318935.
99. Ebrahim N, Ahmed IA, Hussien NI, Dessouky AA, Farid AS, Elshazly AM, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorated diabetic nephropathy by autophagy induction through the mTOR signaling pathway. *Cells*. 2018;7(12):226.
100. Cheng J, Zhang C. Mesenchymal stem cell therapy: therapeutic opportunities and challenges for diabetic kidney disease. *Int J Mol Sci*. 2024;25(19):10540.
101. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6655):45–51.
102. Bastos RM, Rangel EB. Gut microbiota-derived metabolites are novel targets for improving insulin resistance. *World J Diabetes*. 2022;13(1):65–9.
103. Zuo Z, Lei H, Wang X, Wang Y, Sonntag W, Sun Z. Aging-related kidney damage is associated with a decrease in klotho expression and an increase in superoxide production. *Age (Dordr)*. 2011;33(3):261–74.

104. Zhang H, Li Y, Fan Y, Wu J, Zhao B, Guan Y, et al. Klotho is a target gene of PPAR-gamma. *Kidney Int.* 2008;74(6):732–9.

Abstract

Introduction: Diabetic kidney disease is the leading cause of end-stage renal disease, and it is characterized by damage in the different renal compartments, specially, in podocytes. Autophagy and mTOR pathways' dysregulation are some of diabetic kidney disease's pathophysiology mechanisms. Besides, the reduced expression of Klotho – a renoprotective protein – has been associated with this disease as well. In this regard, cell therapy with mesenchymal-stem cells, combined with empagliflozin and calorie Restriction might represent an efficient and innovative therapeutic approach for diabetic kidney disease. **Purpose:** To evaluate the potential of bone-marrow derived mesenchymal-stem cells' treatment, allied to empagliflozin and calorie restriction, in autophagy modulation and Klotho expression in diabetic kidney disease. **Methods:** As *in vivo* experimental model, we used male mice from BTBR^{ob/ob} lineage at 14-15 weeks of age and 18-20 weeks of age. This is a knockout model for the gene of leptin; thus, it is an obese animal which develops diabetes mellitus and diabetic kidney disease, presenting hyperglycemia and proteinuria in a time-dependent pattern. Animals were divided as it follows: BTBR^{ob/ob} Group (no treatment), Empagliflozin Group, Calorie Restriction Group (this group received empagliflozin allied to a 30% calorie restriction in comparison to the Empagliflozin Group and saline administration, called as "R"), calorie restriction + mesenchymal-stem cells (this group received empagliflozin, calorie restriction and mesenchymal-stem cells administration, called as "CR"). Blood fasting glucose of animals was evaluated every other week, while their weight was analyzed three times a week – which was altered for daily measurements after a while. Furthermore, urine collection of all animals were done with the use of metabolic cages. At the end of the protocol, animals were euthanized by anesthetic overdosis and their tissues were collected for gene expression analyses, through RT-qPCR, protein expression assays, through Western blot, and histological analyses, through LC3 and Klotho immunohistochemistry assays. The used mesenchymal-stem cells were part of our biological bank, and they have been previously obtained by our group from Rosa26 mTmG mice, and they were characterized. **Results:** Mesenchymal-stem cells therapy has shown to be effective in hyperglycemia control in this model in a time-dependent way. This therapeutic approach also attenuated autophagy hyperactivated, present in early diabetic kidney disease and in our model. Lastly, this group presented higher Klotho

protein expression and it negatively correlated with cortical and medullar oxidative stress. The expression of s6 phosphorylated protein has also shown to be reduced in mesenchymal-stem cells group, which suggests mTOR pathway modulation.

Conclusion: Autophagy and mTOR pathways are modulated by mesenchymal-stem cells in combination with empagliflozin and calorie restriction. In addition, these effects are, potentially, associated with Klotho expression, though the exact elucidation of this modulation still needs to be addressed in further studies.

Keywords: Autophagy; Diabetic nephropathies; Mesenchymal stem cells; Klotho proteins