

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MINAS GERAIS – IFMG
CAMPUS BAMBUÍ
MEDICINA VETERINÁRIA**

Carolina Arruda Leite

**Proposta científica teórica para o isolamento, caracterização e aplicação de
células-tronco mesenquimais derivadas da urina (USCs) na terapia regenerativa da
doença renal crônica felina**

BambuÍ - MG

2026

Carolina Arruda Leite

**PROPOSTA CIENTÍFICA TEÓRICA PARA O ISOLAMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DERIVADAS DA URINA (USCs) NA TERAPIA REGENERATIVA DA DOENÇA
RENAL CRÔNICA FELINA**

Trabalho apresentado ao Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* Bambuí, como requisito parcial para graduação.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Soriano Araújo Barezani

Bambuí - MG

2026

Catálogo na Fonte Biblioteca IFMG - *Campus Bambuí*

L533p Leite, Carolina Arruda.

Proposta científica teórica para o isolamento, caracterização e aplicação de células-tronco mesenquimais derivadas da urina (USCs) na terapia regenerativa da doença renal crônica felina / Carolina Arruda Leite. – 2026.

102 f. : il. ; color.

Orientadora: Amanda Soriano Araújo Barezani.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Instituto Federal de Minas Gerais. *Campus Bambuí*, 2026.

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Células-tronco derivadas da urina. 3. Doença renal crônica felina. 4. Klotho. 5. Secretoma. I. Barezani, Amanda Soriano Araújo. II. Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus Bambuí*. III. Título.

CDD. 636.08969

Catálogo: João Batista Rodrigues - CRB-6/2022



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MINAS GERAIS
Campus Bambuí
Diretoria de Ensino
Departamento de Ciências Agrárias
Faz. Varginha - Rodovia Bambuí/Medeiros - Km 05 - Caixa Postal 05 - CEP 38900-000 - Bambuí - MG
37 3431 4900 - www.ifmg.edu.br

CAROLINA ARRUDA LEITE

Proposta científica teórica para o isolamento, caracterização e aplicação de células-tronco mesenquimais derivadas da urina (USCs) na terapia regenerativa da doença renal crônica felina

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – *Campus Bambuí* para obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovado em 24/08/2026 pela banca examinadora:

Bambuí, 19 de julho de 2026.



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Soriano Araujo Barezani, Professora**, em 24/08/2026, às 10:49, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **TALITA SARAH MAZZONI, Usuário Externo**, em 24/08/2026, às 10:50, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Augusto Lacorte, Professor**, em 24/08/2026, às 11:08, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.ifmg.edu.br/consultadocs> informando o código verificador **2813733** e o código CRC **4C747F3D**.

23209.002750/2026-22	2813733v1
----------------------	-----------

À minha filha, Isabela, que cresceu entendendo por que a mãe precisava estar longe e nunca deixou de me esperar.

Passei esses anos querendo que, um dia, ela entendesse que, mesmo quando a dor e as dificuldades me diziam para parar, eu escolhi continuar. Este trabalho é a realização de um sonho que também nasceu do desejo de ser, para ela, um exemplo de que algumas coisas podem ser muito difíceis sem serem impossíveis.

E é por ela que eu quero deixar também uma certeza: conhecimento é uma das poucas coisas que ninguém pode tirar da gente.

AGRADECIMENTOS

Conheci meu marido ainda na Universidade Federal de Alfenas, nos meus primeiros anos de curso. A vida colocou distância entre a gente logo em seguida: eu larguei a Biologia, ele seguiu firme nela, e passamos anos namorando à distância, até ele decidir cursar Medicina Veterinária também, no IFMG, só para estarmos juntos de novo. De lá para cá, ele nunca deixou de estar por perto, principalmente nos dias mais difíceis. Foi ele quem me carregou no colo quando as pernas não respondiam, quem esteve em cada hospital e em cada cirurgia, quem tira e coloca minha cadeira de rodas no carro sem nunca reclamar do peso dela. Não foi fácil para nenhum dos dois, mas ele escolheu ficar. E este trabalho também é um pouco dele.

Fui mãe aos dezessete anos e entrei na faculdade já convivendo com a Neuralgia do Trigêmeo, dor que a medicina considera uma das mais intensas que existem. Ouvi de muita gente que eu deveria desistir dos estudos e cuidar só da minha saúde, porque talvez nunca chegasse a exercer a profissão. Mas eu queria estudar. Queria me formar. Era um sonho que eu carregava havia muito tempo e que eu não queria entregar para a doença. Foram onze cirurgias ao longo desses anos, incontáveis internações e muitas madrugadas estudando entre uma crise de dor e outra. No meio disso tudo eu me casei, continuei sendo mãe e fui construindo, do jeito que dava, a vida que eu queria ter.

Hoje, olhar para estas páginas e saber que aquele sonho realmente aconteceu me faz sentir orgulho de mim mesma. Eu queria estudar. Queria me formar. E me formei.

Foi também nesse período que fundei a Associação Neuralgia do Trigêmeo Brasil, a ANTBR. Agradeço ao Igor e à Manu por terem construído comigo, desde o início, essa rede de apoio para quem convive com essa dor, e a cada voluntário que se somou ao longo do caminho. Ver a associação nascer e crescer enquanto eu estudava para me formar também foi uma parte importante de tudo o que vivi nesses anos. À Ana Clara, nossa diretora, que partiu recentemente e levou consigo um pedaço dessa história, deixo aqui uma lembrança carinhosa. Que bom que, em algum momento da vida, nossos caminhos se encontraram.

À minha avó, Violeta Arruda, agradeço de um jeito que nenhuma palavra dá conta direito. Foi ela quem praticamente criou minha filha Isabela nesses anos, para que eu pudesse estudar. Sabia, desde o início, o tanto que eu ia precisar de ajuda: eu era mãe solo, tinha uma recém-nascida no colo e já convivía com a dor da neuralgia. Então ela simplesmente assumiu essa parte, sem que eu precisasse pedir. E minha avó entende bem do que está falando quando o assunto é continuar apesar da dor. Viveu a vida inteira com apenas um rim e com dor crônica e, ainda assim, formou-se em Direito, tornou-se contadora e foi professora respeitada.

Nunca vi ela abaixar a cabeça para a doença, nem uma vez, e foi olhando para ela que entendi que eu também podia não abaixar a minha.

Minha filha foi criada, boa parte do tempo, pela bisavó, enquanto eu estudava, e mesmo assim ela sempre soube exatamente por que a mãe estava longe. Tinha três anos quando eu entrei na faculdade, e hoje tem doze. Cresceu entendendo que aquela distância tinha um motivo que valia a pena, e que um dia ia acabar de vez. Este TCC é esse dia. Mesmo à distância, foi o apoio dela que muitas vezes me segurou de pé nos dias mais difíceis. Houve saudade dos dois lados em muitos momentos, mas ela sempre soube que eu estava estudando para realizar um sonho que eu também queria que fosse motivo de orgulho para ela.

Filha, hoje, depois de tantos anos, essa distância finalmente acabou. Agora posso estar onde sempre quis estar: ao seu lado.

Aos meus pais, obrigada por terem me deixado crescer vendo de perto o que essa profissão exige e o que ela dá em troca, muito antes de eu escolher segui-la. Sou filha de dois médicos veterinários e, antes mesmo de decidir o que queria para o meu futuro, já conhecia o cheiro de um centro cirúrgico e o cuidado necessário para examinar um animal.

Ao Instituto Federal de Minas Gerais, Campus Bambuí, onde me formei em Medicina Veterinária e onde encontrei estrutura para dar corpo a esta pesquisa.

À Universidade Federal de Alfenas, onde cursei Ciências Biológicas. Não cheguei a concluir aquele curso, mas o tanto que aprendi por lá está espalhado por todas as páginas deste trabalho.

Foi entre essas duas universidades que também descobri uma vontade que já existia em mim há muito tempo: a de ensinar. Nas monitorias e nas oportunidades que tive ao longo desses anos, provei pela primeira vez um gostinho real de dar aula e reencontrei um sonho antigo, de quando eu era criança e brincava de professora, tendo meus cachorros como plateia. Talvez uma das coisas mais bonitas que a faculdade me tenha dado tenha sido justamente descobrir que esse sonho ainda estava aqui.

À Profa. Dra. Talita Sarah Mazzoni, que para mim é a Mãelita, apelido que nasceu do carinho de mãe que ela sempre teve comigo e que, hoje é amiga de verdade, da vida toda. Nunca fechou a porta do laboratório para mim, nem mesmo quando eu aparecia num dia qualquer à noite com a ideia de testar antidepressivos em peixes.

Ao Prof. Dr. Humberto Fonseca Mendes, o Beto, que se tornou um grande amigo da família, o cupido e padrinho do meu casamento. Foi ele quem me apresentou ao voo livre das aves, e eu e meu marido acabamos criando, por causa dele, uma miniatura de galinha, pombos, um pavão, um emu, codornas, periquitos, ring neck e outras aves. Ele me ensinou

algo que eu carrego até hoje: não é preciso prender para amar. Uma ave bem cuidada pode voar solta e, ainda assim, sempre volta para quem realmente cuida dela. Acho que essa lição vale para muito mais coisa na vida do que só para pássaros.

À Profª. Dra. Amanda Soriano Araújo Barezani, minha orientadora, que topou embarcar numa ideia que, no início, parecia mirabolante demais para um TCC de graduação. Obrigada pela confiança, pela orientação séria e, principalmente, por ter se importado comigo, não só com o trabalho, do início ao fim desse processo.

Às minhas amigas virtuais e seguidoras, que acompanharam de perto essa convivência com a dor ao longo de todos esses anos, até o tão sonhado diploma. Muitas vivem histórias parecidas com a minha, e saber que eu não estava sozinha nisso, mesmo do outro lado de uma tela, também foi parte do que me manteve em pé.

Aos amigos que a faculdade me deu, pelas noites de estudo em grupo, pelas risadas nos momentos errados e pelos desabafos nos momentos certos. Vocês tornaram tudo isso mais leve.

E, por fim, a todo mundo que acreditou que eu chegaria até aqui, mesmo sabendo o quanto tudo isso custou fisicamente para mim. E também a quem duvidou.

Foram muitos os nomes e as histórias que ficaram de fora destas páginas, mas nenhuma dessas pessoas ficou de fora daquilo que me trouxe até aqui.

Obrigada.

“Eu sabia que seria difícil. Só não aceitava que difícil fosse a mesma coisa que impossível.”

Violeta Arruda

“O meu sonho já se realizou: morar com a mamãe e o papai, juntos, para sempre.”

Isabela Arruda, aos 12 anos, quando perguntada sobre seu maior sonho.

RESUMO

A doença renal crônica figura entre as enfermidades mais prevalentes em felinos domésticos idosos e permanece sem terapêutica capaz de promover reparo do parênquima renal, o que tem estimulado a investigação de estratégias baseadas em células-tronco mesenquimais. Neste cenário, as células-tronco mesenquimais derivadas da urina (*Urine-Derived Stem Cells* – USCs) despontam como fonte de interesse ainda pouco explorada em medicina felina. O presente estudo teve como objetivo analisar criticamente se as evidências científicas atuais sustentam as USCs como fonte teoricamente mais adequada, viável e biologicamente coerente do que as fontes tradicionais para o isolamento, a caracterização e a futura aplicação terapêutica nessa enfermidade, e propor, a partir dessa análise, um protocolo laboratorial integrado. Adotou-se abordagem teórico-propositiva, conduzida por meio de revisão da literatura científica contemporânea publicada entre 2015 e 2026, consultada em bases nacionais e internacionais, com critérios de inclusão e exclusão previamente definidos e extração dos dados em matriz temática comparativa. A análise evidenciou a mudança do paradigma baseado na diferenciação celular para o predomínio da modulação biológica mediada pelo secretoma e pelas vesículas extracelulares, e demonstrou que a origem tecidual condiciona o repertório de mediadores liberados. Foram identificadas limitações das fontes convencionais, como medula óssea, tecido adiposo e tecidos perinatais, especialmente quanto à invasividade da coleta, à heterogeneidade biológica e às dificuldades de padronização. As USCs destacaram-se pela obtenção minimamente invasiva, pela possibilidade de coleta seriada e criopreservação e pela potencial afinidade biológica com o sistema nefrourológico, associada à expressão elevada de α -Klotho, proteína cuja redução acompanha a progressão da nefropatia. Foram discutidos os principais mecanismos propostos para sua atuação na doença renal crônica, incluindo modulação imunológica, atividade parácrina, preservação tubular, proteção microvascular e atenuação da fibrose renal. Constatou-se, ainda, a inexistência de estudos que tenham isolado ou caracterizado USCs na espécie felina. A partir do confronto entre os parâmetros divergentes descritos na literatura, elaborou-se um protocolo operacional que classifica cada decisão técnica quanto ao grau de sustentação disponível, distinguindo o que pode ser extrapolado de protocolos humanos, o que exigiu adaptação à espécie e o que permanece dependente de validação experimental. Concluiu-se que existe plausibilidade biológica suficiente para justificar a investigação experimental das USCs na doença renal crônica felina, sem que as evidências atuais permitam

afirmar eficácia ou segurança, razão pela qual a proposta se apresenta como hipótese cientificamente fundamentada e não como terapia validada.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais; células-tronco derivadas da urina; doença renal crônica felina; Klotho; secretoma.

ABSTRACT

Chronic kidney disease is among the most prevalent conditions in elderly domestic cats and still lacks a therapeutic approach capable of promoting repair of the renal parenchyma, which has driven the investigation of strategies based on mesenchymal stem cells. In this context, urine-derived stem cells (USCs) emerge as a source of interest that remains poorly explored in feline medicine. The present study aimed to critically analyze whether current scientific evidence supports USCs as a theoretically more suitable, feasible and biologically coherent source than traditional sources for the isolation, characterization and future therapeutic application in this disease, and to propose, based on this analysis, an integrated laboratory protocol. A theoretical-propositional approach was adopted, conducted through a review of the contemporary scientific literature published between 2015 and 2026, retrieved from national and international databases, with previously defined inclusion and exclusion criteria and data extraction into a comparative thematic matrix. The analysis evidenced the shift from the paradigm based on cellular differentiation towards the predominance of biological modulation mediated by the secretome and by extracellular vesicles, and demonstrated that tissue origin conditions the repertoire of released mediators. Limitations of conventional sources were identified, such as bone marrow, adipose tissue and perinatal tissues, particularly regarding the invasiveness of collection, biological heterogeneity and difficulties in standardization. USCs stood out for their minimally invasive collection, the possibility of serial sampling and cryopreservation, and their potential biological affinity with the nephrourological system, associated with the elevated expression of α -Klotho, a protein whose reduction accompanies the progression of nephropathy. The main mechanisms proposed for their action in chronic kidney disease were discussed, including immunomodulation, paracrine activity, tubular preservation, microvascular protection and attenuation of renal fibrosis. Furthermore, the absence of studies that have isolated or characterised USCs in the feline species was verified. From the comparison of the divergent parameters described in the literature, an operational protocol was developed, classifying each technical decision according to the degree of available support, distinguishing what can be extrapolated from human protocols, what required adaptation to the species, and what remains dependent on experimental validation. It was concluded that there is sufficient biological plausibility to justify the experimental investigation of USCs in feline chronic kidney disease, although current evidence does not allow efficacy or safety to

be asserted, which is why the proposal is presented as a scientifically grounded hypothesis rather than as a validated therapy.

Keywords: *mesenchymal stem cells; urine-derived stem cells; feline chronic kidney disease; Klotho; secretome.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA.....	8
1.2. PROBLEMA DE PESQUISA.....	9
1.3. JUSTIFICATIVA.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. OBJETIVO GERAL.....	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
3.1. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (MSCs).....	14
3.1.1. Ontogenia, Nicho Perivascular e Mecanismos de Homeostase.....	15
3.1.2. O Paradigma do Secretoma e da Modulação Biológica.....	16
3.2. DOENÇA RENAL CRÔNICA FELINA (DRC Felina).....	18
3.2.1. Fisiopatologia da DRC felina.....	18
3.2.2. Mecanismos de Progressão Clínica.....	19
3.2.3. Limitações das abordagens terapêuticas atuais.....	21
3.3. TERAPIAS CELULARES NA REGENERAÇÃO RENAL.....	21
3.3.1. Mecanismos de ação das MSCs no tecido renal.....	22
3.3.2. Efeito parácrino e modulação imunológica.....	23
3.3.3. Evidências experimentais e clínicas em modelos renais.....	24
3.4. FONTES DE OBTENÇÃO E LIMITAÇÕES CLÍNICAS.....	25
3.4.1. Medula Óssea e Tecido Adiposo.....	25
3.4.2. Fontes Neonatais e Perinatais.....	26
3.4.3. Limitações das fontes convencionais na DRC.....	27
3.5. USCs NA REGENERAÇÃO RENAL.....	28
3.5.1. Identificação e perfil biológico.....	28
3.5.2. Coleta e Desempenho Proliferativo.....	29
3.5.3. Memória epigenética e Proteína Klotho.....	29
3.5.4. Secretoma e vesículas extracelulares das USCs.....	31
3.5.5. Vantagens para o uso veterinário, lacunas e desafios.....	32
4. METODOLOGIA.....	34
4.1. NATUREZA E DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	34
4.2. ESTRATÉGIA DE BUSCA E FONTES CONSULTADAS.....	34
4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	35
4.4. EXTRAÇÃO, ORGANIZAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS.....	35
4.5. CONSTRUÇÃO DO MODELO INTEGRATIVO E DO PROTOCOLO PROPOSTO.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. ARQUITETURA GERAL DO PROTOCOLO RESULTANTE.....	37
5.2. PLANEJAMENTO OPERACIONAL, INFRAESTRUTURA E CUSTOS.....	40
5.3. COLETA POR CISTOCENTESE ESTÉRIL.....	40

5.4. TRIAGEM E TRANSPORTE DE AMOSTRAS.....	42
5.5. ISOLAMENTO CELULAR: ANÁLISE COMPARATIVA E DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO DE BANCADA.....	44
5.5.1. Comparação crítica e definição do protocolo.....	48
5.6. SEMEADURA PRIMÁRIA E SELEÇÃO POR ADESÃO DIFERENCIAL AO PLÁSTICO.....	50
5.7. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....	52
5.7.1. Concentração Fase-Específica de SFB.....	53
5.7.2. Suplementação com ITS.....	54
5.8. EXPANSÃO CELULAR, CRITÉRIOS DE PASSAGEM E MONITORAMENTO..	55
5.9. CRIOPRESERVAÇÃO E BANCOS CELULARES.....	56
5.10. CONTROLE DE QUALIDADE.....	58
5.10.1. Viabilidade celular.....	58
5.10.2. Estabilidade cromossômica.....	60
5.10.3. Detecção de micoplasma.....	60
5.11. CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA.....	61
5.12. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO TRILINEAR.....	63
5.12.1. Diferenciação Adipogênica.....	63
5.12.2. Diferenciação Osteogênica.....	63
5.12.3. Diferenciação Condrogênica.....	64
5.13. ENSAIO EXPLORATÓRIO E DIFERENCIAÇÃO RENAL.....	64
5.13.1. Indução de fenótipo tubular.....	65
5.13.2. Indução de fenótipo podocitário.....	65
5.13.3. Interpretação dos resultados.....	66
5.14. ANÁLISE DO SECRETOMA E VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	66
5.14.1. Coleta e processamento do meio condicionado.....	66
5.14.2. Análise de fatores tróficos por ELISA.....	67
5.14.3. Isolamento de exossomos por ultracentrifugação.....	68
5.14.4. Caracterização de vesículas por NTA e Western Blot.....	68
5.14.5. Protocolo alternativo, precipitação por polímero.....	69
5.15. APLICAÇÃO TERAPÊUTICA IN VIVO.....	69
5.15.1. Critérios de seleção de doadores.....	69
5.15.2. Critérios de seleção de receptores.....	70
5.15.3. Vias de administração.....	70
5.15.4. Dose celular e frequência de aplicação.....	71
5.15.5. Parâmetros clínicos de avaliação de eficácia.....	72
5.15.6. Biomarcadores séricos e urinários.....	72
5.15.7. Avaliação histopatológica renal.....	73
5.16. VALIDAÇÃO CIENTÍFICA DO DESENHO PROPOSTO.....	74
5.17. ASPECTOS ÉTICOS E REGULATÓRIOS.....	75
5.18. LIMITAÇÕES DO PROTOCOLO.....	76
6. APLICABILIDADE CLÍNICA E ONE HEALTH.....	78

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
7.1. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	80
7.2. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	80
8. REFERÊNCIAS.....	82
8.1.1. APÊNDICES.....	90
APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DE EXPANSÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE USCs.....	91
APÊNDICE B – CÁLCULO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO CELULAR.....	94
APÊNDICE C – PLANEJAMENTO OPERACIONAL, INFRAESTRUTURA, INSUMOS E ORÇAMENTO.....	95
APÊNDICE D — SÍNTESE DO PROTOCOLO PROPOSTO E PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO.....	100

1. INTRODUÇÃO

Esta introdução está estruturada em três seções complementares. Inicialmente, apresenta-se a contextualização do tema, com ênfase na evolução da medicina regenerativa e na relevância das células-tronco mesenquimais em nefrologia veterinária. Em seguida, formula-se o problema de pesquisa, delimitando a lacuna científica que justifica o estudo das células-tronco mesenquimais derivadas da urina (USCs) como alternativa terapêutica para a doença renal crônica felina. Expõe-se, ao final, a justificativa do trabalho, destacando sua relevância clínica, metodológica e institucional.

1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

A doença renal crônica é uma das enfermidades mais frequentes em gatos domésticos idosos e permanece, até hoje, sem alternativa terapêutica capaz de restaurar a função perdida. O manejo disponível controla consequências e desacelera a progressão, mas não interfere nos mecanismos estruturais que destroem o parênquima renal. Essa distância entre controlar a doença e reparar o tecido é o que motiva a busca por estratégias regenerativas.

As terapias celulares surgem nesse espaço como possibilidade concreta, e a literatura veterinária já registra tentativas com células obtidas de medula óssea, tecido adiposo e tecidos perinatais. Entretanto, não há consenso sobre qual fonte celular reúne as melhores condições para essa aplicação específica, e os estudos disponíveis empregam procedimentos tão distintos entre si que seus resultados não se acumulam. Ao examinar essa literatura, chamou minha atenção uma fonte pouco explorada em medicina felina: as células-tronco mesenquimais derivadas da urina, obtidas por procedimento repetível e originadas do próprio trato urinário.

Este trabalho parte da constatação de que não existe, na literatura, proposta sistematizada que articule o racional biológico dessas células, a viabilidade de sua obtenção e o horizonte de sua aplicação clínica na espécie felina. Seu objetivo é analisar criticamente as evidências disponíveis e, a partir dessa análise comparativa, propor um protocolo laboratorial integrado que sirva de base a investigações experimentais futuras. As seções seguintes apresentam o problema de pesquisa, a justificativa da abordagem adotada e os objetivos que orientaram o desenvolvimento do estudo.

1.2. PROBLEMA DE PESQUISA

Apesar do avanço da terapia celular em nefrologia experimental, ainda não existe consenso sobre qual fonte de MSCs apresenta melhor relação entre viabilidade de obtenção, estabilidade fenotípica, potencial imunomodulador e coerência biológica para aplicação na doença renal crônica felina. A literatura disponível demonstra benefícios pontuais com células oriundas de fontes tradicionais, mas também evidencia heterogeneidade metodológica expressiva quanto à dose, à via de administração, ao preparo celular e aos critérios de desfecho. Tal cenário dificulta a extrapolação segura dos resultados e impede a consolidação de um protocolo clinicamente aplicável e racionalmente orientado ao paciente felino nefropata (Dos Santos; Ferreira; Krause, 2024).

Paralelamente, as USCs despontam como alternativa promissora, porém permanecem subexploradas no campo da medicina felina regenerativa. Embora estudos em medicina humana apontem facilidade de coleta, boa capacidade proliferativa, perfil mesenquimal e propriedades parácrinas relevantes, faltam propostas sistematizadas que articulem, de forma teórica e cientificamente fundamentada, as etapas de isolamento, caracterização e uso dessas células no contexto específico da doença renal crônica em gatos. Em especial, a hipótese de vantagem funcional decorrente de origem nefrourológica ainda carece de organização conceitual aplicada à realidade veterinária (Zhou *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2024).

O problema de pesquisa, assim delimitado, não reside apenas na ausência de uma terapia curativa para a doença renal crônica felina, mas na inexistência de um modelo teórico robusto que conecte lacuna clínica, racional biológico e factibilidade laboratorial em torno das USCs. Elaborar essa proposta torna-se relevante porque permite ordenar conhecimentos dispersos, identificar pressupostos testáveis e oferecer base para futuras validações experimentais e clínicas. A questão central, portanto, desloca-se do mero interesse por uma nova fonte celular para a análise de sua plausibilidade científica como estratégia de nefromodulação em felinos (Chen *et al.*, 2023; Kosanović *et al.*, 2023).

Nesse contexto, o trabalho busca responder, à luz da literatura científica recente, se as células-tronco mesenquimais derivadas da urina constituem uma fonte teoricamente mais adequada, viável e biologicamente racional do que as fontes tradicionais de células-tronco mesenquimais (MSCs) para o isolamento, a caracterização e a futura aplicação terapêutica na doença renal crônica felina.

1.3. JUSTIFICATIVA

A presente pesquisa justifica-se, em primeiro lugar, pela elevada relevância clínica da doença renal crônica felina e pela insuficiência das terapias atualmente disponíveis para modificar de maneira substancial sua história natural. Em medicina felina, a maior parte das intervenções é dirigida ao controle de complicações e à desaceleração da progressão, sem restaurar de forma efetiva a arquitetura funcional do rim. Isso torna pertinente o investimento em modelos conceituais que permitam identificar novas rotas terapêuticas, sobretudo aquelas compatíveis com o perfil geriátrico e frequentemente fragilizado dos pacientes acometidos (Voga *et al.*, 2020a; Dos Santos; Ferreira; Krause, 2024).

Justifica-se, também, a adoção de uma proposta teórica como estratégia científica. Em campos emergentes e de elevada complexidade para a aplicação clínica, a construção teórica constitui uma etapa metodologicamente necessária para integrar achados dispersos, definir categorias analíticas, delimitar variáveis críticas e explicitar hipóteses verificáveis. Mello *et al.* (2024) enfatizam que a heterogeneidade dos processos de fabricação, da identidade celular e da potência biológica constitui um dos principais entraves ao avanço de produtos baseados em MSCs; logo, organizar previamente o racional biológico e o encadeamento técnico de um protocolo torna-se uma medida cientificamente prudente e institucionalmente justificável.

Além disso, a escolha das USCs como foco do trabalho é relevante por alinhar inovação, bem-estar animal e viabilidade operacional. A coleta urinária reduz invasividade, pode ser repetida ao longo do tempo e potencialmente diminui barreiras éticas e clínicas à obtenção do material biológico, aspecto especialmente importante em gatos com doença sistêmica crônica. Bento *et al.* (2020) e Zhou *et al.* (2022) indicam que a urina oferece acesso simples a uma população celular com perfil compatível ao uso regenerativo, o que fortalece a pertinência de examiná-la como alternativa para a medicina veterinária regenerativa de precisão.

A justificativa institucional da pesquisa reside em sua capacidade de gerar um referencial acadêmico aplicável ao ensino, à iniciação científica e ao delineamento de estudos futuros em medicina veterinária regenerativa. Ao propor uma arquitetura teórica para o isolamento, a caracterização e a aplicação de USCs na doença renal crônica felina, o trabalho oferece base para protocolos experimentais subsequentes, fomenta a padronização conceitual e contribui para a consolidação de uma agenda de pesquisa com potencial de aplicação clínica. Assim, a proposta responde simultaneamente a uma demanda clínica concreta e a uma

necessidade universitária de produção científica estruturante (Zacharias *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2023).

2. OBJETIVOS

Esta seção apresenta os objetivos que norteiam o desenvolvimento da proposta científica. Organiza-se em objetivo geral, que delimita o propósito central da pesquisa, e objetivos específicos, que discriminam as etapas analíticas e descritivas necessárias para sua consecução.

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar criticamente se as evidências científicas atuais sustentam as células-tronco mesenquimais derivadas da urina (USCs) como fonte teoricamente mais adequada, viável e biologicamente coerente do que as fontes tradicionais (medula óssea, tecido adiposo e fontes perinatais) para o isolamento, a caracterização e a futura aplicação terapêutica na doença renal crônica felina, identificando quais parâmetros apresentam maior viabilidade de implementação e propondo um protocolo laboratorial integrado fundamentado na literatura contemporânea.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Levantar e selecionar, na literatura científica veterinária e humana, os estudos referentes às células-tronco mesenquimais derivadas da urina (USCs), à terapia celular aplicada à doença renal crônica e à fisiopatologia da doença renal crônica felina, conforme critérios de inclusão e exclusão previamente definidos;
- Analisar a evolução conceitual das células-tronco mesenquimais, com ênfase em seus mecanismos de ação baseados no secretoma e na modulação biológica;
- Descrever os critérios de identificação, caracterização e avaliação funcional das células-tronco mesenquimais (MSCs), considerando limitações metodológicas e variabilidade entre fontes;
- Comparar as principais fontes de obtenção de células-tronco mesenquimais (medula óssea, tecido adiposo e fontes perinatais), destacando suas vantagens, limitações e aplicabilidade na medicina veterinária;
- Discutir a hipótese de origem nefrourológica e memória epigenética das células-tronco mesenquimais derivadas da urina (USCs), relacionando-a à sua possível afinidade funcional com o tecido renal;

- Relacionar o perfil secretório das células-tronco mesenquimais derivadas da urina (USCs) aos principais mecanismos fisiopatológicos da doença renal crônica felina, incluindo inflamação, estresse oxidativo e fibrose;
- Confrontar os parâmetros metodológicos divergentes entre os protocolos descritos na literatura e propor, a partir dessa análise comparativa, um protocolo laboratorial integrado e um modelo conceitual que articulem racional biológico, viabilidade experimental e potencial aplicação clínica das células-tronco mesenquimais derivadas da urina (USCs) na nefrologia felina regenerativa.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este capítulo estabelece a base conceitual que sustenta a pesquisa, abordando a evolução do entendimento sobre as células-tronco mesenquimais, as particularidades biológicas das células derivadas da urina e a fisiopatologia da doença renal crônica felina, fundamentando assim a racionalidade da intervenção proposta.

3.1. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (MSCs)

As células-tronco mesenquimais derivam majoritariamente do mesoderma embrionário, folheto germinativo do qual se originam os tecidos conjuntivos, o sistema hematopoético, o sistema cardiovascular e os componentes do trato urogenital. Durante o desenvolvimento, populações mesenquimais migram e se distribuem por praticamente todos os tecidos vascularizados, onde permanecem na vida adulta associadas ao compartimento perivascular. Descreve-se ainda contribuição parcial da crista neural para populações mesenquimais de determinadas regiões, o que ajuda a explicar a heterogeneidade fenotípica observada entre células isoladas de sítios anatômicos distintos. Essa origem embrionária comum, associada à ampla distribuição tecidual, é o que sustenta tanto a possibilidade de obtenção dessas células a partir de fontes muito diversas quanto o reconhecimento de que tais fontes não são biologicamente equivalentes entre si.

As MSCs constituem uma categoria ampla de células estromais multipotentes, investigadas por sua capacidade de autorrenovação, expansão *ex vivo* e interação com tecidos lesionados. O interesse inicial concentrou-se na diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica; posteriormente, ganharam destaque suas propriedades imunomoduladoras, tróficas e citoprotetoras. Em doenças renais, essas funções podem contribuir para reduzir inflamação, apoptose, estresse oxidativo e fibrose, embora o desempenho dependa da origem celular, das condições de cultivo e do produto administrado (Chen *et al.*, 2023).

O conceito surgiu a partir da descrição de precursores estromais da medula óssea com capacidade clonogênica e diferenciação osteocondral. A identificação de populações semelhantes em tecido adiposo, cordão umbilical, placenta e outros tecidos ampliou as possibilidades de pesquisa, mas revelou diferenças importantes entre preparações classificadas sob a mesma denominação. A variabilidade relacionada à fonte, ao isolamento e ao estágio de cultura interfere na identidade, na consistência e na comparação entre estudos, exigindo critérios comuns de caracterização (Mello *et al.*, 2024).

Os parâmetros propostos pela *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) são empregados como referência operacional: adesão ao plástico em condições padronizadas, expressão de CD73, CD90 e CD105, ausência de marcadores hematopoéticos clássicos e capacidade de diferenciação trilinear. Esses critérios organizam a identificação inicial das MSCs, porém não demonstram equivalência funcional entre fontes ou lotes. Marcadores de superfície e morfologia precisam ser acompanhados por avaliações relacionadas ao mecanismo de ação esperado (Fonseca *et al.*, 2023). Essa distinção entre identidade e função sustenta as escolhas metodológicas descritas no Capítulo 5, particularmente quanto à caracterização imunofenotípica adaptada à espécie felina.

A heterogeneidade funcional torna-se evidente quando populações com imunofenótipo semelhante apresentam diferenças de proliferação, resistência ao estresse, resposta a estímulos inflamatórios e produção de mediadores. Condições de expansão, número de passagens, composição do meio e estratégias de pré condicionamento podem alterar essas propriedades. Sarsenova *et al.* (2022) mostram que a atividade imunomoduladora das MSCs é sensível ao ambiente de cultivo, o que impede tratá-las como produto biológico uniforme e reforça a necessidade de registrar e controlar todas as etapas de produção.

Além da caracterização fenotípica, produtos baseados em MSCs requerem testes de potência ajustados ao efeito biológico pretendido. Ensaio funcionais podem avaliar imunomodulação, proteção celular, atividade antifibrótica ou ação de vesículas extracelulares, conforme a proposta de uso. Garcia *et al.* (2024) defendem matrizes de avaliação coerentes com o mecanismo de ação esperado, medida necessária para reduzir resultados inconsistentes e permitir comparação entre preparações. Mebarki *et al.* (2021) evidenciam desafio equivalente em células de cordão umbilical, e o mesmo cuidado deve orientar o estudo de células derivadas da urina, situando-as dentro dessa categoria heterogênea antes de qualquer atribuição de superioridade.

3.1.1. Ontogenia, Nicho Perivascular e Mecanismos de Homeostase

A ontogenia das MSCs permanece tema de investigação contínua, mas a hipótese perivascular ganhou sustentação ao sugerir que muitas dessas células correspondem, ao menos em parte, a precursores associados a vasos sanguíneos. Essa interpretação ajuda a explicar sua ampla distribuição tecidual, já que a rede vascular permeia virtualmente todos os órgãos. Bento *et al.* (2020) observam que populações com fenótipo mesenquimal podem ser

isoladas de tecidos bastante distintos, o que se torna mais inteligível quando se assume vínculo estrutural com nichos vasculares e com células pericíticas ou adventíciais.

O nicho perivascular é relevante não apenas por razões de origem, mas por seu valor funcional. Células localizadas junto à microvasculatura encontram-se posicionadas para responder a sinais de dano, hipóxia, inflamação e alteração hemodinâmica. Em doença renal, a comunicação entre endotélio, pericitos, células imunes e epitélio tubular define parte importante da resposta ao insulto. A associação ontogenética das MSCs com esse nicho ajuda a compreender sua competência para modular angiogênese, permeabilidade vascular e recrutamento inflamatório (Chen *et al.*, 2023). No rim, essa relação assume peso adicional porque a integridade microvascular condiciona oferta de oxigênio, manutenção tubular e progressão fibrótica; Kresse *et al.* (2023) destacam que a eficácia de terapias celulares renais depende da interação entre células administradas e compartimentos vasculares e intersticiais do órgão.

Sob condições de homeostase, o nicho funciona como microambiente regulador de quiescência, sobrevivência e ativação contextual. Faria *et al.* (2023) demonstraram que o secretoma de MSCs pode restaurar homeostase bioenergética em células tubulares proximais após lesão isquêmica, indicando atuação coordenada sobre metabolismo, citoesqueleto, estresse oxidativo e recuperação fenotípica. Trata-se de regulação ambiental em tecidos sob estresse, e não apenas de produção de fatores anti-inflamatórios.

O deslocamento das MSCs do nicho original para a cultura *ex vivo* altera seu comportamento. Expansão, passagem seriada e condições de manufatura influenciam viabilidade, potência e estabilidade do produto celular, de modo que parte das funções dependentes do nicho pode atenuar-se durante o cultivo (Mello *et al.*, 2024). Esse dado justifica os critérios de passagem e monitoramento adotados na seção 5.8 e fundamenta o interesse por fontes celulares que conservem sinais regulatórios relacionados ao tecido de origem, hipótese retomada em 3.5.3 a propósito das USCs (Sun *et al.*, 2024).

3.1.2. O Paradigma do Secretoma e da Modulação Biológica

A interpretação dos efeitos terapêuticos das MSCs mudou quando estudos demonstraram que sua permanência no tecido lesionado costuma ser breve, embora as respostas biológicas persistam. Esse comportamento enfraqueceu a hipótese de que o benefício dependeria principalmente da diferenciação e da incorporação estrutural das células ao órgão receptor. Atualmente, as MSCs são compreendidas como plataformas de sinalização

capazes de modificar o microambiente por meio de mediadores secretados. Em doenças renais, essa atividade pode reduzir inflamação, apoptose, estresse oxidativo e fibrose, mesmo quando o enxerto celular é limitado (Chen *et al.*, 2023).

O secretoma corresponde ao conjunto de substâncias liberadas pelas células, incluindo proteínas solúveis, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, lipídios, ácidos nucleicos e vesículas extracelulares. Também podem ocorrer transferências de componentes intracelulares, como organelas, por mecanismos de comunicação direta. Esses elementos atuam de maneira combinada sobre células epiteliais, endoteliais, imunes e estromais. A diversidade do produto secretado explica por que as MSCs conseguem interferir simultaneamente em processos distintos e interdependentes, característica relevante em enfermidades crônicas que não respondem adequadamente a intervenções de alvo único.

Entre os componentes do secretoma, as vesículas extracelulares recebem atenção especial por transportarem proteínas, lipídios e RNAs regulatórios capazes de modificar o comportamento das células-alvo. Parte dos efeitos atribuídos às MSCs pode ser reproduzida por esses produtos, o que sustenta o desenvolvimento de terapias acelulares. Em modelos pré-clínicos de doença renal, vesículas derivadas de MSCs foram associadas à modulação de macrófagos, à proteção da microvasculatura, à redução de fibrose e ao suporte à recuperação tubular. A atividade do produto extracelular, contudo, permanece vinculada às características da célula que o produziu (Kosanović *et al.*, 2023).

A origem tecidual influencia diretamente a composição e a potência do secretoma. Análises proteômicas comparativas mostram diferenças entre produtos obtidos de placenta, geleia de Wharton, tecido adiposo e medula óssea, com repercussões sobre imunomodulação, angiogênese, proteção celular e remodelamento da matriz. A seleção de uma fonte de MSC implica, portanto, a escolha de um repertório biológico específico, que deve ser compatível com a fisiopatologia do órgão para o qual a intervenção é proposta (Shin *et al.*, 2021). Esse princípio é o que confere sentido à comparação entre fontes desenvolvida em 3.4 e à hipótese de organoespecificidade discutida em 3.5.

As condições de cultivo também modificam o produto secretado. Hipóxia, exposição controlada a citocinas, estímulos biomecânicos, composição do meio e número de passagens podem alterar a expressão de mediadores e a liberação de vesículas. Esse processo, denominado condicionamento, permite intensificar propriedades desejáveis, mas introduz novas exigências de controle. O secretoma não constitui produto fixo ou uniforme: sua utilização depende da descrição das condições de produção, de ensaios de potência e de

critérios que permitam reproduzir o perfil biológico entre lotes (Sarsenova *et al.*, 2022; Mello *et al.*, 2024).

A adoção desse paradigma redefine o planejamento das terapias baseadas em MSCs. Além da identificação imunofenotípica e da capacidade proliferativa, tornam-se necessários ensaios que verifiquem a potência do secretoma, a consistência entre lotes e a atividade sobre mecanismos relacionados à doença-alvo. A célula deixa de ser avaliada somente como unidade passível de enxertia e passa a ser examinada como fonte de sinais regulatórios. Este é o marco conceitual adotado em todo o trabalho, e as seções seguintes remetem a ele sem rerepresentar o mecanismo geral.

3.2. DOENÇA RENAL CRÔNICA FELINA (DRC Felina)

Para que qualquer terapia celular seja bem-sucedida, é indispensável compreender o microambiente hostil que caracteriza o rim lesionado. A seguir, são descritos os mecanismos fisiopatológicos centrais que perpetuam a progressão da enfermidade nos felinos e as limitações das abordagens terapêuticas atuais.

3.2.1. Fisiopatologia da DRC felina

A doença renal crônica felina corresponde a síndrome progressiva e irreversível caracterizada por perda persistente de néfrons, redução gradual da taxa de filtração glomerular e remodelamento estrutural do parênquima renal. Em gatos, a condição é particularmente frequente em indivíduos idosos e tende a ser diagnosticada tardiamente, quando parte importante da reserva funcional já foi comprometida. Embora sua etiologia primária nem sempre seja definida, o padrão histopatológico final converge para lesão túbulo-intersticial, inflamação crônica e fibrose, compondo fenótipo de progressão relativamente comum na espécie (Jepson, 2016).

A perda de néfrons viáveis induz mecanismos compensatórios nos remanescentes, sobretudo hiperfiltração e hipertrofia glomerular, que inicialmente preservam a depuração de solutos, mas a médio prazo aumentam a pressão intraglomerular e favorecem dano adicional. Esse processo agrava a proteinúria, intensifica alterações hemodinâmicas locais e amplia a sobrecarga tubular decorrente da reabsorção de proteínas filtradas. A resposta compensatória passa, assim, a atuar como vetor de perpetuação da injúria (Brown *et al.*, 2016).

Além do componente glomerular, a DRC felina apresenta importante envolvimento tubular e intersticial. A hipóxia relativa do tecido remanescente, a desorganização da microvasculatura peritubular e a ativação de vias pró-inflamatórias favorecem dano tubular persistente, apoptose celular e substituição do parênquima funcional por matriz extracelular. Essa reorganização compromete a arquitetura renal, reduz a capacidade de concentração urinária e aprofunda o desequilíbrio entre perfusão, metabolismo e excreção (Spencer; Wheeler-Jones; Elliott, 2020). Alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona, distúrbios minerais, hipertensão, estresse oxidativo e inflamação sustentada compõem uma rede patobiológica que explica tanto a progressão histológica quanto a deterioração funcional observada ao longo do tempo (Quimby, 2015).

3.2.2. Mecanismos de Progressão Clínica

Esta subseção estabelece a tríade fisiopatológica que fundamenta toda a proposta terapêutica do trabalho; as seções subsequentes remetem a ela sem reexpor os mecanismos aqui descritos.

Na DRC felina, a inflamação persistente constitui um dos principais mecanismos de manutenção e agravamento da lesão renal. A ativação contínua de células residentes e infiltrantes promove a liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores vasoativos que mantêm o parênquima em estado de reparação incompleta. Em vez de restabelecer a homeostase, esse ambiente favorece novo recrutamento celular, intensificação do dano tubular e amplificação de vias pró-fibróticas. Entre os mediadores envolvidos destacam-se TGF- β , TNF- α e IL-6, moléculas capazes de integrar diferentes etapas da progressão ao conectar inflamação, apoptose, remodelamento tecidual e fibrogênese. Em gatos com DRC, a predominância das alterações túbulo-intersticiais demonstra que a inflamação local sustentada não representa apenas consequência da lesão, mas componente ativo da deterioração histológica (Jepson, 2016; Brown *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo atua de forma integrada à inflamação. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, associado à redução das defesas antioxidantes, favorece peroxidação lipídica, dano mitocondrial, disfunção endotelial e amplificação da sinalização inflamatória. Nas células tubulares, essas alterações comprometem a produção energética, aumentam a suscetibilidade à apoptose e reduzem a capacidade de reparação; no endotélio, contribuem para disfunção vascular e perda da microcirculação peritubular. Inflamação e

estresse oxidativo formam, portanto, circuito de retroalimentação em que cada mecanismo intensifica o outro (Chen; Segev, 2024).

A fibrose renal constitui o principal desfecho estrutural dessa interação. A ativação de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblastos aumentam a produção de colágeno e de outros componentes da matriz extracelular, promovendo expansão intersticial, atrofia tubular e deformação da arquitetura renal. Paralelamente, a rarefação capilar reduz a oferta de oxigênio ao parênquima, agravando a hipóxia e estimulando novas respostas inflamatórias e fibróticas. A fibrose não corresponde a cicatriz passiva, mas a processo biologicamente ativo que sustenta a progressão da doença (Spencer; Wheeler-Jones; Elliott, 2020).

A progressão clínica decorre da continuidade desses mecanismos. A injúria inicial reduz a massa de néfrons funcionais, enquanto os remanescentes passam a operar sob maior sobrecarga hemodinâmica e metabólica. Embora essa adaptação preserve temporariamente a filtração glomerular, também aumenta o estresse sobre o tecido residual e favorece nova lesão, estabelecendo ciclo no qual redução da massa nefronal, hiperfunção compensatória e remodelamento patológico se reforçam mutuamente. Esse encadeamento ajuda a explicar por que alguns animais permanecem estáveis durante períodos prolongados enquanto outros deterioram rapidamente, mesmo compartilhando mecanismos semelhantes (Jepson, 2016).

Com o avanço da doença, tornam-se evidentes as alterações na capacidade de concentração urinária, no equilíbrio ácido-básico, na regulação hidroeletrólítica e na excreção de metabólitos nitrogenados. O aumento de creatinina, ureia e dimetilarginina simétrica (SDMA) constitui indicador clínico importante, mas geralmente ocorre quando parcela significativa da reserva funcional já foi perdida. A perda funcional produz ainda repercussões sistêmicas: hipertensão arterial, distúrbios minerais, perda de peso, anorexia, desidratação e anemia refletem tanto a falência excretora quanto as alterações endócrinas e metabólicas associadas. A DRC felina deve, por isso, ser compreendida como enfermidade progressiva de repercussão multissistêmica (Brown *et al.*, 2016; Magalhães *et al.*, 2023).

Esse encadeamento possui implicação terapêutica direta e define o alvo da proposta deste trabalho. Intervenções exclusivamente sintomáticas podem controlar complicações e desacelerar a evolução, mas não interrompem o circuito formado por inflamação, estresse oxidativo, hipóxia e fibrose. O interesse por estratégias imunomoduladoras, citoprotetoras e antifibróticas decorre da possibilidade de interferir nesse microambiente antes que a substituição do parênquima por tecido fibrótico se torne extensa. Quanto mais avançada a destruição arquitetural, menor a margem para resposta reparativa. O objetivo terapêutico plausível consiste, portanto, em reduzir a progressão da lesão, preservar os néfrons

remanescentes e prolongar a estabilidade funcional, sem pressupor regeneração completa do órgão cronicamente lesionado (Quimby; Dow, 2015).

3.2.3. Limitações das abordagens terapêuticas atuais

O tratamento atualmente empregado na DRC felina baseia-se em controle dietético, correção de distúrbios metabólicos, manejo de hipertensão, modulação de proteinúria, fluidoterapia conforme indicação e suporte clínico individualizado. Essas medidas são essenciais para prolongar a sobrevida e melhorar qualidade de vida, mas não modificam de forma decisiva os mecanismos estruturais responsáveis pela perda progressiva de néfrons descritos em 3.2.2. A prática clínica atual controla consequências e desacelera o curso, porém não oferece reparo renal significativo (Quimby, 2015).

Mesmo sob manejo adequado, persistem limitações relevantes. A adesão alimentar nem sempre é simples, a resposta ao tratamento varia amplamente entre pacientes e algumas intervenções perdem eficácia à medida que a doença avança. Muitos gatos são diagnosticados em fases tardias, o que restringe a janela de maior benefício clínico. Boa parte das terapias disponíveis concentra-se em reduzir fatores agravantes, como hiperfosfatemia, hipertensão e proteinúria, sem atingir diretamente o núcleo biológico da fibrose intersticial e da inflamação renal persistente, o que explica por que muitos pacientes continuam apresentando declínio funcional progressivo mesmo sob tratamento (Magalhães *et al.*, 2023; Spencer; Wheeler-Jones; Elliott, 2020).

Nesse cenário, terapias celulares passaram a ser discutidas como alternativas complementares. O interesse não decorre de fracasso absoluto da terapêutica convencional, mas do reconhecimento de um hiato real entre controle clínico e restauração tecidual (Quimby; Dow, 2015).

3.3. TERAPIAS CELULARES NA REGENERAÇÃO RENAL

As abordagens baseadas em células-tronco oferecem novas rotas para a interrupção do ciclo de progressão da doença renal. Esta seção examina como a sinalização parácrina atua na modulação tecidual e consolida as evidências clínicas já documentadas na medicina veterinária.

3.3.1. *Mecanismos de ação das MSCs no tecido renal*

Após a administração sistêmica, a biodistribuição das MSCs e das USCs constitui o primeiro determinante de sua eficácia terapêutica. A infusão intravenosa resulta em retenção inicial predominante na circulação pulmonar (*first-pass* pulmonar), onde mais de 80% das células permanecem temporariamente aprisionadas em razão de seu diâmetro e da arquitetura dos capilares pulmonares. Apenas pequena fração alcança a circulação sistêmica e o tecido renal, estimando-se que o *homing* espontâneo para o rim corresponda a menos de 5% das células administradas. Vias intra-arteriais ou aplicações locais podem elevar esse recrutamento para aproximadamente 15% a 20%, embora apresentem maior complexidade técnica, riscos adicionais e careçam de padronização quanto à dose e à segurança. Mesmo as células que atingem o rim permanecem viáveis no parênquima por período curto, geralmente entre três e cinco dias, o que confirma que os efeitos biológicos dependem da sinalização parácrina e não da enxertia permanente (Yu *et al.*, 2026).

O recrutamento celular para o rim lesionado ocorre principalmente em resposta aos gradientes locais de quimiocinas produzidos durante a inflamação. O eixo SDF-1/CXCR4 participa da migração direcionada das MSCs, enquanto integrinas como $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ promovem adesão ao endotélio vascular e ativação da via FAK/PI3K/Akt, favorecendo a sobrevivência celular e a permanência transitória no microambiente renal inflamado. Ainda que apenas pequena quantidade de células atinja o tecido-alvo, essa população é suficiente para iniciar comunicação parácrina intensa com as células residentes (Yu *et al.*, 2026).

Uma vez expostas ao ambiente inflamatório descrito em 3.2.2, as MSCs liberam amplo conjunto de citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e vesículas extracelulares. Entre os principais mediadores encontram-se HGF, VEGF, IGF-1, IL-10, prostaglandina E_2 (PGE₂), TSG-6 e diversos microRNAs transportados por vesículas. Esses componentes atuam simultaneamente sobre células tubulares, endotélio, fibroblastos e células imunológicas, modificando o microambiente renal e reduzindo os estímulos responsáveis pela progressão da doença.

No epitélio tubular, o HGF representa um dos principais mediadores renoprotetores. Após ligação ao receptor c-Met das células tubulares proximais, ocorre ativação das vias PI3K/Akt e ERK, reduzindo apoptose, estimulando proliferação e favorecendo a recuperação do epitélio lesionado. O IGF-1 contribui para a manutenção da viabilidade celular, e o VEGF auxilia na preservação do metabolismo tubular ao melhorar a perfusão da microcirculação

peritubular. Preservam-se, assim, néfrons ainda viáveis, reduzindo a velocidade de progressão da insuficiência renal.

Outro eixo relevante envolve a proteção da microvasculatura. O VEGF secretado atua sobre células endoteliais dos capilares peritubulares, estimulando angiogênese, preservando a densidade vascular e reduzindo a hipóxia crônica. A manutenção dessa rede capilar diminui o estresse metabólico das células tubulares e cria condições mais favoráveis ao reparo. Simultaneamente, o secretoma interfere na via TGF- β /Smad, reduzindo a ativação de miofibroblastos α -SMA positivos e limitando a deposição de colágeno intersticial (Yu *et al.*, 2026).

A esse conjunto de mecanismos soma-se a via da proteína Klotho, detalhada em 3.5.3, que particulariza a ação das USCs: além da secreção própria demonstrada por Kim *et al.* (2022), admite-se que o secretoma preserve ou estimule a expressão endógena de Klotho nas células renais residentes, atenuando as vias NF- κ B e TGF- β .

A correspondência entre o repertório secretório das USCs e os mecanismos fisiopatológicos da doença renal crônica felina pode ser estabelecida ponto a ponto. À inflamação persistente, sustentada por TGF- β , TNF- α e IL-6, correspondem a IL-10, a PGE₂ e o TSG-6, que reduzem a produção de mediadores pró-inflamatórios e favorecem a polarização de macrófagos do fenótipo M1 para o M2. Ao estresse oxidativo e à apoptose tubular corresponde o HGF, que, ao ativar as vias PI3K/Akt e ERK por meio do receptor c-Met, reduz a morte celular programada e favorece a recuperação do epitélio. À rarefação capilar e à hipóxia intersticial corresponde o VEGF, que preserva a densidade da microvasculatura peritubular. E à fibrose intersticial, desfecho estrutural do circuito, corresponde a interferência na via TGF- β /Smad, associada à ação da proteína Klotho, que limita a ativação de miofibroblastos e a deposição de colágeno. Cada eixo da progressão da doença encontra, portanto, um componente correspondente no perfil secretório proposto, e é essa correspondência ponto a ponto, e não a potência isolada de qualquer mediador, que sustenta a plausibilidade da intervenção em uma enfermidade mantida por mecanismos interdependentes.

3.3.2. Efeito parácrino e modulação imunológica

Além da proteção direta sobre células tubulares e endoteliais, o secretoma das MSCs promove modulação da resposta imune renal. Citocinas como IL-10, PGE₂ e TSG-6 reduzem

a produção de TNF- α , IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias, favorecendo a polarização dos macrófagos do fenótipo inflamatório M1 para o fenótipo reparador M2. Essa mudança reduz a manutenção do ambiente inflamatório crônico, diminui a ativação persistente de fibroblastos e favorece processos fisiológicos de reparo (Yu *et al.*, 2026).

As vesículas extracelulares representam um dos principais efetores desse mecanismo. Após internalização por células tubulares, endoteliais, fibroblastos e células imunológicas, liberam proteínas, RNAs mensageiros e microRNAs capazes de modular diretamente a expressão gênica das células-alvo. MicroRNAs como miR-21, miR-30, miR-146a e membros da família let-7 regulam genes relacionados à inflamação, apoptose, estresse oxidativo e fibrose, reduzindo a expressão de mediadores pró-fibróticos e favorecendo a sobrevivência celular. Reproduzem, assim, parte importante da atividade biológica das MSCs, o que fundamenta a perspectiva de terapias acelulares mais padronizadas. A evidência específica desse mecanismo em USCs foi apresentada em 3.5.4.

Em conjunto, esses mecanismos estabelecem sequência fisiopatológica coerente: após a administração, pequena fração das células alcança o rim lesionado por *homing* mediado por quimiocinas; em seguida, ocorre liberação de fatores parácrinos e vesículas que atuam simultaneamente sobre células tubulares, endotélio, fibroblastos e células imunológicas; como consequência, reduzem-se apoptose, inflamação, hipóxia e fibrose, preservando a função dos néfrons remanescentes. Na DRC felina, espera-se que esses efeitos não promovam regeneração completa do parênquima, mas retardem a progressão, preservem a função residual e contribuam para maior estabilidade clínica.

3.3.3. *Evidências experimentais e clínicas em modelos renais*

A base experimental para o uso de MSCs em doença renal é ampla em modelos murinos e suínos, abrangendo isquemia-reperfusão, nefropatia diabética, doença renovascular e fibrose crônica, com relatos de redução de inflamação, melhora de biomarcadores funcionais e menor deposição de matriz extracelular. A magnitude do efeito varia conforme fonte celular, dose, via de aplicação e momento da intervenção, heterogeneidade que exige cautela interpretativa sem invalidar o racional biológico acumulado (Chen *et al.*, 2023; Peired; Sisti; Romagnani, 2016; Yu *et al.*, 2026).

Na medicina veterinária, o número de estudos permanece reduzido, porém as evidências clínicas mais recentes reforçam o potencial terapêutico das MSCs em felinos com DRC. Song *et al.* (2025) descreveram gato da raça Ragdoll, com dez anos de idade e doença

renal crônica em estágio IV da classificação IRIS, sem resposta após quatro meses de tratamento convencional. O animal recebeu três infusões intravenosas semanais de MSCs alogênicas derivadas de tecido adiposo (2×10^6 células/kg), apresentando, três semanas após a última aplicação, redução da creatinina sérica para valores compatíveis com o estágio II da DRC, além de melhora da ureia e do fósforo séricos, sem eventos adversos. Embora se trate de caso único, incapaz de estabelecer eficácia definitiva, o resultado reforça a segurança do procedimento e sugere que terapias celulares podem produzir benefícios clínicos relevantes mesmo em estágios avançados (Song *et al.*, 2025). O desafio atual consiste menos em demonstrar a viabilidade biológica da terapia celular, já amplamente sustentada, e mais em definir protocolos padronizados de caracterização, dose, frequência, via de aplicação e critérios objetivos de acompanhamento, condição para estabelecer sua real eficácia em gatos (Dos Santos; Ferreira; Krause, 2024; Yu *et al.*, 2026).

3.4. FONTES DE OBTENÇÃO E LIMITAÇÕES CLÍNICAS

A escolha da fonte celular representa uma etapa crítica no delineamento de intervenções regenerativas. Esta seção analisa as características biológicas e operacionais das principais fontes de obtenção empregadas atualmente, destacando as barreiras que limitam sua aplicabilidade rotineira na clínica felina.

3.4.1. Medula Óssea e Tecido Adiposo

A medula óssea ocupa posição histórica na pesquisa com MSCs, pois contribuiu para a definição inicial de populações clonogênicas e para o desenvolvimento de métodos de isolamento e expansão. Apesar desse papel, seus resultados em doenças renais variam conforme espécie, dose, momento de aplicação e condições de processamento, o que impede considerá-la fonte universalmente superior. A coleta exige procedimento invasivo, frequentemente associado à sedação ou anestesia, aspecto relevante em gatos idosos e clinicamente fragilizados pela doença renal crônica (Chen *et al.*, 2023; Voga *et al.*, 2020a). Idade e estado sistêmico do doador podem ainda afetar rendimento, capacidade proliferativa e atividade biológica das células medulares, aumentando a variabilidade entre preparações em abordagens autólogas destinadas a pacientes geriátricos (Mello *et al.*, 2024).

O tecido adiposo oferece maior disponibilidade celular e costuma apresentar rendimento inicial superior ao da medula óssea. Em MSCs felinas derivadas dessa fonte, o

uso de fator de crescimento de fibroblastos básico foi associado ao aumento da proliferação e da expressão de fator de crescimento de hepatócitos, mediador relacionado à proteção renal e à reparação tecidual. Tais características contribuíram para a incorporação do tecido adiposo em estudos veterinários e facilitaram sua utilização em protocolos que exigem expansão celular (Fujimoto *et al.*, 2020), fundamentando também a suplementação adotada em 5.7.

A obtenção do tecido adiposo, contudo, ainda depende de intervenção cirúrgica, e a qualidade das células pode variar conforme condição corporal, idade, inflamação sistêmica e local de coleta. Conforme o princípio estabelecido em 3.1.2, existem diferenças funcionais entre MSCs adiposas e células de outras fontes, inclusive quanto à composição dos produtos secretados. Rendimento elevado e facilidade de expansão não asseguram, isoladamente, maior adequação ao tecido renal (Shin *et al.*, 2021; Almeria *et al.*, 2022). Ambas as fontes permanecem comparadores relevantes por reunirem ampla experiência experimental e dados acumulados sobre segurança, e estudos com MSCs adiposas e uterinas em felinos indicam possibilidade de benefícios renais (Zacharias *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022).

3.4.2. Fontes Neonatais e Perinatais

Cordão umbilical, geleia de Wharton, placenta, líquido amniótico e membranas fetais constituem fontes neonatais e perinatais de MSCs com elevada capacidade proliferativa e menor exposição ao envelhecimento celular. Esses tecidos podem ser obtidos a partir de materiais descartados após o parto, reduzindo a necessidade de intervenção no doador. MSCs provenientes do cordão umbilical apresentam atividade anti-inflamatória e imunorregulatória relevante, o que favoreceu sua investigação como base para produtos celulares padronizados (Mebarki *et al.*, 2021). Em comparação com fontes adultas, tendem a apresentar maior imaturidade biológica, expansão eficiente e menor suscetibilidade à senescência precoce (Shin *et al.*, 2021).

Na medicina veterinária, o aproveitamento de anexos fetais pode reduzir o impacto da coleta e facilitar a formação de bancos celulares. Essa possibilidade depende, entretanto, de partos disponíveis, triagem sanitária, processamento rápido, criopreservação e infraestrutura laboratorial. A transformação desses tecidos em produtos reprodutíveis requer controle de identidade, estabilidade e potência, condições que nem sempre estão presentes na rotina de serviços veterinários (Voga *et al.*, 2020a; Mello *et al.*, 2024).

Estudos pré-clínicos com células perinatais e seus derivados descrevem proteção tubular, preservação da microvasculatura e redução de processos inflamatórios e oxidativos,

embora grande parte dessas evidências tenha sido produzida em modelos humanos ou roedores (Birtwistle *et al.*, 2021; Kosanović *et al.*, 2023). Nenhuma das fontes discutidas até aqui reúne, de forma simultânea, disponibilidade contínua, coleta individual repetível e relação direta com o sistema urinário, o que estabelece o problema tratado na subseção seguinte.

3.4.3. *Limitações das fontes convencionais na DRC*

O uso de MSCs na doença renal crônica encontra limites que começam na escolha da fonte celular. Medula óssea, tecido adiposo e tecidos perinatais apresentam histórico experimental relevante, porém diferem quanto à forma de obtenção, capacidade proliferativa, composição do secretoma e resposta ao microambiente inflamatório. Essa heterogeneidade repercute na manufatura do produto, dificulta a comparação entre estudos e impede que resultados obtidos com uma origem tecidual sejam transferidos automaticamente para outra (Peired; Sisti; Romagnani, 2016; Mello *et al.*, 2024).

A obtenção de medula óssea ou tecido adiposo pode exigir sedação, anestesia ou intervenção cirúrgica. Esse aspecto assume maior importância em gatos com doença renal crônica, frequentemente idosos, desidratados, hipertensos, sarcopênicos ou portadores de alterações metabólicas concomitantes. Nessas condições, uma coleta invasiva pode elevar o risco clínico, ampliar custos e reduzir a aceitação da terapia por tutores e médicos-veterinários (Quimby; Borjesson, 2018; Voga *et al.*, 2020a). Sobrepe-se a isso a dificuldade de coletas seriadas: a repetição de aspirados de medula ou de procedimentos para obtenção de tecido adiposo é pouco adequada quando se pretende realizar novo isolamento, acompanhar estabilidade fenotípica ou produzir material adicional após baixo rendimento inicial, o que reduz a flexibilidade de abordagens autólogas e o acompanhamento longitudinal (Sun *et al.*, 2024).

A origem tecidual influencia ainda a adequação biológica da terapia ao rim. MSCs adiposas, medulares ou perinatais podem produzir efeitos imunomoduladores e renoprotetores, mas não apresentam relação anatômica direta com o sistema urinário. Como o tecido de origem interfere no perfil secretório e na resposta a estímulos inflamatórios (3.1.2), a ausência de especificidade renal representa limitação relevante: é preciso verificar se o repertório de fatores liberados é compatível com as necessidades do epitélio tubular, da microvasculatura e do interstício renal lesionado (Almeria *et al.*, 2022; Kresse *et al.*, 2023).

A condição clínica do doador constitui variável a considerar em abordagens autólogas, embora seu efeito permaneça controverso na literatura felina, questão retomada em 3.5.5 (Creamer *et al.*, 2022; Zajic *et al.*, 2017). Limitação equivalente alcança os produtos derivados: vesículas extracelulares variam conforme origem, condições de cultura, número de passagens e métodos de isolamento, o que interfere na definição de dose e na reprodutibilidade (Almeria *et al.*, 2022).

Diante desse conjunto de obstáculos, a busca por fontes menos invasivas e mais próximas do trato urinário responde a uma necessidade clínica e metodológica simultânea. As células-tronco derivadas da urina podem ser obtidas por coleta simples, repetida e de baixo impacto, e sua possível afinidade biológica com o sistema nefrourológico oferece fundamento para investigar um secretoma mais ajustado ao tecido renal. Essa alternativa deve ser avaliada de forma comparativa, sem pressupor superioridade antes da confirmação experimental (Bento *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2024).

3.5. USCs NA REGENERAÇÃO RENAL

Diante das limitações apresentadas pelas fontes convencionais, as USCs emergem como uma alternativa biológica estruturalmente pertinente. Os tópicos a seguir detalham seu perfil celular, o raciocínio por trás de sua afinidade com o tecido renal e os desafios de sua translação para a espécie felina.

3.5.1. Identificação e perfil biológico

As células-tronco mesenquimais derivadas da urina, denominadas USCs, constituem populações clonogênicas obtidas de amostras urinárias espontâneas. Em cultura, apresentam morfologia fibroblastoide, adesão ao plástico, expressão de marcadores mesenquimais e ausência de marcadores hematopoéticos clássicos, além de capacidade de expansão e diferenciação sob condições específicas. A urina, antes tratada apenas como material de excreção, passou a ser reconhecida como fonte acessível de células com interesse regenerativo. A composição das amostras, contudo, pode variar entre indivíduos e conforme o estado clínico, tornando indispensáveis a seleção clonal, a caracterização imunofenotípica e a avaliação funcional de cada preparação (Bento *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022).

O interesse pelas USCs não se limita à sua classificação como células mesenquimais. Estudos descrevem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e

pró-regenerativas, relacionadas principalmente à liberação de mediadores solúveis e vesículas extracelulares. Esse perfil é pertinente à doença renal crônica, cuja fisiopatologia é detalhada em 3.2. A possível atuação simultânea sobre múltiplos processos diferencia as USCs de abordagens voltadas a um único mecanismo. Ainda assim, os achados disponíveis derivam majoritariamente de estudos humanos, modelos experimentais e ensaios *in vitro*, o que exige prudência ao transportar tais resultados para a nefrologia felina (Sun *et al.*, 2024; Chen *et al.*, 2023).

3.5.2. Coleta e Desempenho Proliferativo

A obtenção das USCs ocorre por coleta urinária, sem retirada cirúrgica de tecido ou punção de medula óssea. Essa característica reduz desconforto, necessidade de anestesia e risco de morbidade, respondendo diretamente às limitações das fontes convencionais expostas em 3.4.3. A coleta pode ser repetida quando o rendimento inicial é insuficiente, quando se pretende selecionar clones ou quando o protocolo exige acompanhamento longitudinal, o que também permite avaliar a estabilidade das células ao longo do tempo. O baixo impacto do procedimento favorece estudos veterinários, mas não elimina cuidados pré-analíticos, pois volume urinário, hidratação, contaminação, intervalo até o processamento e condição clínica do doador podem interferir no isolamento (Bento *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2024). Esses condicionantes orientam o protocolo de coleta e triagem descrito em 5.3 e 5.5.

Depois do isolamento, as USCs costumam apresentar boa capacidade proliferativa e manutenção do crescimento durante sucessivas passagens, permitindo obter material para caracterização, criopreservação, ensaios funcionais e produção de componentes secretados. Na medicina veterinária, a combinação entre acesso simples à amostra e expansão satisfatória pode facilitar a criação de bancos celulares e o desenvolvimento de protocolos personalizados. Entretanto, a eficiência de cultivo não é uniforme, e diferenças entre laboratórios podem alterar o tempo de duplicação, a formação de colônias e a potência biológica, razão pela qual os resultados devem ser comparados a partir de métodos claramente descritos e critérios de qualidade harmonizados (Zhou *et al.*, 2022; Mello *et al.*, 2024).

3.5.3. Memória epigenética e Proteína Klotho

Parte das USCs parece originar-se de compartimentos do trato urinário e do rim, embora a contribuição relativa de cada população celular ainda permaneça em investigação.

Essa proximidade anatômica sustenta a hipótese de que essas células preservem características moleculares relacionadas ao tecido de origem, incluindo padrões de expressão gênica, repertórios secretórios e respostas ao microambiente lesado. Esse conceito, denominado memória epigenética, fornece base teórica para a proposição de que a origem celular influencie o desempenho biológico em diferentes tecidos, especialmente no sistema nefrourológico (Bento *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2024).

Desse racional deriva a expressão “rim trata rim”, segundo a qual células provenientes do trato urinário apresentariam maior afinidade funcional com o parênquima renal. Essa proposição deve ser compreendida como hipótese biológica plausível, e não como evidência de superioridade terapêutica. Sua confirmação depende de comparações experimentais entre diferentes fontes de MSCs, envolvendo análises transcriptômicas, proteômicas, caracterização do secretoma e ensaios funcionais em modelos renais (Sun *et al.*, 2024).

A proteína Klotho constitui o elo molecular mais concreto desse racional. Trata-se de proteína predominantemente expressa no rim, com papel central na homeostase do órgão: participa da proteção tubular, da modulação do estresse oxidativo, da regulação da fibrose e do controle da resposta inflamatória, e sua redução acompanha a progressão de diferentes nefropatias. A relevância dessa via para as USCs deixou de ser apenas conjectural a partir da demonstração experimental de Kim *et al.* (2022), que verificaram que as USCs expressam α -Klotho em níveis superiores aos de MSCs de outras origens e que essa proteína participa funcionalmente de sua ação antifibrótica. Utilizando modelo de fibrose em células tubulares renais humanas (HK-2), os autores demonstraram que o silenciamento da expressão de Klotho por siRNA reduziu significativamente a capacidade das USCs de inibir a sinalização por TGF- β , evidenciando que o Klotho secretado por essas células é componente ativo do mecanismo renoprotetor, e não apenas marcador associado à origem tecidual.

Esse achado é particularmente relevante para a doença renal crônica felina porque conecta a hipótese da memória epigenética a um mecanismo verificável: se a origem nefrourológica das USCs se traduz em maior expressão de uma proteína cuja perda é central na progressão da nefropatia, a organoespecificidade deixa de ser argumento anatômico e passa a ter sustentação molecular. Permanece necessário, entretanto, confirmar esse comportamento em USCs de origem felina, uma vez que a evidência disponível provém de células humanas. Essa verificação integra os ensaios propostos em 5.14.

3.5.4. *Secretoma e vesículas extracelulares das USCs*

Conforme o paradigma estabelecido em 3.1.2, os efeitos atribuídos às USCs dependem majoritariamente da sinalização parácrina. O que particulariza essas células é a composição do repertório liberado e sua possível adequação ao tecido renal. Revisão recente de Atay, Boysen e Nørregaard (2026) consolida o entendimento atual sobre o emprego das USCs na nefrologia regenerativa, reforçando que seus efeitos terapêuticos decorrem predominantemente da atividade parácrina e da produção de vesículas extracelulares, mais do que da integração permanente das células ao tecido renal. Os autores destacam avanços recentes no desenvolvimento de biomateriais e sistemas de entrega capazes de aumentar a retenção local e potencializar a ação do secretoma, mas registram desafios persistentes relacionados à biodistribuição, à integração funcional no tecido-alvo, à padronização dos produtos derivados e à variabilidade biológica entre doadores (Atay; Boysen; Nørregaard, 2026).

A evidência experimental mais direta desse mecanismo em USCs provém de Jiang *et al.* (2016), que demonstraram que exossomos derivados de USCs humanas reduziram apoptose tubular e podocitária, preservaram fatores renoprotetores, atenuaram alterações estruturais do parênquima e retardaram o desenvolvimento de complicações renais em ratos com diabetes tipo 1. O resultado sustenta que a atividade renoprotetora dessas células decorre predominantemente do secretoma, e não da substituição de células renais lesionadas.

As vesículas extracelulares derivadas de USCs transportam proteínas, lipídios e RNAs regulatórios incorporados pelas células-alvo, com atividade imunomoduladora, influência sobre a polarização de macrófagos e redução de sinais associados à lesão. Esses resultados ampliam o interesse por terapias acelulares, que podem reduzir problemas de biodistribuição e variabilidade do enxerto, embora introduzam exigências próprias de produção e controle. O termo exossomo deve ser empregado apenas quando a caracterização comprovar essa subclasse; nos demais casos, vesículas extracelulares é a denominação tecnicamente adequada (Zidan *et al.*, 2021; Dong *et al.*, 2024). Essa distinção orienta os procedimentos descritos em 5.14.

Não basta, portanto, demonstrar que as USCs liberam vesículas: é necessário definir tamanho, concentração, marcadores, conteúdo proteico e atividade em ensaios renais. A comparação com células de tecido adiposo, medula óssea e fontes perinatais deve considerar essas variáveis, pois cada origem produz repertório distinto. Ensaios em células tubulares, endoteliais e modelos de fibrose podem revelar se a memória renal das USCs corresponde a

vantagem funcional mensurável. Sem essa verificação, a organoespecificidade permanece hipótese promissora, ainda que agora amparada pela evidência molecular relativa ao Klotho (Shin *et al.*, 2021; Almeria *et al.*, 2022).

3.5.5. Vantagens para o uso veterinário, lacunas e desafios

Na prática veterinária, as principais vantagens das USCs são a coleta pouco traumática, a possibilidade de repetição e a expansão em cultura, discutidas em 3.5.2. Soma-se a possibilidade de uso autólogo, cuja viabilidade depende de questão ainda sem resposta consolidada: se a condição do doador compromete as células obtidas. As evidências divergem. Em felinos, MSCs adiposas de gatos com DRC não diferiram das de hígidos quanto à expressão gênica imunomoduladora (Creamer *et al.*, 2022), mas em gatos geriátricos portadores de comorbidades, incluindo DRC e neoplasia, a expansão inicial foi mais lenta, ainda que a capacidade imunomoduladora se mantivesse preservada após a expansão (Zajic *et al.*, 2017). Em USCs caninas, células de animais com DRC proliferaram mais do que as de animais hígidos (tempo de duplicação de 1,70 contra 2,04 dias; $p = 0,0219$), com expressão de Klotho preservada em ambos os grupos, resultado que levou os próprios autores a apontar potencial para uso autólogo, ainda que o isolamento tenha sido bem-sucedido em apenas três dos onze animais doentes avaliados (Lange-Consiglio *et al.*, 2025). Nenhum estudo reúne simultaneamente espécie felina e fonte urinária, de modo que a extrapolação direta não é possível. A escolha entre produto autólogo e alogênico constitui, portanto, questão em aberto, a ser resolvida por investigação experimental específica. A viabilidade clínica dependerá da comparação entre produtos autólogos, bancos alogênicos e preparações acelulares previamente padronizadas (Burdeyron *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2022).

A aplicação em gatos com doença renal crônica enfrenta uma lacuna central: são escassos os estudos que isolam, caracterizam e testam USCs felinas em condições controladas, e a maior parte das evidências procede de células humanas ou de modelos não felinos. Antes de propor eficácia terapêutica, será necessário estabelecer protocolos de coleta, processamento, cultivo, criopreservação e controle microbiológico adequados à espécie, além de critérios de identidade, pureza, estabilidade cromossômica e potência. A heterogeneidade das amostras urinárias reforça a necessidade de documentação rigorosa, especialmente na comparação entre animais, estágios da doença ou centros de pesquisa (Bento *et al.*, 2020; Rota *et al.*, 2018). É precisamente essa lacuna que o protocolo proposto no Capítulo 5 pretende endereçar.

Outra etapa indispensável consiste em determinar dose, via de administração, frequência, biodistribuição e segurança em curto e longo prazo. O possível benefício precisa ser confrontado com fontes mesenquimais já estudadas em felinos e com os tratamentos convencionais. A eventual superioridade das USCs dependerá de evidência comparativa, e não apenas da proximidade com o trato urinário (Kresse *et al.*, 2023; Kosanović *et al.*, 2023).

4. METODOLOGIA

Esta seção descreve os procedimentos adotados para o levantamento, a seleção, a organização e a análise da literatura científica utilizada no desenvolvimento da proposta. Apresenta a natureza e delineamento do estudo, as estratégias de busca e as fontes consultadas, os critérios de inclusão e exclusão e os procedimentos empregados para a organização e interpretação das evidências selecionadas.

4.1. NATUREZA E DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este trabalho caracteriza-se como estudo teórico, de natureza qualitativa e analítico-integrativa, desenvolvido a partir da literatura científica contemporânea sobre doença renal crônica felina, terapias celulares aplicadas ao tecido renal e células-tronco mesenquimais derivadas da urina. Não houve execução laboratorial, coleta de material biológico nem experimentação animal, razão pela qual o estudo não demandou submissão a comitê de ética em uso de animais.

A opção pelo desenho teórico não reduz a complexidade da investigação. Ao contrário, exige leitura comparativa, seleção crítica de evidências, confronto entre resultados heterogêneos e síntese argumentativa coerente. O eixo central do método consistiu em transformar dados dispersos da literatura em proposta integrada, capaz de articular fisiopatologia, mecanismos celulares, lógica de aplicação e limites de translacionalidade. A pergunta norteadora que orientou todas as etapas é aquela formulada na seção 1.2.

4.2. ESTRATÉGIA DE BUSCA E FONTES CONSULTADAS

A busca bibliográfica foi conduzida nas bases PubMed, ScienceDirect, SciELO, Wiley Online Library, Web of Science, Portal de Periódicos CAPES, SpringerLink, MDPI e Google Acadêmico, contemplando publicações das áreas de medicina veterinária e medicina humana, com prioridade para trabalhos publicados a partir de 2015.

Os descritores foram combinados em inglês e português, associados por operadores booleanos *AND* e *OR*, contemplando os termos *feline chronic kidney disease*, *mesenchymal stem cells*, *urine-derived stem cells*, *renal regeneration*, *fibrosis*, *immunomodulation*, *secretome*, *exosomes* e *Klotho*, bem como seus equivalentes em português.

Foram considerados artigos originais, revisões narrativas, revisões sistemáticas, meta-análises, estudos pré-clínicos, ensaios clínicos e trabalhos de natureza metodológica.

Essa amplitude mostrou-se necessária porque o tema apresenta escassez de dados felino-específicos, o que exige integração translacional de diferentes níveis de evidência. Ao final do processo de seleção, o corpus analítico reuniu 69 estudos científicos, contemplando artigos originais, revisões narrativas e sistemáticas, estudos pré-clínicos e ensaios clínicos, aos quais se somaram 12 documentos normativos e diretrizes internacionais que orientaram a definição de critérios técnicos, éticos e regulatórios adotados na proposta, totalizando 81 referências.

4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos estudos publicados entre 2015 e 2026 que abordassem ao menos um dos seguintes eixos: fisiopatologia da doença renal crônica felina; inflamação, estresse oxidativo ou fibrose renal; emprego de células-tronco mesenquimais em doença renal; propriedades biológicas das USCs; secretoma, vesículas extracelulares ou proteína Klotho; e aplicações translacionais em medicina regenerativa. Trabalhos anteriores a 2015 foram considerados de forma pontual, quando necessários à contextualização histórica ou por constituírem referência metodológica de base.

Foram excluídos estudos sem relação direta com o sistema urinário ou com o tecido renal, trabalhos exclusivamente descritivos sem contribuição argumentativa para a pergunta norteadora, publicações duplicadas e textos sem identificação bibliográfica confiável.

Nas situações de conflito ou heterogeneidade entre estudos, optou-se por manter a divergência explicitada no texto, em vez de forçar sínteses artificiais. Essa decisão metodológica é o que viabilizou, nas etapas seguintes, o tratamento comparativo dos parâmetros sobre os quais os autores não convergem.

4.4. EXTRAÇÃO, ORGANIZAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS

Após a seleção, os estudos foram organizados em matriz temática contemplando autoria, ano, delineamento, espécie, fonte celular, mecanismo investigado, principais resultados, limitações reconhecidas pelos autores e potencial de aproveitamento para a proposta. Essa etapa converteu a leitura em banco analítico de argumentos e reduziu a dispersão bibliográfica.

Os dados foram então agrupados em cinco eixos interpretativos: fisiopatologia da doença renal crônica felina; limites das abordagens terapêuticas atuais; mecanismos

renoprotetores das células-tronco mesenquimais; especificidades biológicas das USCs; e viabilidade translacional da proposta. Em vez de resumir cada estudo isoladamente, buscou-se identificar convergências, lacunas recorrentes e linhas de raciocínio compatíveis com a pergunta central do trabalho.

A análise adotou caráter comparativo e crítico. Estudos conduzidos em medicina humana foram utilizados para sustentar mecanismos gerais quando inexistiam dados veterinários equivalentes, sempre com registro explícito dessa extrapolação como limite metodológico, e não como equivalência automática entre espécies. Os estudos felinos, mesmo quando exploratórios ou de casuística reduzida, receberam atenção prioritária em razão de seu valor contextual específico.

4.5. CONSTRUÇÃO DO MODELO INTEGRATIVO E DO PROTOCOLO PROPOSTO

A etapa final consistiu em converter a análise comparativa em produto. Primeiro foram definidos os alvos fisiopatológicos mais relevantes da doença renal crônica felina; em seguida, esses alvos foram confrontados com os efeitos documentados para as células-tronco mesenquimais e com as propriedades atribuídas às USCs, verificando-se onde havia convergência biológica e onde persistiam lacunas.

Sobre os pontos em que os protocolos descritos na literatura divergem entre si, procedeu-se ao confronto direto dos parâmetros, com escolha justificada e classificação do tipo de adaptação que cada decisão representa. O conjunto dessas decisões constitui o protocolo apresentado no capítulo seguinte, que é, portanto, o resultado da análise aqui descrita.

Adotou-se ainda o princípio de parcimônia translacional: em lugar de assumir regeneração morfológica completa do órgão, o modelo trabalha com horizonte de modulação do microambiente, desaceleração da fibrose e preservação do tecido remanescente, formulação mais compatível com a natureza crônica e irreversível da enfermidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados da análise comparativa realizada a partir do percurso metodológico descrito no Capítulo 4, consolidados em um protocolo laboratorial integrado. São discutidas, de forma integrada, as etapas laboratoriais de bancada, o processamento de produtos acelulares e o raciocínio operacional aplicado à futura translação clínica em felinos, com as justificativas construídas a partir do confronto entre os parâmetros adotados pelos diferentes autores consultados.

5.1. ARQUITETURA GERAL DO PROTOCOLO RESULTANTE

O modelo conceitual resultante desta análise articula três dimensões que, na literatura consultada, encontravam-se dispersas. A primeira é o racional biológico: as USCs são propostas como fonte de interesse porque a ação terapêutica das células mesenquimais é predominantemente parácrina, porque a origem tecidual condiciona o repertório secretório, e porque a origem nefrourológica se associa à expressão elevada de α -Klotho, proteína cuja redução acompanha a progressão da nefropatia. A segunda é a viabilidade experimental: o protocolo define, parâmetro a parâmetro, quais procedimentos podem ser extrapolados de protocolos humanos, quais exigem adaptação à espécie felina e quais permanecem sujeitos a validação, classificação sistematizada na Tabela 1. A terceira é o potencial de aplicação clínica: a proposta delimita população-alvo, via, dose, esquema de aplicação e critérios objetivos de acompanhamento. O modelo, portanto, não é uma soma de etapas laboratoriais, mas a articulação dessas três dimensões em uma estrutura única, na qual cada decisão técnica remete a um fundamento biológico e a um horizonte de verificação clínica.

O presente capítulo apresenta o resultado da análise comparativa descrita no Capítulo 4: uma proposta científica teórico-propositiva, organizada em formato de Protocolo Operacional Padrão (POP) de bancada, destinada ao isolamento, à expansão, à caracterização e à aplicação terapêutica de células-tronco mesenquimais derivadas da urina (USCs) em felinos domésticos (*Felis catus*) portadores de doença renal crônica (DRC). A estrutura metodológica assume natureza aplicada e integrada, de forma contínua, um braço laboratorial voltado ao estabelecimento, à qualificação e ao monitoramento biológico das USCs e um braço clínico destinado à sua aplicação terapêutica em gatos classificados nos estágios IRIS 2 e 3, com base nos critérios da *International Renal Interest Society* (IRIS, 2023).

O protocolo que resulta dessa análise configura um desenho experimental, prospectivo e comparativo, a ser implementado em estudo futuro, articulando de forma integrada as etapas

de bancada (*bench*) e as etapas clínicas (*bedside*). A definição dos parâmetros e das etapas que compõem esse desenho resulta da análise comparativa dos procedimentos e critérios descritos na literatura, considerando suas convergências, diferenças e as adaptações necessárias ao contexto felino. Dessa forma, a proposta integra dados dispersos da literatura sobre células urinárias humanas, da literatura sobre MSCs em medicina veterinária e das adaptações específicas para felinos exigidas pela fisiopatologia da DRC em um protocolo único, integrado e tecnicamente executável (Bento *et al.*, 2020; Burdeyron *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022; Quimby; Borjesson, 2018; Voga *et al.*, 2020b).

O protocolo organiza-se em três eixos operacionais indissociáveis. O primeiro eixo corresponde à fase laboratorial de isolamento, cultivo primário, expansão, criopreservação, controle de qualidade, caracterização imunofenotípica e avaliação funcional das USCs, com fundamento nas descrições experimentais clássicas e nos estudos de caracterização mais abrangentes disponíveis para essas células (Bharadwaj *et al.*, 2013; Culenova *et al.*, 2021). O segundo eixo corresponde à fase bioanalítica, dedicada ao secretoma e às vesículas extracelulares derivadas das USCs, com ênfase em exossomos e em seus potenciais mecanismos de ação renoprotetores, imunomodulatórios e tróficos no contexto da doença renal (Théry *et al.*, 2018; Eirin; Lerman, 2021; Kosanović *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2016).

O terceiro eixo corresponde à fase translacional clínica, na qual se estrutura a proposta de uso terapêutico em felinos com DRC, considerando a experiência acumulada da medicina veterinária com produtos celulares mesenquimais e os estudos clínicos já conduzidos em gatos com doença renal (Quimby *et al.*, 2011; Quimby *et al.*, 2013; Quimby *et al.*, 2016; Thomson *et al.*, 2019; Vidane *et al.*, 2017; Zacharias *et al.*, 2021).

A origem das células difere conforme a fase do protocolo. Na padronização e caracterização (eixos 1 e 2), a urina provém de gatos com DRC em IRIS 2 e 3, população-alvo, pois a viabilidade do isolamento nessa matriz é um dos desfechos do estudo. Na aplicação terapêutica (eixo 3), adota-se produto alogênico de doadores hígidos triados, criopreservado no sistema de bancos descrito em 5.9. A opção não decorre de juízo sobre a qualidade das células autólogas, questão em aberto conforme 3.5.5, mas de razões operacionais: o intervalo até a liberação de um lote caracterizado é incompatível com a progressão da nefropatia, dificuldade já registrada em MSCs autólogas felinas, cuja expansão foi insuficiente em três de sete gatos com DRC (Quimby *et al.*, 2011), e a maior parte dos estudos clínicos felinos em DRC empregou produtos alogênicos (Quimby *et al.*, 2013; Quimby *et al.*, 2016; Zacharias *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2025). O protocolo de coleta, isolamento e expansão descrito em 5.3 a 5.14 aplica-se a ambas as origens: os parâmetros ali

definidos foram calibrados para a urina de animais nefropatas e representam, frente à urina de doadores hígidos, condição mais permissiva quanto ao pH aceito e mais rigorosa quanto à remoção de solutos.

No plano conceitual, o protocolo adota como referência central os critérios mínimos propostos pela *International Society for Cellular Therapy* para definição de células estromais/mesenquimais multipotentes, especialmente no que se refere à adesão ao plástico, ao perfil imunofenotípico e ao potencial de diferenciação multilinear (Dominici *et al.*, 2006). Ao mesmo tempo, reconhece-se que a aplicação literal desses critérios a células de origem urinária e à espécie felina exige ajustes metodológicos e interpretativos, tanto pela singularidade do tecido de origem quanto pela limitação de anticorpos e marcadores validados interespecificamente. Nesse ponto, a necessidade de diretrizes mais inclusivas para diferentes fontes celulares e espécies reforça a opção por um protocolo comparativo, em vez da simples transposição de parâmetros humanos para felinos (Wright; Arthaud-Day; Weiss, 2021; Quimby; Borjesson, 2018).

No eixo das vesículas extracelulares, a proposta segue as recomendações da *Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles* 2018 (MISEV2018), que estabelecem requisitos mínimos para coleta, isolamento, caracterização e interpretação de resultados em estudos com exossomos e outras EVs (Théry *et al.*, 2018). A incorporação dessas diretrizes é indispensável porque o secretoma das USCs constitui um dos argumentos centrais de aplicabilidade renal, especialmente pelos efeitos tróficos e imunomodulatórios associados a fatores solúveis, proteínas bioativas, RNAs e vesículas com potencial de proteção tubular e modulação inflamatória (Eirin; Lerman, 2021; Kosanović *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2024).

No contexto da medicina veterinária, a metodologia ancora-se na literatura que descreve o uso de MSCs em felinos com DRC e em revisões que discutem o estado atual da terapia celular em medicina felina. Esses estudos demonstram que a aplicação clínica de produtos celulares em gatos já possui base experimental e clínica suficiente para justificar a estruturação de protocolos mais robustos, embora ainda persistam limitações relativas à padronização de dose, via de administração, frequência de aplicação, origem celular e critérios de resposta terapêutica (Quimby *et al.*, 2011; Quimby *et al.*, 2013; Quimby *et al.*, 2016; Quimby; Borjesson, 2018; Thomson *et al.*, 2019; Voga *et al.*, 2020b). Nesse cenário, a opção por focalizar gatos com DRC em estágios IRIS 2 e 3 decorre da maior plausibilidade clínica de intervenção antes da fase terminal da doença e da necessidade de alinhar o

protocolo a uma população em que ainda exista margem biológica para resposta terapêutica mensurável (IRIS, 2023).

O braço laboratorial é conduzido sob condições de biossegurança nível 2 (NB-2), em razão da natureza biológica da urina felina, do risco de contaminação microbiológica do material de origem e da manipulação subsequente de culturas celulares, sobrenadantes condicionados e derivados extracelulares. O braço clínico observa o arcabouço ético e regulatório aplicável à experimentação animal e à terapia celular veterinária no Brasil, incluindo a Lei nº 11.794/2008, o Decreto nº 6.899/2009, as Resoluções Normativas do CONCEA e as Resoluções do Conselho Federal de Medicina Veterinária pertinentes à pesquisa e ao uso de terapias celulares em animais. Assim, a proposta se consolida como metodologia comparativa e integrada: não descreve como a literatura é buscada, mas como o experimento é efetivamente executado, a partir da seleção crítica, comparação explícita e integração justificada dos parâmetros técnicos mais adequados ao contexto felino.

5.2. PLANEJAMENTO OPERACIONAL, INFRAESTRUTURA E CUSTOS

O planejamento logístico de aquisição e transporte de insumos, a especificação da infraestrutura e dos equipamentos, a relação consolidada de materiais e o orçamento detalhado encontram-se reunidos no Apêndice C, por constituírem informação operacional de apoio à execução, e não decisão metodológica. As escolhas técnicas que dependem desses recursos são justificadas nas seções correspondentes deste capítulo.

5.3. COLETA POR CISTOCENTESE ESTÉRIL

A coleta de urina, nesta fase de padronização, é realizada em gatos com DRC nos estágios IRIS 2 e 3, conforme o escopo declarado em 5.1, por cistocentese estéril ecoguiada, método selecionado para obtenção de células viáveis em cultura por apresentar menor risco de contaminação microbiológica quando comparado à micção espontânea e à cateterização uretral. A escolha da via encontra respaldo experimental: em USCs caninas, obteve-se proliferação apenas nas amostras colhidas por cistocentese, enquanto as obtidas por micção espontânea e por cateterização vesical não proliferaram (Lange-Consiglio *et al.*, 2025).

O animal é posicionado em decúbito dorsal sobre superfície limpa e acolchoada ou, quando necessário, em decúbito lateral direito. Após tricotomia ampla da região hipogástrica

e limpeza da pele, realiza-se a antissepsia com solução de clorexidina a 2% em álcool isopropílico a 70%, aplicada em cinco passagens de gaze estéril do centro para a periferia. O campo permanece sem manipulação por três minutos, permitindo a ação do antisséptico e a secagem completa da pele antes da punção (Duque *et al.*, 2024).

A punção é realizada com agulha estéril de calibre 22G ou 23G, com aproximadamente 25 mm de comprimento, acoplada a seringa de 5 ou 10 mL. A inserção ocorre em ângulo aproximado de 45°, no sentido craniocaudal, com penetração da parede ventral da bexiga na região do polo cranial ou do trígono vesical, sob visualização ultrassonográfica em tempo real. A orientação ecográfica é adotada rotineiramente, pois gatos com doença renal crônica podem apresentar enchimento vesical variável, aumentando o risco de punção inadvertida de estruturas adjacentes quando se utiliza a técnica cega.

A necessidade de sedação é definida de forma individualizada, considerando o grau de cooperação e a condição clínica do animal. Em pacientes cooperativos, utiliza-se contenção física mínima. Nos indivíduos reativos, pode-se empregar gabapentina por via oral, na dose de 50 a 100 mg por gato, administrada entre duas e três horas antes do procedimento, com possibilidade de associação à trazodona quando necessário. Se a contenção permanecer inadequada, admite-se sedação leve com butorfanol (0,2 a 0,4 mg/kg, IM), associado a midazolam (0,2 mg/kg, IM). Agonistas $\alpha 2$ -adrenérgicos, como a dexmedetomidina, são evitados quando houver avaliação concomitante da função renal, devido às alterações hemodinâmicas que podem interferir na taxa de filtração glomerular e nos níveis de creatinina e SDMA (Quimby; Borjesson, 2018).

Constituem contraindicações absolutas para o procedimento as coagulopatias confirmadas por alterações de TP/TTPa ou plaquetopenia inferior a 50.000/ μ L, a obstrução uretral não resolvida, a presença de massa vesical suspeita de neoplasia e os processos infecciosos ativos do trato urinário. Nessas condições, o risco de complicações supera o benefício da coleta destinada ao isolamento celular.

O volume obtido em cada procedimento depende principalmente do grau de enchimento vesical, do porte corporal e da condição clínica do animal, inexistindo na literatura veterinária consenso sobre um volume específico para coleta destinada ao isolamento de USCs em felinos. Estudos clínicos envolvendo cistocentese ecoguiada em gatos descrevem a obtenção rotineira de amostras destinadas à urinálise, cultura microbiológica e determinação da relação proteína:creatinina urinária. Vilhena *et al.* (2015) obtiveram 5 mL de urina por cistocentese ecoguiada em 43 gatos, demonstrando que volumes dessa ordem de

grandeza são factíveis na rotina clínica, embora não representem um limite fisiológico padronizado para todos os pacientes.

Essa realidade difere substancialmente dos protocolos de isolamento de USCs humanas, nos quais normalmente são processados entre 100 e 200 mL de urina, com rendimento médio de aproximadamente cinco a sete colônias por 100 mL processados (Bharadwaj *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2013).

Considerando essa limitação inerente à espécie felina, o presente protocolo propõe uma estratégia de coletas seriadas ecoguiadas, acumulando progressivamente o volume obtido até atingir, sempre que possível, 30 a 60 mL por animal. Esse volume acumulado constitui uma adaptação metodológica deste estudo, elaborada para aproximar o volume final de processamento aos protocolos empregados para isolamento de USCs humanas, e não corresponde a uma recomendação previamente estabelecida na literatura veterinária. O número de sessões é definido individualmente conforme o volume obtido em cada procedimento, a evolução clínica do paciente e a avaliação ultrassonográfica da bexiga, sem estabelecimento de número fixo de coletas. Os procedimentos são realizados com intervalo de 48 a 72 horas, período adotado por critério metodológico para permitir reavaliação clínica e ultrassonográfica entre as sessões, uma vez que não existem recomendações específicas para coletas seriadas destinadas ao isolamento de USCs em gatos com doença renal crônica.

Cada amostra é refrigerada e processada individualmente logo após a coleta, reduzindo o tempo de exposição das células ao ambiente urinário e o risco de perda de viabilidade (Lange-Consiglio *et al.*, 2025). Quando o processamento imediato não é possível, a amostra pode ser mantida a 4 °C por até 24 horas, condição descrita como compatível com a preservação da capacidade proliferativa das USCs (Lang *et al.*, 2013).

5.4. TRIAGEM E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

Imediatamente após a coleta, cada amostra é transferida para tubo cônico estéril de 50 mL contendo solução antibiótica/antimicótica, de modo a atingir concentração final de penicilina 200 U/mL, estreptomicina 200 µg/mL e anfotericina B 2,5 µg/mL. Essa estratégia segue protocolos estabelecidos para isolamento de USCs e tem como objetivo reduzir a carga microbiana inicial sem comprometer a viabilidade celular (Bharadwaj *et al.*, 2013; Culenova *et al.*, 2021). O tubo é devidamente identificado com código do animal, data, hora da coleta, volume e pH urinário.

As amostras são mantidas sob refrigeração controlada (4 °C) durante o transporte, em caixa térmica com gelo reciclável, e encaminhadas imediatamente ao laboratório. O tempo máximo entre coleta e processamento é limitado a 4 horas em temperatura ambiente ou até 24 horas sob refrigeração, intervalo validado experimentalmente quanto à manutenção da viabilidade celular e da capacidade proliferativa das USCs (Lang *et al.*, 2013). A redução desse intervalo é priorizada sempre que possível, considerando que o ambiente urinário apresenta variações osmóticas e metabólicas que impactam negativamente a estabilidade celular ao longo do tempo (Bento *et al.*, 2020).

A triagem pré-analítica é realizada em cabine de biossegurança antes do início do isolamento celular e tem como objetivo excluir amostras com alto risco de falha de cultivo. A avaliação contempla quatro parâmetros, sendo três utilizados como critérios de exclusão e um destinado apenas à caracterização da amostra.

- Inspeção macroscópica (critério excludente) - O primeiro parâmetro corresponde à inspeção macroscópica da amostra. São considerados critérios de exclusão a presença de turbidez intensa, coloração hemorrágica evidente compatível com hematúria macroscópica e material purulento visível. Essas condições refletem elevada carga celular inflamatória ou contaminação microbiana, fatores que comprometem o estabelecimento de culturas primárias estáveis (Burdeyron *et al.*, 2020).
- Análise do sedimento urinário (critério excludente) - O segundo parâmetro corresponde à análise do sedimento urinário. Uma alíquota de 5 mL é submetida à centrifugação a 400 × g por 5 minutos, seguida de avaliação microscópica do sedimento. A presença de piúria acentuada (>10 leucócitos por campo em aumento de 400×) ou bacteriúria visível constitui critério de descarte da amostra, considerando que a carga microbiana excede a capacidade de controle pelos antibióticos adicionados e compromete a viabilidade do cultivo celular (Bharadwaj *et al.*, 2013; Culenova *et al.*, 2021).
- Aferição do pH urinário (critério excludente) - O terceiro parâmetro corresponde à aferição do pH urinário por fita indicadora ou pHmetro calibrado. Define-se como faixa de aceitação valores entre 5,5 e 8,0. Amostras com pH fora desse intervalo são excluídas por apresentarem condições potencialmente desfavoráveis à manutenção da viabilidade celular durante o processamento. Esse intervalo difere do utilizado em protocolos humanos, que frequentemente adotam limites mais restritivos, baseados em indivíduos saudáveis. Em felinos com DRC, entretanto, a perda da capacidade de acidificação tubular e a presença de distúrbios ácido-base sistêmicos resultam em maior variabilidade do pH urinário, frequentemente com tendência à alcalinização. A adoção de limites mais

restritivos levaria à exclusão de grande parte das amostras representativas da população-alvo, comprometendo a aplicabilidade do protocolo (Quimby; Borjesson, 2018).

- Densidade urinária (parâmetro descritivo, não excludente) - O quarto parâmetro corresponde à mensuração da densidade urinária por refratometria. O valor obtido é registrado exclusivamente para caracterização funcional da amostra, uma vez que gatos com DRC em estágios intermediários frequentemente apresentam densidade urinária reduzida, compatível com perda da capacidade de concentração renal. Valores próximos à faixa isostenúrica são esperados e não constituem critério de exclusão, sendo considerados apenas na interpretação do rendimento celular e na caracterização da população estudada (IRIS, 2023).

A aplicação sequencial desses parâmetros permite que os critérios eliminatórios sejam avaliados antes da caracterização complementar da amostra, tornando a triagem pré-analítica mais racional e eficiente. Reduzem-se, com isso, perdas de tempo e recursos com amostras que seriam posteriormente descartadas, aumentando a reprodutibilidade e a eficiência do protocolo de isolamento celular.

5.5. ISOLAMENTO CELULAR: ANÁLISE COMPARATIVA E DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO DE BANCADA

O isolamento primário das células-tronco derivadas da urina constitui etapa determinante para a recuperação de células aderentes, o estabelecimento de colônias clonogênicas e a estabilidade das culturas subsequentes. Os protocolos disponíveis apresentam variações quanto à força e ao tempo de centrifugação, ao número de lavagens, à geometria de semeadura e ao momento da primeira troca do meio. Contudo, a auditoria das referências utilizadas demonstra que os principais métodos publicados foram desenvolvidos e testados com amostras urinárias humanas, não existindo, até o momento, validação equivalente e suficientemente detalhada para o isolamento de USCs felinas.

Bharadwaj *et al.* (2013) isolaram e caracterizaram USCs provenientes de indivíduos humanos saudáveis, utilizando meio constituído pela combinação de *keratinocyte serum-free medium* e *embryonic fibroblast medium*. Lang *et al.* (2013) também trabalharam exclusivamente com amostras humanas e empregaram centrifugação a $500 \times g$ por cinco minutos, seguida de semeadura do precipitado celular em placas de 24 poços. Culenova *et al.*

(2021), embora representem uma referência mais recente e metodologicamente abrangente, igualmente descreveram isolamento, cultivo e caracterização de USCs humanas. Essas referências fundamentam, portanto, os procedimentos laboratoriais gerais, mas não validam diretamente sua aplicação à espécie felina.

A centrifugação, as lavagens do precipitado e o cultivo em superfície tratada são considerados procedimentos laboratoriais de caráter predominantemente espécie-independente. Por essa razão, sua adoção a partir de estudos humanos é metodologicamente aceitável, desde que os valores sejam apresentados como parâmetros iniciais e não como condições previamente validadas para gatos. Em contraste, decisões relacionadas ao volume de urina disponível, à concentração celular esperada, à geometria de semeadura e à frequência de obtenção das amostras dependem diretamente das particularidades clínicas e fisiológicas da espécie e devem ser identificadas como adaptações experimentais.

A opção por placas de 12 poços no protocolo proposto não decorre de validação publicada em USCs felinas. Trata-se de uma adaptação racional destinada a concentrar o reduzido precipitado celular potencialmente recuperado de amostras urinárias felinas, evitando sua distribuição em uma área excessiva de cultivo. Essa estratégia deverá ser testada comparativamente com placas de 24 poços durante a fase de padronização, considerando como desfechos o número de colônias aderentes, o tempo até o aparecimento das primeiras unidades clonogênicas, a taxa de contaminação e o rendimento celular ao final da cultura primária.

A primeira troca de meio será realizada de forma parcial após 72 horas, com o objetivo de remover detritos, células não aderentes e possíveis contaminantes sem provocar deslocamento das células recém-aderidas. Esse intervalo foi extrapolado do protocolo humano descrito por Culenova *et al.* (2021) e deverá ser validado em amostras felinas. Caso sejam observadas alterações acentuadas de pH, turbidez, proliferação microbiana ou perda precoce de viabilidade, o momento da troca será antecipado e registrado como desvio metodológico.

A Tabela 1 apresenta, portanto, protocolos humanos utilizados como referência técnica e identifica separadamente os parâmetros adotados como ponto de partida para futura validação em felinos. A comparação não pressupõe equivalência biológica entre espécies nem superioridade prévia de uma condição de cultivo. Seu objetivo é organizar as alternativas descritas na literatura e explicitar quais etapas são diretamente reproduzidas, quais foram modificadas e quais ainda dependem de confirmação experimental.

Tabela 1 – Protocolos humanos de referência e parâmetros propostos para validação no isolamento de células derivadas da urina felina

Parâmetro	Bharadwaj et al. (2013)	Lang et al. (2013)	Culenova et al. (2021)	Protocolo proposto para validação felina	Classificação da adaptação
Espécie de origem	Humana	Humana	Humana	Felina	Não validado previamente
Condição dos doadores	Pessoas saudáveis	Homens adultos saudáveis	Doadores humanos	Padronização: gatos com DRC (IRIS 2-3). Aplicação: doadores hígidos triados	Específica da espécie
Volume urinário	Amostras humanas de elevado volume	Amostras humanas de elevado volume	Até aproximadamente 200 mL	Volume efetivamente obtido conforme a seção de coleta	Específica da espécie
Primeira centrifugação	400 × g	500 × g	500 × g	400 × g	Parâmetro laboratorial inicial
Tempo de centrifugação	10 min	5 min	10 min	10 min	Parâmetro laboratorial inicial
Lavagens do precipitado	Conforme protocolo de isolamento	Ressuspensão após centrifugação	Lavagem do precipitado	Duas lavagens com PBS estéril	Espécie-independente, sujeito a validação
Filtração	Não indicada como etapa obrigatória	Não indicada	Não indicada como rotina	Opcional, conforme presença de sedimento ou debris	Adaptação operacional
Placa de cultura primária	24 poços	24 poços	24 poços	Comparação entre 12 e 24 poços	Adaptação por baixa disponibilidade celular esperada
Meio inicial	KSFM/EF M	KSFM/EF M	Meio para USCs humanas	Meio baseado em protocolos humanos, com ajustes experimentais	Extrapolação interespecífica
Primeira troca de meio	Dependente da adesão e formação de colônias	Trocas subsequentes conforme crescimento	72 h	Troca parcial em 72 h	Extrapolação de protocolo humano

Validação exigida	USCs humanas caracterizadas	USCs humanas preservadas e cultivadas	USCs humanas amplamente caracterizadas	Adesão, clonogenicidade, imunofenótipo, proliferação e estabilidade	Obrigatória para felinos
--------------------------	-----------------------------	---------------------------------------	--	---	--------------------------

Fonte: elaboração própria com base em Bharadwaj *et al.* (2013), Lang *et al.* (2013) e Culenova *et al.* (2021).

O protocolo de bancada adotará inicialmente centrifugação a $400 \times g$ por dez minutos, seguida de duas lavagens do precipitado com PBS estéril e ressuspensão cuidadosa em meio inicial. A escolha de $400 \times g$ busca conciliar recuperação celular e redução do estresse mecânico, com base em protocolos humanos de isolamento de USCs. Por se tratar de parâmetro laboratorial geral, sua extrapolação é considerada aceitável; contudo, o rendimento deverá ser comparado experimentalmente com a condição de $500 \times g$, utilizada por Lang *et al.* (2013) e Culenova *et al.* (2021).

Após o processamento, o precipitado será distribuído inicialmente em área reduzida de cultivo. A utilização de placa de 12 poços será tratada como adaptação experimental motivada pelo pequeno volume urinário e pela baixa quantidade de células potencialmente recuperáveis em felinos, especialmente em pacientes com doença renal crônica. Essa justificativa não corresponde à evidência direta de USCs felinas e, por isso, a geometria da placa será considerada variável de padronização, e não componente definitivamente estabelecido do protocolo.

O sucesso do isolamento será avaliado pelo aparecimento de células aderentes com morfologia compatível, formação de colônias, ausência de contaminação e capacidade de expansão após a primeira passagem. A morfologia fibroblastoide, isoladamente, não será considerada suficiente para confirmar a identidade mesenquimal. As culturas deverão ser submetidas posteriormente à caracterização imunofenotípica e funcional definida nas seções específicas.

A extrapolação dos protocolos humanos é necessária porque a literatura ainda não oferece um método padronizado para obtenção e cultivo de USCs felinas. Essa limitação será assumida explicitamente no delineamento. Os parâmetros descritos constituem condições iniciais de investigação e deverão ser ajustados conforme os resultados obtidos em relação ao rendimento, à viabilidade, à clonogenicidade, ao perfil imunofenotípico e à estabilidade

durante as passagens. Somente após essa validação será possível afirmar que o protocolo é adequado à espécie felina.

5.5.1. *Comparação crítica e definição do protocolo*

A etapa de centrifugação inicial apresenta variações relevantes entre os grupos de referência. Bharadwaj *et al.* (2013) e Zhou *et al.* (2012) empregam $400 \times g$ por 10 minutos em temperatura ambiente, enquanto Lang *et al.* (2013) e Culenova *et al.* (2021) utilizam $500 \times g$, com tempos reduzidos em alguns casos. O aumento da força centrífuga promove maior eficiência de sedimentação, porém resulta em maior compactação do *pellet*, dificultando a ressuspensão e podendo comprometer a viabilidade celular, especialmente em amostras com baixa densidade celular.

Adota-se neste protocolo a condição de $400 \times g$ por 10 minutos em temperatura ambiente, com base em dois critérios principais: (i) maior preservação de células viáveis em amostras diluídas, característica típica da urina de felinos com DRC; e (ii) alinhamento com o protocolo original que demonstrou maior eficiência clonogênica para USCs (Bharadwaj *et al.*, 2013; Bento *et al.*, 2020). Essa combinação de força centrífuga e tempo de sedimentação proporciona recuperação celular adequada sem aumentar desnecessariamente o estresse mecânico sobre as células durante a etapa inicial do isolamento.

Após a centrifugação inicial, o sobrenadante é removido por aspiração cuidadosa, preservando o *pellet* celular. São realizadas duas lavagens sequenciais com 10 mL de PBS estéril sem cálcio e magnésio, suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (1,25 µg/mL). Protocolos da literatura variam entre uma e duas lavagens (Bharadwaj *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2013; Culenova *et al.*, 2021); entretanto, a adoção de duas etapas neste protocolo é justificada pela necessidade de remover metabólitos urinários, ureia e sais em maior concentração em gatos com DRC, que interferem na adesão celular inicial e no estabelecimento do cultivo (Burdeyron *et al.*, 2020).

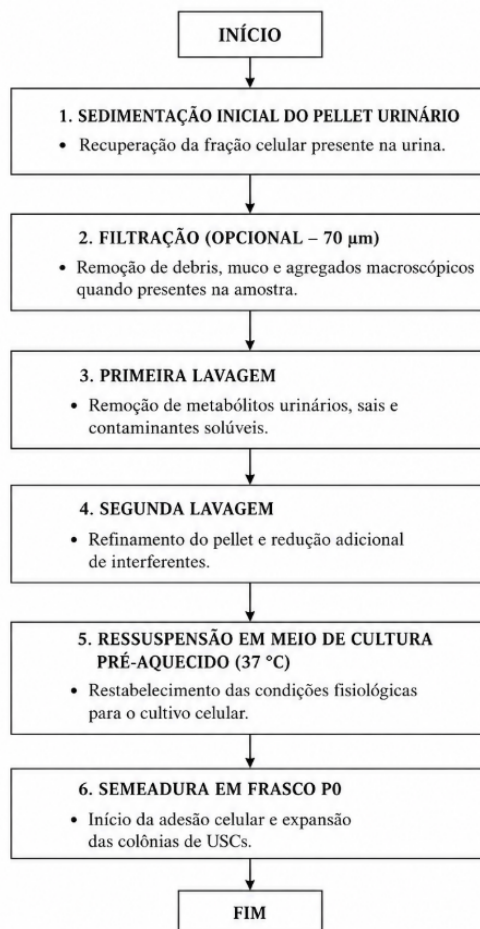
A filtração por *cell strainer* de 70 µm não integra os protocolos clássicos de isolamento de USCs, baseados predominantemente em centrifugação e lavagens sucessivas. Neste protocolo, sua utilização é prevista apenas como etapa opcional, quando houver elevada quantidade de debris teciduais, muco ou agregados macroscópicos capazes de dificultar a ressuspensão do *pellet* ou interferir na semeadura celular. Nesses casos, a filtração é realizada entre a primeira e a segunda lavagem, com o objetivo de remover partículas não celulares de maior tamanho, preservando a fração celular destinada ao cultivo. Embora essa estratégia seja

compatível com procedimentos de processamento de suspensões celulares primárias, sua adoção não constitui consenso específico para o isolamento de USCs, devendo ser restrita às situações em que a qualidade da amostra justificar sua utilização. Registra-se, portanto, como parâmetro condicional do protocolo, sem respaldo bibliográfico específico para USCs felinas.

A escolha da geometria de semeadura também apresenta variação entre os estudos, com utilização de placas de 12 e 24 poços. Neste protocolo adota-se placa de cultura de 12 poços com superfície tratada para cultura celular (*tissue culture-treated*), amplamente empregada em laboratórios de cultivo celular por proporcionar adesão eficiente de células mesenquimais sem necessidade de revestimentos adicionais. A concentração da suspensão celular em menor área favorece o contato inicial entre as células e o substrato, aumentando a probabilidade de formação de colônias clonogênicas em amostras de baixa celularidade. Protocolos recentes para isolamento e expansão de USCs empregam rotineiramente superfícies tratadas para adesão celular, dispensando o uso sistemático de revestimentos como gelatina ou colágeno (Culenova *et al.*, 2021).

O cronograma da primeira troca de meio apresenta divergência significativa na literatura, variando entre remoção precoce (24 horas) e manutenção até o surgimento de colônias. A remoção precoce do meio reduz contaminantes, porém aumenta o risco de perda de células não aderidas em fase inicial. Neste protocolo, adota-se a primeira intervenção em 72 horas, com adição parcial de meio, estratégia que preserva fatores solúveis e aumenta a taxa de sobrevivência de clones emergentes.

A adaptação mais relevante refere-se ao volume urinário. Protocolos humanos utilizam volumes de 100 a 200 mL, com rendimento médio de 5 a 7 colônias por 100 mL (Bharadwaj *et al.*, 2013) e maior taxa de sucesso acima de 200 mL (Lang *et al.*, 2013). Esses volumes são inviáveis em felinos, razão pela qual se adota a estratégia de coleta seriada definida em 5.4, sem comprometer o princípio biológico do protocolo (Zhou *et al.*, 2022).

Figura 1 - Condições de centrifugação no isolamento primário

Fonte: Elaboração própria (2026).

A Figura 1 organiza essas decisões em fluxo operacional único. A manutenção da força centrífuga constante entre os ciclos reduz variações mecânicas e favorece a recuperação progressiva das células, enquanto a ressuspensão final em meio aquecido a 37 °C restabelece condições fisiológicas para a adesão em P0. O conjunto constitui protocolo reprodutível, adaptado às particularidades da urina de felinos com DRC (Bharadwaj *et al.*, 2013; Culenova *et al.*, 2021; Bento *et al.*, 2020).

5.6. SEMEADURA PRIMÁRIA E SELEÇÃO POR ADESÃO DIFERENCIAL AO PLÁSTICO

O *pellet* celular obtido ao final do isolamento é ressuspendido em 1 mL de meio de cultura primário e distribuído em placa de cultura de 12 poços com superfície tratada para

cultura celular (*tissue culture-treated*), utilizando aproximadamente 500 μ L por poço. O emprego desse tipo de superfície favorece a adesão inicial das células com características mesenquimais e constitui prática recorrente em protocolos de cultivo de células derivadas da urina, dispensando revestimentos adicionais quando o sistema de cultura empregado assegura adesão satisfatória (Culenova *et al.*, 2021).

A utilização de placas de 12 poços, em substituição às placas de 24 poços descritas em protocolos humanos, constitui adaptação experimental à baixa celularidade discutida em 5.4, buscando aumentar a densidade celular inicial por área e favorecer o contato entre as células recuperadas e a superfície de cultivo. Como essa geometria ainda não foi validada especificamente para USCs felinas, deverá ser tratada como parâmetro de padronização, com registro do número de colônias, do tempo para adesão e do rendimento celular obtido.

A seleção inicial ocorre por adesão diferencial ao plástico. Após a semeadura, células aderentes permanecem no cultivo, enquanto células não aderentes e parte dos detritos são removidas gradualmente durante as trocas de meio. Esse procedimento funciona como etapa inicial de enriquecimento, mas não confirma, isoladamente, a identidade mesenquimal da cultura. A caracterização definitiva deverá combinar morfologia, imunofenótipo e ensaios funcionais, evitando que a simples adesão ao substrato seja interpretada como prova suficiente de identidade celular (Dominici *et al.*, 2006).

Após a semeadura, as placas são incubadas a 37 °C, em atmosfera controlada de 5% de CO₂ e alta umidade relativa, sem perturbação inicial. A primeira intervenção é realizada após 72 horas, mediante adição parcial de meio fresco, sem remoção integral do sobrenadante. Essa estratégia foi extrapolada de protocolos humanos e pretende reduzir a perda de células ainda em fase de adesão. O intervalo deverá ser revisto diante de alterações acentuadas de pH, turbidez, contaminação ou deterioração morfológica da cultura (Culenova *et al.*, 2021).

A partir do quinto dia, o meio é renovado parcialmente a cada 72 horas, com aspiração cuidadosa na borda do poço e reposição de volume equivalente. As primeiras colônias podem surgir entre o quinto e o nono dia, apresentando padrão de crescimento inicialmente compacto e posterior expansão radial. A velocidade de aparecimento das colônias e o rendimento do isolamento devem ser registrados para cada amostra, pois os dados disponíveis derivam majoritariamente de USCs humanas e não permitem antecipar uma taxa de sucesso específica para felinos (Lang *et al.*, 2013; Culenova *et al.*, 2021).

O tempo de duplicação celular constitui referência biológica para o acompanhamento da expansão após o estabelecimento da cultura. Em estudos com USCs humanas, foram observados valores próximos de 20 a 30 horas em culturas com desempenho proliferativo

favorável. Boysen *et al.* (2024) relataram média de 23,9 horas, com variação de 19,0 a 28,7 horas, enquanto Culenova *et al.* (2021) encontraram tempo de duplicação de $45 \pm 0,24$ horas em seu sistema de cultivo. Essa diferença demonstra que o parâmetro depende da origem da amostra, da densidade de semeadura, do meio, da passagem e das condições laboratoriais. No protocolo proposto, esses intervalos serão utilizados apenas como referências comparativas, não como valores previamente validados para USCs felinas.

5.7. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

A definição da composição do meio de cultura constitui decisão metodológica central, pois influencia diretamente a adesão inicial, o rendimento clonogênico, a estabilidade fenotípica e a capacidade proliferativa das USCs. Os protocolos descritos na literatura utilizam principalmente duas estratégias de cultivo, que diferem quanto ao grau de complexidade da formulação e às exigências da fase inicial de isolamento celular.

Nos protocolos clássicos de isolamento de USCs, descritos por Bharadwaj *et al.* (2013) e posteriormente adotados pelo grupo de Zhang e Atala (Zhang *et al.*, 2008) emprega-se uma formulação bifásica composta por *Keratinocyte Serum-Free Medium* (KSFM; Gibco®) associado ao *Embryonic Fibroblast Medium* (EFM). O KSFM é utilizado na apresentação comercial suplementada pelo fabricante, contendo os aditivos específicos destinados à manutenção e proliferação celular. O EFM corresponde a uma formulação baseada em DMEM e Ham's F-12 suplementada com soro fetal bovino e fatores bioativos que exercem funções complementares durante a expansão inicial das células. Nessa composição, a hidrocortisona, a insulina e a tri-iodotironina (T3) atuam como reguladores hormonais do metabolismo, da sobrevivência e da proliferação celular; o fator de crescimento epidérmico (EGF) estimula a expansão das colônias e a progressão do ciclo celular; a transferrina participa do transporte de ferro necessário à atividade metabólica; enquanto a adenina funciona como precursora de nucleotídeos, favorecendo a proliferação de células epiteliais e progenitoras presentes nas culturas primárias (Bharadwaj *et al.*, 2013).

Uma abordagem mais recente foi proposta por Culenova *et al.* (2021), que substitui a formulação bifásica por um único meio basal DMEM/F-12 (1:1), suplementado com soro fetal bovino, suplemento ITS (*insulin-transferrin-selenium*), ácido ascórbico e EGF. Essa estratégia reduz a complexidade do preparo e apresenta desempenho satisfatório durante a expansão celular, mantendo características fenotípicas semelhantes às observadas nos protocolos clássicos. Revisões recentes indicam que ambas as formulações permitem o

estabelecimento de culturas estáveis de USCs, embora o sistema baseado em KSFM associado ao EFM apresente maior eficiência na fase inicial de formação das colônias (Bento *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022).

Considerando essas evidências, adota-se neste protocolo uma estratégia bifásica. Durante a primocultura (P0–P1), emprega-se a combinação de KSFM comercial suplementado com DMEM/F-12 na proporção de 1:1, buscando favorecer a sobrevivência das células recém-isoladas e maximizar o rendimento clonogênico. Após o estabelecimento das colônias, a partir da passagem P2, o cultivo passa a utilizar apenas DMEM/F-12 suplementado, estratégia que reduz custos, simplifica o manejo laboratorial e mantém estabilidade fenotípica durante a expansão celular, conforme descrito por Culenova *et al.* (2021).

5.7.1. Concentração Fase-Específica de SFB

Embora o *Keratinocyte Serum-Free Medium* (KSFM) seja formulado sem soro fetal bovino em sua apresentação comercial, os protocolos clássicos de isolamento de USCs não o utilizam de forma isolada. O KSFM é combinado com *Embryonic Fibroblast Medium* ou, na adaptação deste protocolo, com DMEM/F-12 suplementado, formando um sistema híbrido no qual a presença de SFB é deliberada. A expressão *serum-free* refere-se, portanto, à formulação basal do KSFM e não caracteriza o sistema completo como isento de soro (Bharadwaj *et al.*, 2013).

A concentração de SFB é ajustada conforme a fase de cultivo. Em P0 utiliza-se 20%, em P1 reduz-se para 15% e, a partir de P2, mantém-se 10%. As concentrações mais elevadas nas fases iniciais destinam-se a fornecer suporte trófico às células recém-isoladas, enquanto a redução posterior acompanha a estabilização da cultura. A limitação do volume urinário e a estratégia de coleta que condicionam a celularidade inicial já foram discutidas em 5.3 e não são retomadas nesta subseção.

Tabela 2 - Concentração fase-específica de SFB qualificado para MSCs

Fase	Concentração de SFB	Justificativa
P0	20%	Estabelecimento da cultura primária e maior suporte trófico.

P1	15%	Adaptação inicial após adesão celular.
P2 em diante	10%	Manutenção da proliferação após estabilização da cultura.

Fonte: Elaboração própria (2026).

O suporte trófico ampliado nas fases iniciais justifica-se pelo baixo rendimento clonogênico do isolamento primário de USCs, que Bharadwaj *et al.* (2013) situam em cinco a sete colônias por 100 mL de urina: nessa etapa o soro fornece proteínas de adesão, fatores de crescimento e moléculas carreadoras indispensáveis à formação das primeiras colônias. A redução posterior preserva a capacidade proliferativa, diminui a variabilidade biológica introduzida pelo soro e reduz custo, mantendo o protocolo alinhado às recomendações contemporâneas de expansão celular (Pittenger *et al.*, 1999; Mebarki *et al.*, 2021).

5.7.2. Suplementação com ITS

Além do meio basal, a formulação empregada neste protocolo inclui suplementos destinados a sustentar o metabolismo, a proliferação e a estabilidade das USCs durante o isolamento e a expansão celular. O suplemento ITS (*insulin-transferrin-selenium*) é utilizado na concentração de trabalho 1× como unidade funcional única, sem adição isolada de seus componentes. Nesse sistema, a insulina favorece a captação de glicose e o metabolismo celular; a transferrina atua no transporte de ferro necessário às atividades biossintéticas; e o selênio participa da defesa antioxidante por integrar enzimas como a glutathione peroxidase, contribuindo para a manutenção da homeostase redox em células previamente expostas ao ambiente urinário (Bento *et al.*, 2020).

A suplementação de L-glutamina é definida conforme a composição do meio basal. Quando o DMEM/F-12 já contém esse aminoácido, não é realizada suplementação adicional, evitando acúmulo de amônia decorrente de sua degradação. Nas formulações isentas de glutamina, utiliza-se GlutaMAX® (L-alanil-L-glutamina) na concentração de 2 mM, devido à sua maior estabilidade química e menor formação de subprodutos tóxicos durante cultivos prolongados.

Como medida de biossegurança, o meio contém penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) em todas as fases do cultivo. A anfotericina B (1,25 µg/mL) é empregada apenas durante o isolamento primário e nas primeiras 48 horas da primocultura,

período em que o risco de contaminação é mais elevado. Após essa etapa, o antifúngico é retirado em razão de seu potencial citotóxico cumulativo, descrito para culturas de células-tronco mesenquimais (Hanley *et al.*, 2013; Mebarki *et al.*, 2021).

O sistema é ainda suplementado com fator de crescimento epidérmico recombinante humano (EGF, 10 ng/mL) e fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF/FGF-2, 10 ng/mL). O EGF estimula a proliferação e a manutenção da atividade mitótica das células em cultura, enquanto o bFGF exerce papel particularmente relevante na expansão de células mesenquimais. A inclusão desse fator representa uma adaptação específica para o contexto felino, uma vez que Fujimoto *et al.* (2020) demonstraram que o bFGF aumenta significativamente a proliferação de MSCs felinas derivadas do tecido adiposo e eleva a expressão de mediadores tróficos, como HGF e TSG-6, sem alterar o perfil imunofenotípico nem a capacidade de diferenciação. Embora concentrações superiores possam acelerar a expansão celular, a dose de 10 ng/mL foi selecionada por proporcionar equilíbrio entre eficiência proliferativa, estabilidade fenotípica e reprodutibilidade do cultivo.

5.8. EXPANSÃO CELULAR, CRITÉRIOS DE PASSAGEM E MONITORAMENTO

A expansão celular tem início após o estabelecimento de colônias aderentes com morfologia compatível e crescimento progressivo. A decisão de realizar a passagem é baseada na confluência da monocamada, adotando-se como referência o intervalo de 70% a 80%. A manutenção prolongada de culturas excessivamente confluentes deve ser evitada, pois pode reduzir a atividade proliferativa e favorecer alterações morfológicas, senescência replicativa e perda de estabilidade fenotípica (Bharadwaj *et al.*, 2013; Culenova *et al.*, 2021).

As passagens são realizadas por dissociação enzimática, seguida de neutralização, centrifugação, quantificação celular e replaqueamento em densidade entre 5×10^3 e 1×10^4 células/cm². O procedimento operacional de lavagem, dissociação, neutralização e ressuspensão está descrito no Apêndice A, permanecendo no corpo desta seção apenas os parâmetros decisórios e os critérios de controle da expansão.

A cada passagem, devem ser registrados o número de células inicialmente semeadas, o número de células recuperadas, o período de cultivo, a viabilidade e o tempo de duplicação celular. O cálculo será realizado conforme o procedimento apresentado no Apêndice B. Para fins de controle interno, tempos próximos de 20 a 30 horas serão considerados compatíveis com expansão rápida observada em culturas humanas bem estabelecidas, enquanto aumentos

persistentes em direção a aproximadamente 45 horas ou além desse valor deverão ser interpretados como sinal de redução do desempenho proliferativo e analisados em conjunto com morfologia, viabilidade, confluência e número de passagem (Culenova *et al.*, 2021; Boysen *et al.*, 2024).

Como ainda não existem intervalos de referência validados para USCs felinas, nenhum lote será descartado exclusivamente com base no tempo de duplicação. A decisão deverá considerar a tendência longitudinal da própria cultura. A elevação progressiva do tempo de duplicação entre passagens, especialmente quando acompanhada de aumento do volume celular (achatamento e alargamento do citoplasma), perda da morfologia fusiforme, redução da adesão ou queda da viabilidade, será registrada como possível indício de senescência ou perda de qualidade.

O número de passagens constitui critério adicional de qualidade. Neste protocolo, P5 é definido como limite preferencial para ensaios experimentais, enquanto P7 representa limite máximo provisório. Essa decisão é conservadora e deverá ser validada para USCs felinas, pois parte das evidências disponíveis provém de células humanas ou de outras fontes mesenquimais. Culturas destinadas a aplicações funcionais deverão ser avaliadas não apenas pela passagem, mas também pelo desempenho proliferativo, pela estabilidade imunofenotípica e pelos ensaios de potência pertinentes.

Durante a expansão, somente culturas com viabilidade igual ou superior a 85% serão mantidas para as etapas experimentais subsequentes. Valores inferiores exigirão repetição da contagem, investigação de contaminação, revisão das condições de dissociação e avaliação da tendência do tempo de duplicação. Esse conjunto de critérios reduz o risco de selecionar culturas numericamente expansíveis, porém biologicamente comprometidas.

5.9. CRIOPRESERVAÇÃO E BANCOS CELULARES

A criopreservação é organizada em dois níveis: Banco Mestre de Células (*Master Cell Bank* – MCB) e Banco de Trabalho (*Working Cell Bank* – WCB). Essa estrutura favorece rastreabilidade, padronização, reprodutibilidade e redução da exposição repetida da linhagem original ao estresse decorrente da expansão celular. O MCB é estabelecido em passagens precoces, preferencialmente entre P2 e P3, enquanto o WCB é produzido a partir do MCB nas passagens P4 e P5, preservando uma fonte primária estável para futuras expansões e aplicações experimentais (Hanley *et al.*, 2013). Essa arquitetura constitui o mecanismo de

produção do lote alogênico da fase de aplicação terapêutica declarada em 5.1, viabilizando a liberação por lote e a rastreabilidade até o doador de origem.

Cada lote é identificado por origem da amostra, passagem celular, data de processamento, concentração celular, composição do meio de congelamento e responsável técnico. O MCB permanece reservado à preservação da linhagem original, enquanto o WCB é utilizado nas atividades experimentais rotineiras. As quantidades de criotubos, densidades celulares e histórico completo de manipulação são registrados em sistema de rastreabilidade específico do banco celular.

O meio de criopreservação pode utilizar formulações especificamente validadas para USCs, como meio de cultura suplementado com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), ou recorrer a formulações convencionais empregadas em protocolos gerais de células-tronco mesenquimais, baseadas em 10% de DMSO associado ao soro fetal bovino (SFB). A escolha da formulação deve considerar os objetivos experimentais, as exigências regulatórias e a disponibilidade de insumos, permanecendo padronizada dentro de cada banco celular para evitar variações metodológicas entre os lotes. A base experimental que sustenta a concentração reduzida de crioprotetor é detalhada adiante nesta seção (Hanley *et al.*, 2013; Mebarki *et al.*, 2021).

O congelamento é realizado mediante taxa controlada de aproximadamente 1 °C por minuto, seguido de armazenamento em nitrogênio líquido na fase vapor. Após descongelamento rápido em banho-maria a 37 °C, as células são imediatamente diluídas em meio de cultura para remoção do DMSO e restabelecimento das condições fisiológicas. O fluxo operacional completo é apresentado no Apêndice A.

A adoção desse sistema de banco celular, e em particular a opção pela concentração reduzida de DMSO, fundamenta-se não apenas em princípios gerais de manufatura de produtos celulares, mas também em evidências específicas obtidas para células-tronco derivadas da urina. Afonso *et al.* (2026) realizaram a primeira validação direcionada da criopreservação de USCs, demonstrando que o congelamento lento seguido de descongelamento rápido preserva atividade metabólica, conteúdo proteico, viabilidade celular, capacidade proliferativa e potencial de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, sem diferenças estatisticamente significativas entre as células avaliadas antes e após a criopreservação. Esses achados fornecem sustentação experimental direta para o estabelecimento de bancos celulares de USCs, viabilizando seu armazenamento prolongado e futura utilização em protocolos de medicina regenerativa, biobancos autólogos e estudos translacionais (Afonso *et al.*, 2026).

Embora as evidências atuais confirmem a manutenção da viabilidade celular, da proliferação e da multipotência após o descongelamento, ainda permanecem limitados os estudos que investigam especificamente a preservação quantitativa e funcional do secretoma e das vesículas extracelulares produzidos por USCs criopreservadas. Assume-se, por conseguinte, que a manutenção das propriedades biológicas das células represente um forte indicativo da preservação de sua atividade terapêutica, mas reconhece-se que a caracterização molecular do secretoma e de seu potencial funcional após a criopreservação permanece uma lacuna científica relevante, devendo ser incorporada em futuras investigações (Afonso *et al.*, 2026).

A liberação de lotes criopreservados exige viabilidade pós-descongelamento mínima de 70%, recuperação da morfologia fibroblastoide característica, readesão ao substrato, ausência de contaminação microbiológica e desempenho satisfatório nos ensaios de controle de qualidade previstos neste protocolo. Sempre que aplicável, recomenda-se complementar essa avaliação por nova confirmação imunofenotípica e ensaios funcionais de proliferação, garantindo que a expansão celular preserve as características biológicas esperadas antes de sua utilização experimental (Afonso *et al.*, 2026; Hanley *et al.*, 2013).

5.10. CONTROLE DE QUALIDADE

O controle de qualidade do banco celular baseia-se em três eixos complementares e indissociáveis: viabilidade celular, estabilidade cromossômica e ausência de contaminação microbiológica, com ênfase no monitoramento de micoplasma. Esses parâmetros são considerados critérios mínimos para validação de culturas celulares destinadas ao uso experimental e à futura aplicação clínica, assegurando identidade, segurança e reprodutibilidade do produto celular (Dominici *et al.*, 2006; Hanley *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2026).

5.10.1. Viabilidade celular

A viabilidade é avaliada por duas metodologias complementares, permitindo validação cruzada dos resultados. A primeira consiste no ensaio de exclusão por Trypan Blue a 0,4%, realizado em diluição 1:1 com a suspensão celular e leitura imediata em câmara de Neubauer ou contador automatizado, respeitando janela máxima de três minutos para evitar toxicidade

do corante. A segunda metodologia utiliza citometria de fluxo com 7-AAD, permitindo discriminação precisa entre células viáveis e inviáveis em análise multiparamétrica.

Os critérios mínimos de viabilidade são definidos de forma fase-específica, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Critérios de viabilidade celular por fase do protocolo

Fase	Critério mínimo	Justificativa
Pós-isolamento primário (P0)	$\geq 80\%$	Etapa de maior estresse físico e osmótico
Expansão (P1 em diante)	$\geq 90\%$	Cultivo estabilizado e livre de estresse inicial
Pós-descongelamento	$\geq 70\%$	Perdas inerentes ao processo de criopreservação

Fonte: Elaboração própria (2026).

A diferenciação dos critérios reflete a biologia do processo: a fase de isolamento primário envolve múltiplos fatores de estresse, centrifugação, variação osmótica e presença de metabólitos urinários, justificando limiar mínimo inferior ao adotado para culturas já estabelecidas. Durante a expansão, a manutenção de viabilidade $\geq 90\%$ é essencial para garantir consistência proliferativa e funcional. No pós-descongelamento, perdas associadas à formação de cristais e apoptose tardia são esperadas, sendo o limite de 70% amplamente aceito como critério de liberação de células para uso experimental (Hanley *et al.*, 2013).

A condução de amostras com viabilidade subótima segue fluxo decisório estruturado. Inicialmente, realiza-se lavagem adicional com PBS aquecido e nova centrifugação, visando remoção de detritos e melhora da qualidade da suspensão. Persistindo baixa viabilidade, pode-se empregar gradiente de densidade com Ficoll-Paque para isolamento da fração mononuclear. Caso não haja recuperação adequada, a amostra é descartada e programada nova coleta, garantindo rastreabilidade e controle de não conformidades. Falhas consecutivas levam à exclusão do material biológico, evitando introdução de variabilidade experimental.

5.10.2. Estabilidade cromossômica

A estabilidade genômica é avaliada por cariotipagem convencional com bandeamento G, com análise mínima de 20 metáfases por amostra. Espera-se padrão cromossômico normal de *Felis catus* ($2n = 38$), sem aneuploidias ou rearranjos estruturais. Embora estudos demonstrem manutenção cromossômica por múltiplas passagens em USCs, alterações funcionais podem ocorrer antes de alterações citogenéticas detectáveis (Bento *et al.*, 2020; Burdeyron *et al.*, 2020). A cariotipagem torna-se, por isso, obrigatória na liberação do Banco Mestre (MCB) e do Banco de Trabalho (WCB), e recomendada em expansões prolongadas, garantindo integridade genômica das linhagens utilizadas.

5.10.3. Detecção de micoplasma

A contaminação por micoplasma constitui uma das principais ameaças à validade de culturas celulares, devido à sua capacidade de alterar metabolismo, expressão gênica e comportamento proliferativo sem sinais macroscópicos evidentes. Por esse motivo, sua detecção é considerada etapa obrigatória em protocolos de cultura celular (Hanley *et al.*, 2013).

Os principais métodos disponíveis apresentam diferenças em sensibilidade, tempo de execução e aplicabilidade, conforme sintetizado na Tabela 4.

Tabela 4 - Métodos de detecção de micoplasma em cultura celular

Método	Princípio	Tempo	Vantagem	Limitação
MycoAlert	Bioluminescência enzimática	~20 min	Detecta micoplasma viável; alta sensibilidade	Requer luminômetro
PCR (Venor GeM)	Amplificação de rRNA 16S	3–4 h	Alta sensibilidade (1–10 CFU/mL)	Detecta DNA residual
DAPI/Hoechst	Marcação de DNA extracelular	3–6 dias	Baixo custo	Menor sensibilidade; subjetivo

Fonte: Elaboração própria (2026).

Com base nessa comparação, adota-se o teste MycoAlert como método primário, devido à sua rapidez e capacidade de detectar microrganismos viáveis, complementado por PCR em situações de resultado inconclusivo ou para confirmação diagnóstica.

A frequência de testagem é definida em pontos críticos do protocolo: (i) estabelecimento do MCB e WCB; (ii) antes de qualquer criopreservação destinada a uso experimental; (iii) a cada 10 passagens em culturas prolongadas; e (iv) obrigatoriamente antes de qualquer aplicação *in vivo*. Esse esquema garante monitoramento contínuo da integridade microbiológica das culturas.

Em caso de resultado positivo, a conduta padrão consiste no descarte da linhagem, devido ao impacto sistêmico da contaminação. Em situações específicas, pode-se considerar tratamento com agentes antimicoplasmáticos, desde que seguido de revalidação completa do cultivo.

5.11. CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA

A caracterização imunofenotípica das USCs segue os critérios mínimos estabelecidos pela *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), que definem células mesenquimais como positivas para CD73, CD90 e CD105 ($\geq 95\%$) e negativas para marcadores hematopoiéticos e imunológicos ($\leq 2\%$) (Dominici *et al.*, 2006). No entanto, a aplicação direta desse painel em felinos apresenta limitações relevantes relacionadas à disponibilidade e à reatividade cruzada de anticorpos.

Estudos em MSCs felinas demonstram que marcadores como CD44 e CD90 apresentam expressão consistente e reprodutível, enquanto CD105 e CD73 apresentam variabilidade significativa devido à limitação de clones comercialmente validados para a espécie (Kim *et al.*, 2017; Voga *et al.*, 2020b). Além disso, o anticorpo anti-HLA-DR humano não apresenta reatividade cruzada confiável com o equivalente felino FLA-DR, componente do complexo MHC classe II (Rideout *et al.*, 1990; Kuwahara *et al.*, 2000). A utilização desse marcador sem validação resulta em falsos negativos e compromete a interpretação do perfil imunofenotípico.

Diante dessas limitações, adota-se neste protocolo um painel imunofenotípico adaptado para a espécie felina, apresentado na Tabela 5, que combina marcadores com

validação experimental em felinos e estratégias complementares para marcadores com limitação técnica.

Tabela 5 - Pannel imunofenotípico ISCT-modificado para USCs felinas

Marcador	Fluorocromo / Clone	Expressão esperada	Observação
CD44	FITC / IM7	Positivo ($\geq 95\%$)	Consistentemente expresso em MSCs felinas
CD90	FITC / 5E10	Positivo ($\geq 95\%$)	Marcador robusto em fMSCs
CD105	APC / SN6 ou 266	Positivo ou variável	Limitação de reatividade cruzada
CD73	PE / AD2	Positivo ou variável	Confirmar por qRT-PCR
CD34	PE / 581	Negativo ($\leq 2\%$)	Marcador hematopoiético
CD45	FITC / F10-89-4	Negativo ($\leq 2\%$)	Clone validado para felinos
CD14	APC / TÜK4	Negativo ($\leq 2\%$)	Monocítico
FLA-DR	—	Negativo ($\leq 2\%$)	Substitui HLA-DR; avaliar por qRT-PCR

Fonte: Elaboração própria (2026).

A substituição do HLA-DR humano por FLA-DR ou, na ausência de anticorpo validado, por análise molecular do mRNA correspondente constitui adaptação metodológica obrigatória para evitar erros de interpretação. Para marcadores com baixa confiabilidade de detecção proteica, como CD73 e CD105, a confirmação por qRT-PCR é incorporada como estratégia complementar, garantindo validação do fenótipo mesenquimal.

O preparo das amostras segue protocolo padronizado: 1×10^6 células são ressuspensas em 100 μL de PBS contendo 2% de SFB, incubadas com anticorpos conjugados por 30 minutos a 4 °C no escuro, lavadas duas vezes e analisadas em citômetro de

fluxo. A aquisição mínima de 10.000 eventos é realizada em gate definido por FSC $\times$ SSC, com compensação espectral previamente calibrada e uso obrigatório de controles isotópicos para cada fluorocromo.

A caracterização imunofenotípica é interpretada em conjunto com os ensaios funcionais de diferenciação trilinear, que permanecem critério indispensável para confirmação da identidade mesenquimal, especialmente em espécies com limitações de reagentes disponíveis (Dominici *et al.*, 2006; Voga *et al.*, 2020a).

5.12. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO TRILINEAR

A capacidade de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica constitui um dos critérios funcionais clássicos para caracterização de células mesenquimais. O presente protocolo baseia-se na metodologia originalmente proposta por Pittenger *et al.* (1999), posteriormente incorporada aos critérios internacionais de caracterização das MSCs, utilizando adaptações atualmente descritas para células-tronco derivadas da urina (USCs) e outros modelos contemporâneos de células mesenquimais (Culenova *et al.*, 2021).

5.12.1. Diferenciação Adipogênica

As USCs são semeadas em densidade de 3×10^4 células/cm² e cultivadas até atingirem pós-confluência (95–100%), condição considerada favorável para o início da adipogênese. A indução é realizada em meio contendo dexametasona (1 μ M), IBMX (0,5 mM), insulina (10 μ g/mL) e indometacina (200 μ M), mantendo-se ciclos alternados de indução e manutenção durante aproximadamente 21 dias. Após o período de diferenciação, as culturas são fixadas em formalina tamponada a 10% e coradas com *Oil Red O*, permitindo a identificação de vacúolos lipídicos intracitoplasmáticos. O protocolo segue o método clássico descrito por Pittenger *et al.* (1999), mantendo concordância com a caracterização experimental de USCs realizada por Culenova *et al.* (2021).

5.12.2. Diferenciação Osteogênica

A indução osteogênica é iniciada quando as culturas atingem aproximadamente 70–80% de confluência, utilizando meio suplementado com dexametasona (0,1 μ M), ácido ascórbico-2-fosfato (50 μ M) e β -glicerofosfato (10 mM), com renovação do meio a cada três

dias. Após cerca de 21 dias, as células são fixadas em etanol 70% e submetidas à coloração por Alizarin Red S, podendo ser complementada por von Kossa para confirmação da mineralização da matriz. O protocolo deriva da metodologia clássica de Pittenger *et al.* (1999) e permanece compatível com protocolos recentes empregados para diferenciação osteogênica de USCs humanas (Culenova *et al.*, 2021).

5.12.3. Diferenciação Condrogênica

A diferenciação condrogênica é conduzida em sistema tridimensional de *pellet* celular, utilizando aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células centrifugadas a $300 \times g$, estratégia originalmente descrita por Johnstone *et al.* (1998) e posteriormente difundida por Mackay *et al.* (1998). O meio de diferenciação contém DMEM de alta glicose suplementado com TGF- β 3 (10 ng/mL), ITS+, ácido ascórbico, prolina e piruvato de sódio. Após 21 a 28 dias, os *pellets* são fixados, incluídos em parafina e corados por Alcian Blue e Safranin O, permitindo a identificação de glicosaminoglicanos e proteoglicanos da matriz cartilaginosa. Estudos mais recentes demonstraram que esse sistema tridimensional permanece o modelo de referência para diferenciação condrogênica de USCs, sendo utilizado inclusive em comparações diretas entre USCs e MSCs derivadas da medula óssea (Sun *et al.*, 2021; Culenova *et al.*, 2021).

5.13. ENSAIO EXPLORATÓRIO E DIFERENCIAÇÃO RENAL

A diferenciação renal específica a partir de USCs é conduzida como ensaio exploratório, uma vez que a indução direta de fenótipos renais maduros sem reprogramação intermediária via iPSCs permanece limitada na literatura. Estudos demonstram que células mesenquimais, incluindo USCs, apresentam capacidade de expressar parcialmente marcadores renais sob estímulo apropriado, refletindo plasticidade fenotípica, porém sem aquisição completa das funções fisiológicas características de túbulos renais ou podócitos maduros (Bento *et al.*, 2020). Os protocolos descritos nesta seção foram adaptados de modelos desenvolvidos principalmente com células humanas e deverão ser interpretados como estratégia de investigação do potencial de diferenciação, e não como protocolo validado para USCs felinas.

5.13.1. *Indução de fenótipo tubular*

Para indução tubular, as USCs são utilizadas entre as passagens P3 e P5 e plaqueadas em placas de seis poços até atingirem aproximadamente 70% de confluência. O meio de indução consiste em DMEM/F-12 suplementado com HGF (50 ng/mL), BMP-7 (100 ng/mL), EGF (10 ng/mL) e activina A (10 ng/mL), mantido por 14 a 21 dias, com renovação do meio a cada 72 horas.

A seleção desses fatores baseia-se em seu papel conhecido durante o desenvolvimento e a regeneração renal. O HGF estimula proliferação e sobrevivência do epitélio tubular; o BMP-7 participa da manutenção do fenótipo epitelial e da inibição da transição epitélio-mesenquimal; o EGF favorece proliferação e organização tubular; e a activina A atua em etapas da diferenciação do mesoderma intermediário e da organogênese renal. Entretanto, as concentrações adotadas correspondem a protocolos desenvolvidos para células humanas e modelos experimentais de diferenciação renal, inexistindo, até o momento, validação específica para USCs felinas. Assim, esses valores devem ser considerados parâmetros iniciais de investigação, sujeitos à otimização experimental.

A validação da indução tubular é realizada por imunofluorescência indireta para E-caderina, ZO-1, aquaporina-1 e citoqueratinas 8/18, complementada por qRT-PCR. A expressão desses marcadores é interpretada como evidência de aquisição parcial de características epiteliais, sem implicar diferenciação funcional completa.

5.13.2. *Indução de fenótipo podocitário*

A indução podocitária é baseada em protocolos originalmente desenvolvidos para células humanas, utilizando DMEM/F-12 suplementado com SFB a 1,25%, vitamina D3 (100 nM) e ácido retinoico all-trans (ATRA), mantidos durante aproximadamente dez dias.

A vitamina D3 e o ATRA participam da regulação da expressão de genes envolvidos na diferenciação glomerular e na maturação de podócitos em modelos experimentais. Protocolos contemporâneos de diferenciação renal também empregam BMP-7, activina A e ácido retinoico em diferentes etapas da especificação podocitária, confirmando a importância biológica desses fatores. Contudo, ainda não existem estudos que validem essas concentrações especificamente para USCs felinas, razão pela qual o presente protocolo deve ser entendido como extrapolação fundamentada em evidências obtidas com células humanas.

A diferenciação é avaliada por imunofluorescência para nefrina (NPHS1), podocina (NPHS2), WT1, sinaptopodina (SYNPO) e podocalixina (PODXL), complementada pela análise da expressão gênica por qRT-PCR. A presença desses marcadores indica aquisição parcial do fenótipo podocitário, sem demonstrar funcionalidade equivalente à observada em podócitos maduros *in vivo*.

5.13.3. Interpretação dos resultados

Os resultados obtidos nesta etapa são interpretados como indicativos de plasticidade fenotípica renal, e não como evidência de diferenciação completa em células funcionais equivalentes a túbulos ou podócitos maduros. A ausência de organização tridimensional completa, integração funcional e resposta fisiológica compatível com tecido renal nativo limita a aplicação direta dessas células como substitutos celulares.

A separação entre identidade e função evita extrapolações indevidas sobre capacidade terapêutica baseada apenas em expressão de marcadores. Assim, os achados desta seção são utilizados como suporte experimental para a hipótese de memória epigenética renal das USCs, complementando a caracterização molecular e funcional proposta no estudo (Bento *et al.*, 2020).

5.14. ANÁLISE DO SECRETOMA E VESÍCULAS EXTRACELULARES

Esta etapa metodológica descreve os procedimentos bioanalíticos padronizados para a obtenção, quantificação e caracterização do produto secretado pelas células, elemento central para a comprovação de seu efeito parácrino.

5.14.1. Coleta e processamento do meio condicionado

A obtenção do secretoma é realizada a partir de USCs entre as passagens P3 e P5, cultivadas em frascos T-75 até atingirem 80 a 90% de confluência. A definição da confluência como critério operacional, em substituição à densidade celular absoluta, baseia-se em evidências de que esse parâmetro reflete de forma mais fiel o estado fisiológico da cultura, garantindo atividade secretora homogênea e reduzindo variabilidade experimental (Jiang *et al.*, 2016; Eirin; Lerman, 2021). Culturas subconfluentes apresentam secreção inconsistente,

enquanto culturas hiperconfluentes entram em estado de estresse ou apoptose, comprometendo a qualidade do secretoma.

Após atingir a confluência desejada, o meio completo é removido e a monocamada submetida a três lavagens sequenciais com PBS 1× sem cálcio e magnésio, pré-aquecido a 37 °C. Essa etapa é crítica para remoção de resíduos de SFB, cuja presença introduz vesículas extracelulares de origem bovina que interferem diretamente nas análises subsequentes (Théry *et al.*, 2018). Os volumes de PBS são ajustados conforme o tipo de frasco, garantindo cobertura completa da superfície sem descolamento celular.

Em seguida, adiciona-se meio DMEM/F-12 sem SFB e sem fenol vermelho, e as células são mantidas por 48 horas em incubação padrão. Esse intervalo representa o compromisso ideal entre rendimento e viabilidade celular, evitando a indução de apoptose associada à privação prolongada de fatores tróficos (Jiang *et al.*, 2016).

O meio condicionado é coletado e submetido a clarificação sequencial por centrifugação a 4 °C: inicialmente a 300 × g por 10 minutos para remoção de células intactas, seguido de 2.000 × g por 20 minutos para eliminação de células mortas e detritos. O sobrenadante obtido é então processado de acordo com a finalidade analítica. Para análise de fatores solúveis, realiza-se concentração por ultrafiltração com membranas de 10 kDa; para enriquecimento de vesículas extracelulares, utilizam-se membranas de 100 kDa. As amostras são armazenadas a -80 °C em alíquotas únicas, evitando ciclos repetidos de congelamento e descongelamento que comprometem a integridade proteica.

5.14.2. Análise de fatores tróficos por ELISA

A quantificação de fatores tróficos é realizada por ensaio ELISA do tipo sandwich, em triplicata técnica, incluindo curva padrão, branco de matriz e controles positivos. São analisados fatores-chave associados à regeneração renal e atividade parácrina de MSCs, incluindo VEGF, HGF e IGF-1, cuja relevância é amplamente documentada no contexto de lesão renal (Eirin; Lerman, 2021; Franco *et al.*, 2022).

Devido à utilização de kits desenvolvidos para proteínas humanas, a validação de reatividade cruzada em matriz felina é obrigatória. Para isso, realiza-se ensaio de *spike-and-recovery*, no qual padrões recombinantes são adicionados ao meio condicionado e a recuperação é considerada aceitável quando situada entre 80 e 120%. Resultados fora dessa faixa são considerados não confiáveis para interpretação quantitativa.

Os dados são expressos em múltiplas formas de normalização, pg/mL, pg/mg de proteína total e pg/10⁶ células/24 h, permitindo comparação entre amostras com diferentes densidades celulares e condições de cultivo.

5.14.3. Isolamento de exossomos por ultracentrifugação

O isolamento de exossomos segue o protocolo de ultracentrifugação diferencial descrito nas diretrizes MISEV2018 (Théry *et al.*, 2018), considerado padrão-ouro para obtenção de vesículas com alta pureza. Todas as etapas são conduzidas a 4 °C, condição indispensável para preservação da integridade estrutural e funcional das vesículas.

A sequência de centrifugações progressivas permite separação baseada em tamanho e densidade: remoção de células, seguida de detritos, microvesículas e, finalmente, pelletização de exossomos em ultracentrifugação a 100.000 × g. Uma etapa adicional de lavagem com PBS é realizada para remover proteínas co-sedimentadas, aumentando a pureza da preparação.

A escolha do rotor influencia diretamente a qualidade do isolamento. Rotores do tipo swinging bucket proporcionam melhor separação por densidade e maior pureza, enquanto rotores de ângulo fixo permitem maior rendimento com menor tempo de processamento, porém com maior contaminação proteica. Neste protocolo, prioriza-se o uso de rotor swinging bucket, alinhado às recomendações da MISEV2018.

5.14.4. Caracterização de vesículas por NTA e Western Blot

A caracterização das vesículas extracelulares segue abordagem multimodal, combinando análise física e molecular. A análise por *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) permite determinar tamanho e concentração de partículas individuais, sendo esperado perfil entre 30 e 150 nm para exossomos. A utilização de padrões calibrados e controle negativo é obrigatória para validação da análise.

A caracterização proteica por *Western Blot* segue os critérios da MISEV2018, exigindo a demonstração simultânea de marcadores positivos e negativos. São utilizados marcadores transmembrana (CD63, CD81), proteínas citosólicas associadas a vesículas (TSG101) e marcador negativo (calnexina), cuja ausência confirma a ausência de contaminação por organelas intracelulares.

Um ponto crítico é a condição de eletroforese das tetraspaninas. Essas proteínas requerem condições não redutoras para manutenção de suas pontes dissulfeto e

reconhecimento pelos anticorpos; protocolos convencionais com agentes redutores resultam em falso-negativo, comprometendo a caracterização.

5.14.5. Protocolo alternativo, precipitação por polímero

Como alternativa à ultracentrifugação, especialmente em contextos com limitação de infraestrutura, podem ser utilizados kits de precipitação por polímero. Esses métodos apresentam maior rendimento e menor necessidade de equipamento especializado, porém à custa de menor pureza, devido à co-precipitação de proteínas solúveis e outros componentes não vesiculares.

A comparação entre as abordagens demonstra que a ultracentrifugação permanece superior para análises que exigem alta pureza, como proteômica, enquanto os métodos de precipitação são adequados para triagem inicial ou aplicações com menor exigência analítica. Essa distinção é fundamental para evitar interpretações equivocadas de dados derivados de preparações com diferentes níveis de pureza (Théry *et al.*, 2018; Kosanović *et al.*, 2023).

5.15. APLICAÇÃO TERAPÊUTICA IN VIVO

A estruturação da fase translacional clínica deste protocolo visa converter os achados biológicos de bancada em aplicação prática, estabelecendo as diretrizes de segurança, posologia e monitoramento na espécie felina.

5.15.1. Critérios de seleção de doadores

Os doadores destinados ao lote alogênico são gatos hígidos, entre 1 e 7 anos, sem histórico de doença renal, urinária ou sistêmica crônica, condição confirmada por creatinina sérica, SDMA e relação proteína:creatinina urinária dentro dos intervalos de referência (IRIS, 2023). A Resolução CFMV nº 1363/2020 não disciplina triagem de doador, origem celular ou rastreabilidade, de modo que a triagem sorológica segue, por analogia, as diretrizes de consenso para doadores felinos de sangue, que exigem exclusão de animais positivos para FeLV e FIV e triagem para hemoplasmas (Taylor *et al.*, 2021). Exige-se ainda urocultura negativa, dado que infecção urinária ativa compromete a segurança microbiológica do lote e o estabelecimento da cultura primária. A RDC ANVISA nº 508/2021, aplicável a células humanas, é utilizada apenas como referência de boas práticas de rastreabilidade. Cada doador

é vinculado ao respectivo lote pelo sistema descrito em 5.9, e sua participação depende de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido próprio, distinto do firmado pelos tutores dos receptores, conforme 5.16. Não se adota tipagem de histocompatibilidade, em razão da baixa imunogenicidade atribuída às células mesenquimais e da ausência de eventos adversos imunomediados nos estudos alogênicos felinos citados (Quimby *et al.*, 2013; Quimby *et al.*, 2016; Zacharias *et al.*, 2021).

5.15.2. Critérios de seleção de receptores

São incluídos gatos adultos a idosos (≥ 7 anos), de ambos os sexos, com diagnóstico confirmado de Doença Renal Crônica (DRC) nos estágios IRIS 2 e 3, definidos por creatinina sérica entre 1,6 e 5,0 mg/dL e SDMA entre 18 e 38 $\mu\text{g/dL}$, conforme classificação da *International Renal Interest Society* (IRIS, 2023). Os animais devem apresentar estabilidade clínica por período mínimo de 2 a 4 semanas, caracterizada por variação inferior a 20% nos níveis de creatinina, assegurando ausência de injúria renal aguda sobreposta.

Condições frequentemente associadas à DRC, como proteinúria ($\text{UPC} > 0,4$) e hipertensão arterial sistêmica (pressão arterial sistólica > 160 mmHg), devem estar previamente controladas por terapia convencional, evitando viés na avaliação de eficácia terapêutica (Quimby; Borjesson, 2018).

A inclusão no estudo ocorre mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em conformidade com a regulamentação do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV nº 1321/2020).

São excluídos animais em estágio IRIS 4, devido ao caráter terminal e baixa responsividade a terapias regenerativas; portadores de neoplasias ativas, pela potencial interação com mecanismos proliferativos das MSCs (Voga *et al.*, 2020b); animais positivos para FIV/FelV em fase ativa; casos de peritonite infecciosa felina (PIF) descompensada; coagulopatias; instabilidade hemodinâmica; e fêmeas gestantes ou lactantes.

5.15.3. Vias de administração

São consideradas duas vias de administração, com diferentes níveis de complexidade e evidência experimental. A via intravenosa periférica constitui a abordagem de primeira escolha, sendo realizada por cateter 22G em veia cefálica ou safena, com infusão lenta da

suspensão celular em 5 a 10 mL de solução fisiológica ao longo de 10 a 15 minutos, sob monitoramento clínico contínuo. Essa via apresenta perfil de segurança bem estabelecido e eficácia moderada em estudos clínicos envolvendo felinos com doença renal crônica (Quimby *et al.*, 2013; Quimby *et al.*, 2016; Zacharias *et al.*, 2021).

Embora a administração intravenosa resulte em retenção inicial predominante das células na circulação pulmonar (first-pass pulmonar), com mais de 80% das MSCs permanecendo temporariamente nos pulmões e menos de 5% alcançando diretamente o tecido renal, evidências atuais demonstram que os benefícios terapêuticos não dependem exclusivamente da quantidade de células que migram para o rim. A liberação sistêmica de fatores parácrinos e vesículas extracelulares permite que mesmo a reduzida fração de células recrutadas para o microambiente renal exerça efeitos imunomoduladores, antiapoptóticos e antifibróticos. Além disso, o perfil de segurança, a simplicidade técnica e a menor taxa de complicações justificam a manutenção da via intravenosa como padrão inicial para protocolos clínicos em medicina veterinária (Yu *et al.*, 2026).

Considera-se também a via intra-arterial seletiva renal, que representa uma abordagem avançada, realizada por cateterização guiada por fluoroscopia com acesso pela artéria femoral ou carótida, permitindo a entrega direta das células ao parênquima renal. Estudos experimentais demonstram que essa estratégia pode elevar o recrutamento celular para aproximadamente 15% a 20%, aumentando a retenção local e potencialmente intensificando os efeitos biológicos do tratamento. Entretanto, esse benefício ocorre às custas de maior complexidade técnica, necessidade de radiologia intervencionista, maior risco de complicações vasculares e ausência de protocolos padronizados quanto à dose, velocidade de infusão e critérios de indicação clínica. Sua utilização permanece, portanto, restrita a centros especializados e protocolos experimentais, não sendo atualmente recomendada como via de rotina para pacientes felinos com doença renal crônica (Thomson *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2026).

5.15.4. Dose celular e frequência de aplicação

A dose padrão adotada é de 2×10^6 células/kg por aplicação, alinhada aos protocolos clínicos previamente validados em felinos com DRC (Quimby *et al.*, 2013; Quimby *et al.*, 2016). Ambos os estudos, assim como Zacharias *et al.* (2021), empregaram produtos alogênicos, compatíveis com o produto adotado na fase de aplicação terapêutica. Alternativamente, pode-se utilizar dose fixa de 3×10^7 células por animal, conforme estudo de

Zacharias *et al.* (2021), que demonstrou melhora sustentada da função renal em parcela significativa dos animais tratados.

A administração é realizada em regime de doses repetidas, com duas a três aplicações em intervalos de 14 dias. Esse esquema baseia-se na evidência de que a ação das MSCs é predominantemente parácrina e transitória, sendo potencializada por reaplicações seriadas (Quimby; Borjesson, 2018; Eirin; Lerman, 2021).

5.15.5. Parâmetros clínicos de avaliação de eficácia

A avaliação clínica é conduzida de forma longitudinal nos tempos T0 (pré-tratamento), T1 (15 dias), T2 (30 dias), T3 (60 dias), T4 (90 dias) e T5 (180 dias).

São monitorados parâmetros clínicos globais, incluindo peso corporal, escore de condição corporal (ECC), escore de massa muscular, ingestão alimentar, consumo hídrico, frequência de vômitos e sinais urinários. A pressão arterial sistólica é aferida por método Doppler ou oscilométrico. A qualidade de vida é avaliada por instrumento padronizado aplicado ao tutor, reconhecendo-se a importância de desfechos clínicos subjetivos na avaliação de terapias regenerativas em medicina veterinária (Quimby; Borjesson, 2018).

5.15.6. Biomarcadores séricos e urinários

Os biomarcadores laboratoriais são avaliados nos mesmos tempos clínicos e apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Biomarcadores séricos e urinários monitorados

Biomarcador	Meio	Faixa de referência felina	Relevância
Creatinina	Sangue	< 1,6 mg/dL	Estadiamento IRIS
Ureia	Sangue	15–60 mg/dL	Função renal
SDMA	Sangue	< 14 µg/dL	Marcador precoce de TFG
Fósforo	Sangue	2,7–6,3 mg/dL	Progressão da DRC
Cálcio total/ionizado	Sangue	8,5–10,5 mg/dL	Distúrbio mineral
Potássio	Sangue	3,5–5,5 mEq/L	Hipocalemia

Hemograma	Sangue	—	Anemia renal
FGF-23	Sangue	Referência laboratorial	Progressão e mortalidade
UPC	Urina	< 0,2	Proteinúria
Densidade urinária	Urina	> 1,035	Capacidade tubular
Urinálise tipo I	Urina	—	Avaliação global

Fonte: Elaboração própria (2026).

A inclusão de biomarcadores como SDMA e FGF-23 amplia a sensibilidade diagnóstica e prognóstica, refletindo alterações precoces da função renal e do metabolismo mineral (IRIS, 2023; Franco *et al.*, 2022).

5.15.7. Avaliação histopatológica renal

A análise histopatológica é restrita aos animais com indicação clínica de biópsia renal ou às amostras obtidas em contexto de necropsia. A biópsia é realizada por técnica percutânea ecoguiada, utilizando agulha Tru-Cut semiautomática de 18 G, buscando equilibrar qualidade diagnóstica e segurança do procedimento. A opção por dispositivos semiautomáticos fundamenta-se nas recomendações atuais da medicina felina, que desaconselham o emprego de dispositivos automáticos em gatos devido ao risco de reações vagais graves previamente descritas, sem que complicações semelhantes tenham sido relatadas para dispositivos semiautomáticos. Embora a evidência original derive de estudos sobre biópsia hepática, essa recomendação vem sendo incorporada às revisões contemporâneas de procedimentos ultrassonográficos em felinos e adotada como medida geral de segurança para biópsias percutâneas (Proot; Rothuizen, 2006).

São obtidos dois a três fragmentos corticais sob anestesia geral, com monitoramento clínico e ultrassonográfico durante 12 a 24 horas após o procedimento, considerando que hemorragia perirrenal, hematúria transitória e outras complicações hemorrágicas representam os eventos adversos mais frequentemente descritos após biópsia renal em cães e gatos. As análises histológicas incluem:

- Hematoxilina-eosina (arquitetura geral);
- Tricrômio de Masson (fibrose intersticial);
- PAS (membranas basais);

- Prata de Jones (estrutura glomerular).

A quantificação segue o escore IFTA (fibrose intersticial e atrofia tubular) e o percentual de glomeruloesclerose, parâmetros amplamente utilizados na avaliação da progressão da doença renal crônica (Vidane *et al.*, 2017; Zacharias *et al.*, 2021).

5.16. VALIDAÇÃO CIENTÍFICA DO DESENHO PROPOSTO

A proposta apresentada configura um estudo de viabilidade e, como tal, requer que sejam explicitados os elementos que permitirão avaliar objetivamente seus resultados. O desfecho primário proposto é a taxa de sucesso do isolamento e da expansão de USCs a partir de urina de gatos com doença renal crônica, definida como a obtenção de cultura viável que atinja a passagem 3 mantendo os critérios de identidade estabelecidos. Como desfechos secundários, consideram-se o rendimento clonogênico por volume processado, o tempo de duplicação populacional, a estabilidade imunofenotípica ao longo das passagens e a concentração dos mediadores selecionados no secretoma.

O dimensionamento amostral deverá ser calculado a partir da taxa de sucesso observada em estudos com USCs caninas, única referência disponível em espécie de companhia, admitindo-se que a estimativa é preliminar e deverá ser recalculada após os primeiros isolamentos. Para a fase laboratorial, propõe-se delineamento comparativo entre os parâmetros declarados como variáveis de padronização, com replicação técnica mínima de três ensaios independentes por condição.

Para a fase de aplicação terapêutica, o desenho prevê grupo-controle recebendo o veículo de infusão sem células, com alocação aleatória dos animais por sequência gerada computacionalmente e cegamento do avaliador responsável pela mensuração dos desfechos clínicos e laboratoriais, procedimento que reduz o risco de viés de aferição sem comprometer a segurança do paciente. A análise estatística contemplará testes de comparação entre grupos apropriados à distribuição dos dados, com nível de significância de 5%, e análise de medidas repetidas para os parâmetros acompanhados ao longo dos momentos T0 a T5.

O registro de efeitos adversos seguirá protocolo padronizado, com avaliação clínica nas primeiras 24 horas após cada infusão e monitoramento subsequente nos retornos programados, contemplando reações relacionadas à infusão, alterações hemodinâmicas, sinais de tromboembolismo pulmonar e qualquer deterioração da função renal superior à esperada pela progressão natural da enfermidade. Todo evento adverso será classificado quanto à

gravidade e à relação de causalidade com o procedimento, e comunicado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) responsável.

5.17. ASPECTOS ÉTICOS E REGULATÓRIOS

O protocolo experimental é previamente submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG), *Campus Bambuí*, com registro obrigatório no Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA/CONCEA), em conformidade com a Lei nº 11.794/2008 (Lei Arouca) e o Decreto nº 6.899/2009, que regulamentam o uso científico de animais no Brasil.

A condução do estudo segue rigorosamente os princípios dos 3Rs (*Replacement, Reduction e Refinement*). O princípio da substituição (*Replacement*) é aplicado por meio da priorização de etapas laboratoriais *in vitro*, incluindo cultivo celular e análise de secretoma, reduzindo a dependência de modelos animais. O princípio da redução (*Reduction*) orienta o dimensionamento amostral mínimo necessário para obtenção de significância estatística. O refinamento (*Refinement*) é implementado por meio da adoção de técnicas que minimizam dor, estresse e desconforto, incluindo sedação prévia, manejo gentil, ambiente controlado e definição clara de pontos de desfecho humanitário.

A proposta atende integralmente à Resolução CFMV nº 1363, de 22 de outubro de 2020, que define orientações para a terapia com células-tronco em animais, estabelecendo que sua indicação, prescrição e uso constituem atividade privativa do médico-veterinário, devendo estar fundamentados em evidências técnico-científicas de segurança e eficácia, com definição da dose e da via de administração, bem como na utilização de equipamentos, produtos e materiais devidamente registrados nos órgãos competentes.

Adicionalmente, a Resolução CFMV nº 1275/2019 é observada quanto às condições estruturais e operacionais do laboratório veterinário, enquanto a Resolução CFMV nº 1321/2020 fundamenta a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) junto aos tutores dos animais participantes. Como o protocolo envolve dois grupos distintos de animais, adotam-se dois termos independentes: um dirigido aos tutores dos doadores, que informa sobre a cistocentese e a triagem exigida, e outro dirigido aos tutores dos receptores, que informa sobre a infusão e os riscos associados.

Embora voltada à terapia celular humana, a RDC ANVISA nº 508/2021 é adotada como referência técnica subsidiária para garantir padrões elevados de rastreabilidade, controle de qualidade e boas práticas laboratoriais. O laboratório encontra-se regularmente inscrito no

Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais (CRMV-MG), conforme a Resolução CFMV nº 1041/2013. As atividades laboratoriais são conduzidas em ambiente de biossegurança nível 2 (NB-2), seguindo as diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Saúde (2006) para laboratórios biomédicos.

5.18. LIMITAÇÕES DO PROTOCOLO

A presente proposta apresenta limitações metodológicas inerentes ao estado atual da literatura e às especificidades da aplicação clínica de terapias celulares em felinos, as quais são explicitamente reconhecidas para adequada interpretação dos resultados.

A primeira limitação refere-se à disponibilidade restrita de anticorpos monoclonais validados para a espécie felina, especialmente para marcadores clássicos da *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), como CD73, CD105 e moléculas do complexo maior de histocompatibilidade classe II (FLA-DR). Essa lacuna impõe a adoção de um painel imunofenotípico adaptado e a utilização complementar de técnicas moleculares, como qRT-PCR, para confirmação da expressão gênica. Tal limitação é amplamente discutida na literatura, que enfatiza a necessidade de critérios mais inclusivos e adaptáveis para caracterização de células-tronco mesenquimais em espécies não humanas (Wright *et al.*, 2021; Voga *et al.*, 2020a).

A segunda limitação está relacionada ao volume urinário reduzido obtido por cistocentese em felinos, tipicamente entre 5 e 15 mL por coleta. Esse fator impacta diretamente o rendimento celular, uma vez que estudos clássicos em humanos demonstram maior eficiência clonogênica com volumes substancialmente superiores (100–200 mL) (Bharadwaj *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2013). Como consequência, torna-se necessária a adoção de coletas seriadas, o que aumenta a complexidade logística e pode introduzir variabilidade biológica adicional.

A terceira limitação diz respeito à natureza ainda exploratória da diferenciação renal direta a partir de USCs sem reprogramação prévia via células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). Embora protocolos recentes demonstrem expressão de marcadores renais específicos, os resultados geralmente refletem diferenciação parcial e não correspondem a funcionalidade fisiológica completa, devendo ser interpretados como evidência de plasticidade celular e não como equivalência funcional a tecidos renais maduros (Zhou *et al.*, 2022).

A quarta limitação envolve a utilização de kits de ELISA desenvolvidos para proteínas humanas em matriz biológica felina. A reatividade cruzada desses ensaios nem sempre é

plenamente validada, podendo comprometer a acurácia quantitativa. Essa limitação é parcialmente mitigada pela implementação obrigatória de testes de validação analítica, como ensaios de *spike-and-recovery*, conforme boas práticas em análise de secretoma e biomarcadores (Eirin; Lerman, 2021).

Resta a limitação decorrente do número ainda reduzido de estudos clínicos controlados em medicina veterinária envolvendo terapia celular para doença renal crônica felina. Embora existam evidências promissoras quanto à segurança e ao potencial terapêutico de MSCs e seus derivados (Quimby *et al.*, 2013; Quimby *et al.*, 2016; Thomson *et al.*, 2019; Zacharias *et al.*, 2021; Vidane *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2025; Yu *et al.*, 2026), a maior parte dos estudos apresenta casuísticas reduzidas, protocolos heterogêneos e tempo de acompanhamento limitado. A presente proposta deve ser compreendida, assim, como um modelo teórico-metodológico destinado a subsidiar futuras investigações experimentais e clínicas, cujo potencial de aplicação dependerá da validação em estudos prospectivos, controlados, multicêntricos e com acompanhamento em longo prazo.

Uma limitação adicional refere-se ao efeito da condição clínica do doador sobre as células obtidas na fase de padronização: como discutido em 3.5.5, a literatura diverge e nenhum estudo disponível foi conduzido com USCs felinas. A indefinição não alcança a fase de aplicação terapêutica, que utiliza doadores hígidos, mas incide sobre a interpretação dos parâmetros de rendimento, proliferação e potência obtidos na padronização, os quais devem ser lidos como característicos da matriz nefropata.

Cabe explicitar uma tensão entre a justificativa e o desenho operacional da proposta. A menor invasividade da coleta urinária é apresentada como vantagem das USCs frente às fontes convencionais, e essa comparação permanece válida quando se contrasta a cistocentese com a aspiração de medula óssea ou com procedimentos cirúrgicos para obtenção de tecido adiposo. Entretanto, o protocolo prevê coletas seriadas, com três a seis punções em intervalos de 48 a 72 horas até acumular volume suficiente, além de contenção química com gabapentina ou trazodona e, quando necessário, sedação com butorfanol e midazolam. O somatório desses procedimentos reduz, na prática, a diferença de invasividade em relação a uma coleta única de outra fonte. Reconhece-se, portanto, que a vantagem não reside na ausência de invasividade, mas na natureza do procedimento: a cistocentese é tecnicamente mais simples, dispensa incisão cirúrgica, apresenta menor morbidade e, sobretudo, é repetível sem comprometer progressivamente o paciente, o que não ocorre com aspirados medulares sucessivos. Ainda assim, a otimização do volume necessário por coleta, de modo a reduzir o número de punções, constitui um dos pontos que a fase de padronização deverá determinar.

6. APLICABILIDADE CLÍNICA E *ONE HEALTH*

A aplicação clínica das células-tronco mesenquimais derivadas da urina (USCs) na medicina felina foca na modulação ativa do microambiente renal cronicamente lesionado, visando retardar a progressão da doença por meio da atenuação inflamatória e do eixo antifibrótico mediado pela proteína Klotho. Como complemento essencial às terapias de suporte clínico convencionais, as USCs atuam nos mecanismos fisiopatológicos subjacentes da doença renal crônica (DRC). Embora as fontes mesenquimais tradicionais, como o tecido adiposo e a medula óssea, possuam base experimental mais ampla e estudos *in vivo* já estabelecidos em felinos, a coleta minimamente invasiva, a alta capacidade proliferativa e a coerência biológica com o sistema nefrourológico justificam fortemente a investigação sistemática das USCs como alternativa terapêutica viável (Yu *et al.*, 2026; Chen *et al.*, 2023).

Apesar desse racional promissor, a transição da bancada para a prática veterinária exige a superação de desafios logísticos e operacionais significativos. A viabilidade clínica da terapia celular esbarra em limitações relacionadas à padronização dos protocolos de isolamento, ao tempo necessário para expansão *in vitro*, à variabilidade biológica intrínseca entre doadores e à baixa taxa de integração funcional e biodistribuição das células no tecido-alvo (Atay; Boysen; Nørregaard, 2026). Para contornar esses obstáculos logísticos e econômicos, o desenvolvimento de bancos de células criopreservadas e a exploração de plataformas de terapias acelulares, fundamentadas no secretoma e em vesículas extracelulares, despontam como as estratégias mais seguras e escaláveis para o futuro da nefrologia veterinária (Yin *et al.*, 2022; Kosanović *et al.*, 2023).

Por fim, a investigação das USCs na DRC felina integra-se à perspectiva *One Health*. O rim felino geriátrico acometido pela enfermidade compartilha eixos patológicos fundamentais com a nefropatia humana, destacando-se a severa redução da expressão endógena de Klotho e a progressão fibrótica crônica (Spencer; Wheeler-Jones; Elliott, 2020). Consequentemente, a espécie felina representa um modelo biológico comparativo de altíssimo valor. Os avanços metodológicos na padronização e aplicação clínica de USCs em gatos transcendem o benefício exclusivo à medicina veterinária, gerando dados práticos e experimentais que podem retroalimentar diretamente o desenvolvimento de terapias celulares aplicadas à nefrologia humana (Yin *et al.*, 2022).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pergunta que orientou este trabalho foi se as evidências científicas atuais sustentam as células-tronco mesenquimais derivadas da urina como fonte teoricamente mais adequada, viável e biologicamente coerente do que as fontes tradicionais para aplicação na doença renal crônica felina. A resposta que a análise permite é parcial e precisa ser enunciada com essa exata delimitação: as evidências sustentam a plausibilidade biológica da proposta e justificam sua investigação experimental, mas não sustentam, no estado atual da literatura, qualquer afirmação de superioridade terapêutica. Não sustentam superioridade porque a evidência disponível é majoritariamente humana ou obtida em modelos não felinos, porque inexistente estudo que tenha isolado ou caracterizado USCs na espécie felina, e porque nenhuma comparação experimental direta entre fontes celulares foi conduzida nesse contexto. A conclusão principal é, portanto, a existência de hipótese terapêutica cientificamente fundamentada que necessita avançar para etapas específicas de validação experimental na espécie.

O percurso argumentativo do trabalho sustenta essa conclusão em três apoios encadeados. O primeiro é o deslocamento conceitual que reposicionou as MSCs como plataformas de sinalização parácrina, e não como fonte de reposição estrutural. O segundo é a demonstração de que a origem tecidual condiciona o repertório secretório, o que confere sentido biológico à busca por uma fonte nefrourológica. O terceiro é a evidência molecular de que as USCs expressam α -Klotho em níveis elevados e que essa proteína participa funcionalmente de sua ação antifibrótica, o que converte a hipótese da organoespecificidade em proposição verificável.

Quanto aos parâmetros de maior viabilidade de implementação, a análise identificou que as etapas de coleta, isolamento, cultivo primário e expansão apoiam-se em parâmetros majoritariamente extrapoláveis e podem ser executadas com infraestrutura convencional de cultivo celular, enquanto a caracterização de vesículas extracelulares e os ensaios de potência dependem de estrutura especializada e constituem as etapas de maior exigência técnica. Para que essa possibilidade avance em direção à prática veterinária, será necessário estabelecer protocolos reprodutíveis de isolamento, expansão e caracterização, além de determinar segurança, dose, via de administração e critérios objetivos de resposta. É essa lacuna operacional que o protocolo apresentado no Capítulo 5 pretende reduzir.

Os futuros estudos deverão aproximar-se das condições reais da doença, incluindo animais em diferentes estágios, possíveis interferências da idade e das comorbidades, duração

da resposta e repercussões sobre parâmetros clínicos relevantes. Mais do que identificar alterações laboratoriais isoladas, será importante verificar se a intervenção produz efeitos consistentes sobre progressão da doença, estabilidade clínica e qualidade de vida.

7.1. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A principal limitação deste estudo relaciona-se à sua natureza teórica. Apesar de fundamentado em literatura atual e em análise crítica dos dados disponíveis, o trabalho não apresenta validação experimental própria. As conclusões devem, portanto, ser interpretadas como indicativas de plausibilidade biológica, e não como comprovação direta de eficácia ou segurança.

Outra limitação refere-se à heterogeneidade da literatura analisada. Os estudos disponíveis apresentam diferenças significativas quanto à espécie, fonte celular, metodologias empregadas e desfechos avaliados, o que dificulta comparações diretas e exige raciocínio baseado na convergência de mecanismos biológicos, em vez de uniformidade de resultados.

Há ainda a necessidade de extrapolação de dados provenientes de estudos em humanos e em modelos não felinos. Embora comum em pesquisas dessa natureza, essa abordagem implica riscos de simplificação, uma vez que resposta imunológica, progressão da doença e comportamento celular podem variar entre espécies. A limitação é particularmente relevante no caso das USCs, cuja aplicação em felinos permanece pouco explorada, e alcança parâmetros específicos do protocolo proposto, conforme registrado ao longo do Capítulo 5.

7.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

O desdobramento natural deste trabalho é a realização de estudos experimentais e clínicos direcionados à espécie felina. Investigações que avaliem isolamento, caracterização e aplicação terapêutica dessas células em modelos de doença renal crônica serão fundamentais para determinar sua aplicabilidade real, preferencialmente em desenho comparativo com outras fontes de MSCs, com casuística ampliada e seguimento prolongado.

Outra perspectiva envolve o desenvolvimento de terapias acelulares baseadas no secretoma e em vesículas extracelulares. Essa estratégia pode minimizar limitações associadas ao uso de células viáveis, como variabilidade biológica e desafios de padronização, mantendo os efeitos terapêuticos desejados sobre modulação inflamatória e controle da fibrose. Uma

lacuna específica a ser preenchida é a caracterização quantitativa e funcional do secretoma após criopreservação, discutida em 5.9.

Em horizonte mais amplo, as células derivadas da urina podem ser exploradas em engenharia tecidual, desenvolvimento de organoides e medicina personalizada. Sua obtenção minimamente invasiva e o potencial autólogo, ainda condicionado à definição do efeito da condição do doador conforme discutido em 3.5.5, favorecem a construção de modelos individualizados e estratégias terapêuticas direcionadas. A comparação direta entre produtos autólogos e alogênicos, avaliando rendimento, potência secretória e resposta clínica, permanece questão experimental em aberto. Essas células não representam, assim, apenas alternativa terapêutica, mas plataforma versátil com potencial de integração entre biologia renal, inovação tecnológica e medicina regenerativa.

Em veredito, o produto deste trabalho é um protocolo laboratorial integrado, tecnicamente executável e explicitamente classificado quanto ao grau de sustentação de cada parâmetro, acompanhado do modelo conceitual que o fundamenta. A análise comparativa realizada permite afirmar que existe plausibilidade biológica suficiente para justificar a investigação experimental das USCs na doença renal crônica felina, e não permite afirmar eficácia ou segurança, que dependem de verificação ainda inexistente para a espécie. O trabalho entrega, portanto, um caminho delimitado: identifica onde a literatura converge, onde diverge, o que pode ser extrapolado e o que precisa ser testado. É essa delimitação, e não uma promessa terapêutica, que constitui sua contribuição.

8. REFERÊNCIAS

- AFONSO, Gonçalo José Martins *et al.* Advancing urine-derived stem cells: Cryopreservation validation and sex-specific metabolism. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 56, n. 1, p. e70172, 2026. DOI: 10.1111/eci.70172. Acesso em: 05 jul. 2026.
- ALMERIA, C.; KREß, S.; WEBER, V.; EGGER, D.; KASPER, C. Heterogeneity of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles is highly impacted by the tissue/cell source and culture conditions. **Cell & Bioscience**, v. 12, art. 51, 2022. DOI: 10.1186/s13578-022-00786-7. Acesso em: 08 mai. 2026.
- ATAY, Jasmine C. L.; BOYSEN, Anders Toftegaard; NØRREGAARD, Rikke. Urine-derived stem cells in kidney disease: progress, challenges, and future directions. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 17, art. 211, 2026. DOI: 10.1186/s13287-026-05040-2. Acesso em: 26 jun. 2026.
- BENTO, G.; SHAFIGULLINA, A. K.; RIZVANOV, A. A.; SARDÃO, V. A.; MACEDO, M. P.; OLIVEIRA, P. J. Urine-Derived Stem Cells: Applications in Regenerative and Predictive Medicine. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 573, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/3/573>. Acesso em: 17 abr. 2026.
- BHARADWAJ, S. *et al.* Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology. **Stem Cells**, v. 31, n. 9, p. 1840–1856, 2013. Disponível em: <https://academic.oup.com/stmcls/article-abstract/31/9/1840/6448011>. Acesso em: 08 mai. 2026.
- BIRTWISTLE, L.; CHEN, X.-M.; POLO, J. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles to the Rescue of Renal Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6596, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/12/6596>. Acesso em: 17 abr. 2026.
- BOYSEN, A. T. *et al.* Urine-derived stem cells: a robust platform for generating native or engineered autologous extracellular vesicles. **Research Square**, 2024. Disponível em: <https://assets-eu.researchsquare.com/files/rs-4664301/v1/14e1a9fc-c998-4fb7-bf93-97f1142587c1.pdf>. Acesso em: 19 mai. 2026.
- BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 out. 2008.
- BRASIL. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jul. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 508, de 27 de maio de 2021. Dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para uso terapêutico e pesquisa clínica. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 maio 2021.

BROWN, C. A. *et al.* Chronic kidney disease in aged cats: clinical features, morphology, and proposed pathogeneses. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 2, p. 309-326, 2016. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300985815622975>. Acesso em: 17 abr. 2026.

BURDEYRON, P. *et al.* Urine-derived stem/progenitor cells: a focus on their characterization and potential. **World Journal of Stem Cells**, v. 12, n. 10, p. 1080-1096, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7596444/>. Acesso em: 17 abr. 2026.

CHEN, F.; CHEN, J.; CHENG, J. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Kidney Diseases: Potential and Challenges. **Cell Transplantation**, v. 32, 2023. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/09636897231164251>. Acesso em: 17 abr. 2026.

CHEN, H.; SEGEV, G. Evaluation of oxidative stress in dogs and cats with chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 38, n. 6, p. 3105-3110, 2024. Disponível em: <https://academic.oup.com/jvim/article-abstract/38/6/3105/8448792>. Acesso em: 17 abr. 2026.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução nº 1.041, de 18 de outubro de 2013. Dispõe sobre a responsabilidade técnica em estabelecimentos veterinários. Brasília, DF: CFMV, 2013.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução nº 1.275, de 25 de junho de 2019. Brasília, DF: CFMV, 2019.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução nº 1.321, de 24 de abril de 2020. Dispõe sobre o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na medicina veterinária. Brasília, DF: CFMV, 2020.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução nº 1.363, de 22 de outubro de 2020. Dispõe sobre a terapia com células-tronco em animais. Brasília, DF: CFMV, 2020.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resoluções Normativas do CONCEA**. Brasília, DF: MCTI, [s.d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea>. Acesso em: 19 mai. 2026.

CREAMER, D. G. *et al.* Influence of exposure to microbial ligands, immunosuppressive drugs and chronic kidney disease on endogenous immunomodulatory gene expression in feline adipose-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 24, n. 6, p. e43-e56, 2022. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1098612X221083074>. Acesso em: 17 abr. 2026.

CULENOVA, M. *et al.* Isolation, culture and comprehensive characterization of biological properties of human urine-derived stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12503, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/22/12503>. Acesso em: 19 mai. 2026.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14653240600855905>. Acesso em: 17 abr. 2026.

DONG, Y. J. *et al.* Extracellular Vesicles from Urine-Derived Stem Cell for Tissue Repair and Regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 2024. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2023.0100>. Acesso em: 17 abr. 2026.

DOS SANTOS, L. G.; FERREIRA, P. I.; KRAUSE, A. Mesenchymal stem cell transplantation: systematic review, meta-analysis and clinical applications for acute kidney injury and chronic kidney disease in dogs and cats. **Research in Veterinary Science**, v. 175, p. 105313, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528824001796>. Acesso em: 17 abr. 2026.

DUQUE, F. M.; DOS SANTOS, J. D.; CABRAL, P. C.; BELAS, A.; MARTINS, J. M. Effectiveness of two scrub methods with different chlorhexidine combinations for surgical field antisepsis in cats. **Canadian Veterinary Journal**, v. 65, n. 7, p. 675–681, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11195503>. Acesso em: 03 jun. de 2026.

EIRIN, A.; LERMAN, L. O. Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles for chronic kidney disease: are we there yet? **Hypertension**, v. 78, n. 2, p. 261-269, 2021. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.14596>. Acesso em: 17 abr. 2026.

FARIA, J. *et al.* Mesenchymal stromal cells secretome restores bioenergetic and redox homeostasis in human proximal tubule cells after ischemic injury. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, p. 353, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13287-023-03563-6>. Acesso em: 17 abr. 2026.

FONSECA, L. N. *et al.* Cell surface markers for mesenchymal stem cells related to the skeletal system: a scoping review. **Heliyon**, v. 9, n. 2, e13464, 2023. Disponível em: [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(23\)00671-000671-0](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(23)00671-000671-0). Acesso em: 17 abr. 2026.

FRANCO, M. L.; BEYERSTEDT, S.; MENEGHETTI, A.; BORTOLUZZI, E. A. Klotho and Mesenchymal Stem Cells: A Review on Cell and Gene Therapy for Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Injury. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 1, p. 11, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/1/11>. Acesso em: 17 abr. 2026.

FUJIMOTO, Y.; YOKOZEKI, T.; YOKOYAMA, A.; TABATA, Y. Basic fibroblast growth factor enhances proliferation and hepatocyte growth factor expression of feline mesenchymal stem cells. **Regenerative Therapy**, v. 15, p. 10-17, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352320420300365>. Acesso em: 19 mai. 2026.

GARCIA, S. G.; CLOS-SANSALVADOR, M.; SANROQUE-MUÑOZ, M.; PAN, L.; FRANQUESA, M. Functional and potency assays for mesenchymal stromal cell-extracellular vesicles in kidney disease. **Current Opinion in Physiology**, v. 38, art. 100746, 2024. DOI: 10.1016/j.cophys.2024.100746. Acesso em: 14 jul. 2026.

HANLEY, P. J. *et al.* Manufacturing mesenchymal stromal cells for phase I clinical trials. **Cytotherapy**, v. 15, n. 4, p. 416-422, 2013. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1465324913001473>. Acesso em: 19 mai. 2026.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS). **IRIS staging of CKD 2023**.

Disponível em: <http://www.iris-kidney.com>. Acesso em: 03 jun. de 2026.

JEPSON, R. E. Current understanding of the pathogenesis of progressive chronic kidney disease in cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 1015-1048, 2016. Disponível em:

[https://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616\(16\)30038-9/abstract30038-9/abstract](https://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616(16)30038-9/abstract30038-9/abstract)). Acesso em: 17 abr. 2026.

JIANG, Z.-Z. *et al.* Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type I diabetes in rats. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, p. 24, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13287-016-0287-2>. Acesso em: 17 abr. 2026.

JOHNSTONE, B. *et al.* *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. **Experimental Cell Research**, v. 238, n. 1, p. 265–272, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482797938581>. Acesso em: 08 mai. 2026.

KIM, H.-R. *et al.* Extensive characterization of feline intra-abdominal adipose-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, p. 299-306, 2017. Disponível em: <https://synapse.koreamed.org/articles/1094484>. Acesso em: 03 jun. de 2026.

KIM, S.-H. *et al.* Urine-Derived Stem Cell-Secreted Klotho Plays a Crucial Role in the HK-2 Fibrosis Model by Inhibiting the TGF- β Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, art. 5012, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/9/5012>. Acesso em: 26 jun. de 2026.

KOSANOVIĆ, M. *et al.* Clinical Prospect of Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Kidney Disease: Challenges and the Way Forward. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, p. 1911, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/7/1911>. Acesso em: 17 abr. 2026.

KRESSE, J.-C. *et al.* Does the route matter? A preclinical review of mesenchymal stromal cell delivery to the kidney. **APMIS**, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/apm.13352>. Acesso em: 17 abr. 2026.

KUWAHARA, Y. *et al.* Genotyping of feline MHC (FLA) class II DRB by PCR-RFLP method using group-specific primers. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 12, p. 1283-1289, 2000. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/62/12/62_12_1283/_article/-char/ja/. Acesso em: 03 jun. de 2026.

LANG, R. *et al.* Self-renewal and differentiation capacity of urine-derived stem cells after urine preservation for 24 hours. **PLoS One**, v. 8, n. 1, e53480, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0053980>. Acesso em: 08 mai. 2026.

LANGE-CONSIGLIO, A. *et al.* Characterization of urine-derived stromal/stem cells from healthy dogs and dogs affected by chronic kidney disease. **Animals**, v. 15, n. 2, art. 242, 2025. DOI: 10.3390/ani15020242. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani15020242>. Acesso em: 09 abr. 2026.

LI, W. *et al.* Rapid recovery of male cats with postrenal acute kidney injury by treating with allogeneic adipose mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, p. 379, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13287-022-03039-z>. Acesso em: 17 abr. 2026.

MACKAY, A. M. *et al.* Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. **Tissue Engineering**, v. 4, n. 4, p. 415–428, 1998. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1089/ten.1998.4.415>. Acesso em: 08 mai. 2026.

MAGALHÃES, T. R. *et al.* Clinical management of feline chronic kidney disease in Portugal: a questionnaire-based study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 2023. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1098612X231206125>. Acesso em: 17 abr. 2026.

MEBARKI, M. *et al.* Human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells: a promising candidate for the development of advanced therapy medicinal products. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, p. 152, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13287-021-02222-y>. Acesso em: 17 abr. 2026.

MELLO, D. B. *et al.* Mesenchymal Stromal Cell-Based Products: Challenges and Clinical Therapeutic Options. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, p. 6063, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/11/6063>. Acesso em: 17 abr. 2026.

PEIRED, A. J.; SISTI, A.; ROMAGNANI, P. Mesenchymal stem cell-based therapy for kidney disease: a review of clinical evidence. **Stem Cells International**, v. 2016, art. 4798639, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2016/4798639>. Acesso em: 17 abr. 2026.

PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 1999. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.284.5411.143>. Acesso em: 09 abr. 2026.

PROOT, S. J. M.; ROTHUIZEN, J. High complication rate of an automatic Tru-Cut biopsy gun device for liver biopsy in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 6, p. 1327–1333, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-1676.2006.tb00746.x>. Acesso em: 03 jun. de 2026.

QUIMBY, J. M. *et al.* Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 2, p. 165–171, 2016. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1098612X15576980>. Acesso em: 17 abr. 2026.

QUIMBY, J. M. *et al.* Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.

13, p. 418–426, 2011. Disponível em:
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1016/j.jfms.2011.01.005>. Acesso em: 17 abr. 2026.

QUIMBY, J. M. Feline chronic kidney disease: understanding pathophysiology is the key to development of new treatments. **The Veterinary Journal**, v. 203, n. 3, p. 265-266, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25624188/>. Acesso em: 17 abr. 2026.

QUIMBY, J. M. *et al.* Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, p. 48, 2013. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1186/scrt198>. Acesso em: 17 abr. 2026.

QUIMBY, J. M.; BORJESSON, D. L. Mesenchymal stem cell therapy in cats: current knowledge and future potential. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 20, n. 3, p. 208-216, 2018. Disponível em:
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1098612X18758590>. Acesso em: 17 abr. 2026.

QUIMBY, J. M.; DOW, S. W. Novel treatment strategies for feline chronic kidney disease: a critical look at the potential of mesenchymal stem cell therapy. **The Veterinary Journal**, v. 204, n. 3, p. 241-246, 2015. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023315001495>. Acesso em: 17 abr. 2026.

RIDEOUT, B. A.; MOORE, P. F.; PEDERSEN, N. C. Distribution of MHC class II antigens in feline tissues and peripheral blood. **Tissue Antigens**, v. 36, n. 5, p. 221-227, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1965618/>. Acesso em: 03 jun. de 2026.

ROTA, C. *et al.* Therapeutic potential of stromal cells of non-renal or renal origin in experimental chronic kidney disease. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, art. 220, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13287-018-0960-8>. Acesso em: 17 abr. 2026.

SARSENOVA, M. *et al.* Recent advances to enhance the immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1010399, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.1010399/full>. Acesso em: 17 abr. 2026.

SHIN, S. *et al.* Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and Wharton's jelly. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 845, 2021. Disponível em:
<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/2/845>. Acesso em: 17 abr. 2026.

SONG, Yizhe *et al.* Case Report: Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells for severe feline chronic kidney disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 12, p. 1632324, 2025. DOI: 10.3389/fvets.2025.1632324. Acesso em: 14 jul. 2026.

SPENCER, S.; WHEELER-JONES, C.; ELLIOTT, J. Aldosterone and the mineralocorticoid receptor in renal injury: a potential therapeutic target in feline chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 43, n. 3, p. 243-267, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jvp.12848>. Acesso em: 17 abr. 2026.

SUN, Jiachen *et al.* Comparison of chondrogenesis-related biological behaviors between human urine-derived stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells from the same individual. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 12, art. 366, 2021. DOI: 10.1186/s13287-021-02370-1.

SUN, Y. *et al.* Urinary stem cell-derived exocrine circRNA ATG7 regulates the SOCS1/STAT3 signaling pathway through miR-4500, inhibits M1 macrophage polarization, and alleviates the progression of diabetic nephropathy. **Urologia Internationalis**, v. 108, n. 3, p. 241-255, 2024. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11255-023-03819-3>. Acesso em: 17 abr. 2026.

TAYLOR, S. *et al.* 2021 ISFM Consensus Guidelines on the Collection and Administration of Blood and Blood Products in Cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 23, n. 5, p. 410-432, 2021. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1098612X211007071>. Acesso em: 10 ago. 2026.

THÉRY, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018). **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, 1535750, 2018. Disponível em: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1080/20013078.2018.1535750>. Acesso em: 19 mai. 2026.

THOMSON, A. L. *et al.* Intra-arterial renal infusion of autologous mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: phase I clinical trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 3, p. 1353-1361, 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/jvim/article-abstract/33/3/1353/8448150>. Acesso em: 17 abr. 2026.

VIDANE, A. S. *et al.* Transplantation of amniotic membrane-derived multipotent cells ameliorates and delays the progression of chronic kidney disease in cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, supl. 2, p. 316-326, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/rda.12846>. Acesso em: 17 abr. 2026.

VILHENA, H. C. R.; SANTOS, R. R.; SARGO, T. J.; LIMA, T. B. *et al.* Urine protein-to-creatinine concentration ratio in samples collected by means of cystocentesis versus manual compression in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 246, n. 8, p. 862-867, 2015. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/246/8/javma.246.8.862.xml>. Acesso em: 14 jul. 2026.

VOGA, M.; ADAMIC, N.; VENGUST, M.; MAJDIC, G. Stem Cells in Veterinary Medicine: current state and treatment options. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 278, 2020a. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2020.00278/full>. Acesso em: 17 abr. 2026.

VOGA, Metka; KOVAČ, Valerija; MAJDIC, Gregor. Comparison of canine and feline adipose-derived mesenchymal stem cells/medicinal signaling cells with regard to cell surface marker expression, viability, proliferation, and differentiation potential. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 7, art. 610240, 2020b. DOI: 10.3389/fvets.2020.610240.

WRIGHT, A.; ARTHAUD-DAY, M. L.; WEISS, M. L. Therapeutic use of mesenchymal stromal cells: the need for inclusive characterization guidelines. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.632717/full>. Acesso em: 17 abr. 2026.

YIN, X. *et al.* Urine-derived stem cells for epithelial tissues and disease modeling. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, art. 1669, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/8/1669>. Acesso em: 17 abr. 2026.

YU, Yu *et al.* Advancing mesenchymal stem cell therapy for kidney diseases in companion animals: from mechanisms to clinical application. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 13, p. 1771337, 2026. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2026.1771337/full>. Acesso em: 05 jul. 2026.

ZACHARIAS, S. *et al.* Impact of allogeneic feline uterine-derived mesenchymal stromal cell intravenous treatment on renal function of nephrectomized cats with chronic kidney disease. **Research in Veterinary Science**, v. 141, p. 33-41, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528821002861>. Acesso em: 17 abr. 2026.

ZAJIC, L. B. *et al.* Comparison of proliferative and immunomodulatory potential of adipose-derived mesenchymal stem cells from young and geriatric cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 10, p. 1096-1102, 2017. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1098612X16680703>. Acesso em: 12 ago. 2026.

ZHANG, Y. *et al.* Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. **Journal of Urology**, v. 180, n. 5, p. 2226–2233, 2008. Disponível em: <https://www.auajournals.org/doi/abs/10.1016/j.juro.2008.07.023>. Acesso em: 17 abr. 2026.

ZHOU, Q. *et al.* A comprehensive review of the therapeutic value of urine-derived stem cells. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 781597, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2021.781597/full>. Acesso em: 17 abr. 2026.

ZHOU, T. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. **Nature Protocols**, v. 7, n. 12, p. 2080–2087, 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2012.115>. Acesso em: 08 mai. 2026.

ZIDAN, A. A. *et al.* Characterization of urine stem cell-derived extracellular vesicles reveals B cell stimulating cargo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 459, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/459>. Acesso em: 17 abr. 2026.

8.1.1. APÊNDICES

APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DE EXPANSÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE USCs

Este apêndice reúne os procedimentos executáveis retirados do corpo do Capítulo 5. Sua função é preservar integralmente a metodologia de bancada sem sobrecarregar a discussão principal. Os procedimentos devem ser executados em condições assépticas e registrados em formulário próprio de rastreabilidade.

A.1 POP DE PASSAGEM E REPLAQUEAMENTO CELULAR

Critério de início: monocamada com 70% a 80% de confluência, morfologia compatível e viabilidade da cultura dentro do limite estabelecido.

1. Remover o meio de cultura por aspiração em condições assépticas.
2. Lavar a monocamada com PBS 1× sem cálcio e magnésio, pré-aquecido a 37 °C. Utilizar 5 mL para frascos T-25 ou 10 mL para frascos T-75.
3. Adicionar tripsina-EDTA a 0,25%, utilizando 1 mL para T-25 ou 3 mL para T-75.
4. Incubar a 37 °C por 3 a 5 minutos e monitorar o descolamento em microscópio invertido.
5. Confirmar o desprendimento pela presença de células arredondadas e refringentes.
6. Interromper a ação enzimática com volume equivalente de meio completo contendo SFB.
7. Transferir a suspensão para tubo cônico e centrifugar a $300 \times g$ por 5 minutos em temperatura ambiente.
8. Descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em volume adequado de meio fresco.
9. Quantificar as células e determinar a viabilidade.
10. Realizar o replaqueamento em densidade entre 5×10^3 e 1×10^4 células/cm² (Culenova *et al.*, 2021).

A.2 CÁLCULO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO CELULAR

O tempo de duplicação celular é calculado pela expressão:

$$DT = t \times \ln 2 / \ln N_f / N_i$$

- DT: tempo de duplicação celular, expresso em horas;
- t: intervalo de cultivo entre a semeadura e a contagem final, em horas;
- Ni: número inicial de células semeadas;
- Nf: número final de células recuperadas.

O cálculo deve utilizar logaritmo natural. Os valores de Ni, Nf, tempo de cultivo, passagem e viabilidade devem ser registrados para permitir comparação entre lotes e identificação de alterações proliferativas.

A.3 POP DE CRIOPRESERVAÇÃO

1. Selecionar cultura em passagem adequada, com viabilidade igual ou superior a 85% e ausência de contaminação.

2. Realizar a dissociação celular conforme o POP de passagem.

3. Quantificar as células e ajustar a concentração para 1 a 5×10^6 células/mL.

4. Preparar o meio de criopreservação definido para o protocolo. Para USCs, adota-se preferencialmente meio de cultura suplementado com 5% de DMSO, conforme validação específica de Afonso *et al.* (2026). Formulações convencionais com 10% de DMSO somente poderão ser utilizadas quando previamente justificadas e registradas.

5. Distribuir a suspensão em criotubos identificados com código da linhagem, passagem, concentração, data e tipo de banco.

6. Submeter os criotubos à redução controlada de aproximadamente 1 °C por minuto, utilizando dispositivo apropriado.

7. Manter os criotubos a -80 °C por no mínimo 4 horas e no máximo 24 horas.

8. Transferir os criotubos para nitrogênio líquido em fase vapor para armazenamento definitivo.

9. Registrar a localização física de cada criotubo no inventário do MCB ou WCB.

A.4 POP DE DESCONGELAMENTO E LIBERAÇÃO DE LOTE

1. Retirar o criotubo do armazenamento e transferi-lo imediatamente para banho-maria a 37 °C.

2. Promover descongelamento rápido, interrompendo-o quando restar pequeno cristal de gelo.

3. Desinfetar externamente o criotubo antes de sua abertura em cabine de biossegurança.

4. Diluir imediatamente o conteúdo em meio pré-aquecido, utilizando proporção mínima de 1:10.

5. Centrifugar a suspensão a $300 \times g$ por 5 minutos.

6. Descartar o sobrenadante contendo DMSO e ressuspender o *pellet* em meio fresco.

7. Determinar a viabilidade e semear as células em superfície tratada para cultura.

8. Avaliar adesão, morfologia e ausência de contaminação após o período inicial de recuperação.

9. Liberar o lote somente quando a viabilidade pós-descongelamento for igual ou superior a 70% e os demais critérios de qualidade forem atendidos.

A.5 REGISTROS MÍNIMOS DE RASTREABILIDADE

Registro	Informação mínima
Passagem celular	Código da linhagem, passagem, confluência, data, operador, Ni, Nf, viabilidade e densidade de replaqueamento.
Criopreservação	Código, passagem, concentração celular, formulação do meio, número de criotubos, data e posição de armazenamento.
Descongelamento	Código do lote, data, viabilidade, adesão, morfologia, contaminação e decisão de liberação ou descarte.

APÊNDICE B – CÁLCULO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO CELULAR

O tempo de duplicação celular deve ser calculado a cada passagem, após a determinação do número de células inicialmente semeadas e do número de células viáveis recuperadas ao final do período de cultivo. O cálculo utiliza a seguinte expressão:

$$DT = [t \times \ln(2)] / \ln(Nf/Ni)$$

DT: tempo de duplicação celular, expresso na mesma unidade utilizada para t, preferencialmente horas;

t: intervalo transcorrido entre a semeadura e a colheita das células;

Ni: número de células viáveis inicialmente semeadas;

Nf: número de células viáveis recuperadas ao final do período de cultivo;

ln: logaritmo natural.

O cálculo somente é válido quando Nf for maior que Ni. Quando houver redução do número celular, ausência de expansão ou perda expressiva de viabilidade, o resultado não deve ser apresentado como tempo de duplicação; o evento deve ser registrado como falha de expansão ou balanço celular negativo.

Exemplo de cálculo

Considerando uma cultura iniciada com 50.000 células viáveis (Ni), colhida após 72 horas (t) com 400.000 células viáveis (Nf):

$$DT = [72 \times \ln(2)] / \ln(400.000/50.000) = 24 \text{ horas}$$

O resultado deve ser analisado junto com a viabilidade, a passagem, a densidade de semeadura e a morfologia. Comparações entre culturas só são válidas quando as condições de cultivo e o método de contagem forem equivalentes.

APÊNDICE C – PLANEJAMENTO OPERACIONAL, INFRAESTRUTURA, INSUMOS E ORÇAMENTO

C.1 Planejamento logístico e aquisição de insumos e reagentes

A execução do protocolo requer planejamento logístico estruturado em janela mínima de noventa a cento e vinte dias, em função da dependência de insumos biológicos importados, da necessidade de cadeia fria validada e da obrigatoriedade de qualificação prévia de lotes críticos. Esse planejamento abrange todas as etapas experimentais, desde o isolamento celular até as análises bioanalíticas e a criopreservação, assegurando continuidade operacional e padronização metodológica ao longo de todo o fluxo experimental.

Os insumos são adquiridos exclusivamente por meio de distribuidores autorizados, com garantia de procedência, rastreabilidade e conformidade com especificações técnicas internacionais. Entre os materiais críticos incluem-se meios de cultura qualificados (KSFM, DMEM/F-12), soro fetal bovino (SFB) MSC-qualified, suplemento ITS, fatores de crescimento recombinantes, anticorpos monoclonais para citometria de fluxo, kits de ELISA, reagentes de biologia molecular e sistemas de isolamento e caracterização de vesículas extracelulares. A seleção desses insumos prioriza fornecedores de referência internacional, considerando o impacto direto desses componentes sobre viabilidade celular, perfil fenotípico e estabilidade funcional das MSCs (Hanley *et al.*, 2013; Mebarki *et al.*, 2021).

Os reagentes termolábeis são transportados sob cadeia fria controlada, conforme especificação do fabricante, utilizando refrigeração entre 2–8 °C ou gelo seco para produtos congelados. No momento do recebimento, realiza-se conferência imediata da integridade da embalagem, temperatura de transporte, condição física do material, número de lote e prazo de validade. Após validação, os insumos são armazenados nas condições recomendadas e registrados em sistema de rastreabilidade contendo identificação completa do lote, data de entrada, responsável técnico e finalidade experimental. Esse controle assegura reprodutibilidade e permite rastreamento de eventuais variações interlote.

A estratégia de aquisição distingue insumos de alta e baixa sensibilidade experimental. Reagentes críticos para desempenho celular, como SFB qualificado, meios de cultura, fatores de crescimento, anticorpos e kits analíticos, são mantidos em marcas consolidadas, devido à variabilidade biológica entre lotes e ao impacto direto sobre proliferação, diferenciação e estabilidade fenotípica. Em contrapartida, insumos de suporte, como soluções tampão, etanol, consumíveis plásticos auxiliares e materiais não críticos, admitem aquisição de fornecedores nacionais, desde que atendam aos critérios de esterilidade, pureza e certificação técnica.

O gerenciamento de estoque é dimensionado para garantir cobertura mínima de seis meses de execução contínua, incluindo lotes de segurança para todos os reagentes críticos. Esse estoque contempla, obrigatoriamente, SFB, antibiótico-antimicótico, PBS estéril, agentes de dissociação celular, kits de controle de qualidade (especialmente micoplasma), reagentes de fixação e materiais de criopreservação. A manutenção desse nível de estoque reduz o risco de interrupções experimentais decorrentes de atrasos logísticos, variações cambiais ou indisponibilidade de mercado.

A previsão orçamentária incorpora margem técnica e cambial sobre o custo-base dos insumos, considerando a volatilidade associada à importação de reagentes biológicos. Essa estratégia assegura estabilidade financeira do protocolo e permite reposição contínua de materiais ao longo das diferentes fases experimentais, sem comprometer a padronização metodológica.

C.2 Infraestrutura e equipamentos

A execução integral do protocolo é realizada em laboratório de cultivo celular sob condições de biossegurança nível 2 (NB-2), com acesso restrito, fluxo unidirecional de trabalho e segregação entre áreas limpas e áreas de processamento biológico. A infraestrutura contempla ambiente controlado para manipulação asséptica, cultivo celular, processamento de amostras biológicas e análise molecular, assegurando condições adequadas de esterilidade, rastreabilidade e reprodutibilidade experimental.

O parque tecnológico mínimo inclui cabine de biossegurança Classe II A2 para manipulação estéril de amostras e culturas celulares; incubadora de CO₂ com controle de temperatura (37 °C), concentração de CO₂ (5%) e umidade relativa elevada; centrífuga refrigerada de bancada equipada com rotores do tipo swing-out compatíveis com tubos de 15 e 50 mL; microscópio invertido de contraste de fase com sistema de captura de imagem digital; e sistema de criopreservação composto por ultrafreezer -80 °C e tanque criogênico de nitrogênio líquido em fase vapor.

A infraestrutura analítica inclui citômetro de fluxo com múltiplos canais de detecção, leitor de microplacas para ensaios colorimétricos, fluorimétricos e luminométricos, sistema de qRT-PCR para análise de expressão gênica e microscópio de fluorescência para avaliação de diferenciação celular e marcações nucleares. Para a análise de vesículas extracelulares, o protocolo incorpora obrigatoriamente três plataformas integradas: ultracentrífuga refrigerada com capacidade mínima de 100.000 × g, sistema de *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) e sistema completo de *Western Blot*. A inclusão conjunta desses equipamentos é mandatória, pois a caracterização de exossomos requer isolamento físico, quantificação de

tamanho/concentração e validação proteica, em conformidade com as diretrizes MISEV2018 (Théry *et al.*, 2018).

Entre os equipamentos específicos, destacam-se: ultracentrífuga equipada com rotores do tipo *swinging bucket* ou ângulo fixo, operando a 4 °C; sistema de *Western Blot* com módulo de eletroforese e detecção por quimioluminescência; instrumento de NTA para análise de partículas na faixa de 30 a 150 nm; autoclave vertical para esterilização de materiais; e sistema de purificação de água tipo I (Milli-Q). Complementarmente, são utilizados dispositivos de congelamento controlado para criopreservação gradual e equipamentos auxiliares para preparo e manipulação de amostras.

A implementação integral desse conjunto tecnológico apresenta custo elevado, com investimento estimado entre R\$ 1.500.000 e R\$ 2.400.000 em configuração completa. Diante dessa limitação, o protocolo adota estratégia operacional híbrida. As etapas iniciais, incluindo coleta, triagem pré-analítica, processamento primário, isolamento celular inicial, criopreservação intermediária e armazenamento em -80 °C, são conduzidas no laboratório de origem. As etapas de maior complexidade tecnológica, como expansão celular avançada, citometria de fluxo, análises de qRT-PCR, diferenciação celular e caracterização de vesículas extracelulares, são realizadas em centros multiusuários parceiros, dotados de infraestrutura completa. Essa divisão mantém a integridade metodológica do protocolo, uma vez que todas as etapas seguem padronização pré-definida e controlada.

Todos os equipamentos operam sob programa de calibração periódica e manutenção preventiva. A cabine de biossegurança é certificada anualmente, e os sistemas críticos, incubadoras, ultrafreezers e tanques criogênicos, possuem monitoramento contínuo de temperatura por datalogger, com registro sistemático dos parâmetros operacionais. A gestão de resíduos segue segregação por grupos, com autoclavagem prévia de materiais biológicos contaminados e descarte específico de perfurocortantes, reagentes químicos e resíduos laboratoriais, assegurando conformidade com normas de biossegurança aplicáveis ao nível NB-2.

C.3 Relação consolidada de materiais, equipamentos e insumos

A execução do protocolo requer conjunto abrangente de insumos laboratoriais organizados em categorias funcionais, assegurando rastreabilidade, padronização e reprodutibilidade experimental. Os meios de cultura incluem α -MEM, DMEM/F-12, DMEM baixa glicose, PBS, HBSS, tripsina-EDTA 0,25%, TrypLE e água ultrapura tipo I. Entre os suplementos, destacam-se penicilina/estreptomicina, anfotericina B, GlutaMAX, suplemento ITS (Sigma I3146), ácido ascórbico, DMSO Hybri-Max, β -mercaptoetanol e tampão HEPES.

Os fatores de crescimento recombinantes compreendem EGF, bFGF, TGF- β 3, HGF e BMP-2, essenciais para manutenção da viabilidade, proliferação e diferenciação celular. Os reagentes de diferenciação incluem dexametasona, IBMX, insulina, indometacina, β -glicerofosfato e kits comerciais específicos para adipogênese, osteogênese e condrogênese.

Os corantes e fixadores abrangem Oil Red O, Alizarin Red S, Alcian Blue, Safranin O, formalina tamponada a 10%, paraformaldeído, etanol absoluto, xileno, Trypan Blue e DAPI. Entre os consumíveis plásticos, incluem-se frascos de cultura (T-25, T-75, T-175), placas multiwell, tubos Falcon, criotubos, pipetas sorológicas, ponteiras com filtro, filtros de 70 μ m e 0,22 μ m, seringas, agulhas, câmaras de Neubauer e lâminas.

Para imunofenotipagem, são utilizados anticorpos contra CD44, CD90, CD105, CD73, CD34, CD45 (felino-validado) e CD14, além de controles isotípicos, corantes de viabilidade (7-AAD) e beads de compensação. A análise do secretoma utiliza kits ELISA para VEGF, HGF e IGF-1, além de kits felino-específicos para PDGF-BB e IL-1 β . O controle microbiológico inclui kit MycoAlert e sistema PCR Venor GeM.

O isolamento de vesículas extracelulares utiliza ExoQuick-TC, *Total Exosome Isolation Reagent* e tubos de ultracentrifugação, enquanto a caracterização proteica envolve reagentes de *Western Blot*, incluindo anticorpos anti-CD63, CD81, TSG101 e calnexina, além de membranas PVDF, tampões, reagentes de revelação e sistemas de detecção. Para criopreservação, utiliza-se meio padrão com DMSO ou alternativa xeno-free (CryoStor CS10). Serviços terceirizados incluem análises de biomarcadores séricos e cariotipagem.

C.4 Orçamento detalhado e análise de viabilidade financeira

O orçamento consolidado para execução completa do protocolo, com base em valores de mercado brasileiro atualizados (2025-2026) e considerando insumos nacionais e importados convertidos por cotação média de US\$ 1,00 $\approx$ R\$ 5,00, é apresentado na Tabela 7, com subtotais por categoria.

Tabela 7 - Orçamento consolidado de consumíveis e reagentes (R\$).

Categoria	Subtotal (R\$)
Meios de cultura, soros e soluções	26.800
Suplementos	9.200
Fatores de crescimento recombinantes	16.500
Reagentes de diferenciação	9.400
Corantes, fixadores e histoquímica	4.200
Plásticos e consumíveis gerais	25.900
Imunofenotipagem e citometria	27.800

Kits ELISA (secretoma)	13.800
Deteção de micoplasma	9.500
Isolamento de exossomos	39.500
<i>Western Blot</i>	31.200
<i>CryoStor xeno-free</i> (opcional)	8.600
Subtotal de consumíveis e reagentes	222.400
Reserva técnica (10%)	22.240
Total de consumíveis e reagentes	≈ 244.600
Serviços laboratoriais terceirizados (10 animais × 4 tempos + cariotipagem)	≈ 60.000
Subtotal operacional (OPEX)	≈ 304.600

Fonte: Elaboração própria (2026).

Os equipamentos (CAPEX), listados separadamente, totalizam entre R\$ 1.700.000 e R\$ 2.400.000 em configuração completa (cabine de biossegurança, incubadora de CO₂, centrífuga refrigerada, ultracentrífuga, microscópios invertido e de fluorescência, citômetro de fluxo, leitor de microplacas, sistema de análise de nanopartículas, NTA, sistema completo de *Western Blot*, tanque de nitrogênio líquido, *ultrafreezer*, autoclave e purificador de água tipo Milli-Q), com base em benchmarks de mercado brasileiro e contratos institucionais recentes.

Em configuração mínima, com uso compartilhado da ultracentrífuga, do NTA e do citômetro de fluxo em centros multiusuários (universidades e institutos de pesquisa), o investimento reduz-se para a faixa de R\$ 450.000 a R\$ 600.000, mantendo-se apenas a infraestrutura essencial local (NB-2, cultivo celular e criopreservação).

O investimento total médio estimado situa-se, portanto, em aproximadamente R\$ 2.200.000 em configuração completa, ou R\$ 850.000 em configuração otimizada com compartilhamento de equipamentos multiusuários, cenário considerado metodologicamente adequado e financeiramente viável para execução em instituição pública com acesso a redes colaborativas de pesquisa.

APÊNDICE D — SÍNTESE DO PROTOCOLO PROPOSTO E PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

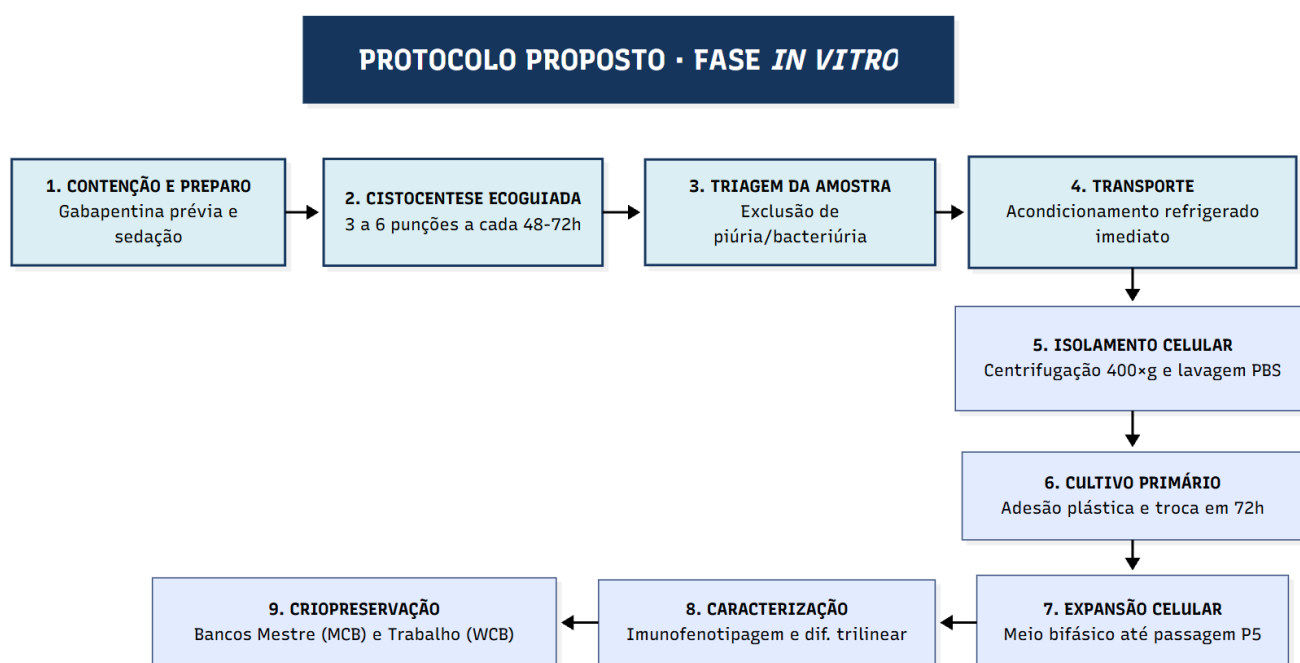
Este apêndice sintetiza, em formato consolidado, o protocolo resultante da análise comparativa apresentada no Capítulo 5, organizando os elementos que permitem submetê-lo a avaliação crítica e a planejamento experimental subsequente.

Elemento	Definição no protocolo
População-alvo	Gatos domésticos com DRC nos estágios IRIS 2 e 3, com sete anos ou mais, clinicamente estáveis
Fonte celular	USCs obtidas por cistocentese ecoguiada
Origem na padronização	Gatos com DRC, população-alvo da proposta
Origem na aplicação	Produto alogênico de doadores hígidos triados, criopreservado
Amostragem	Coletas seriadas, três a seis punções, intervalo de 48 a 72 horas
Desfecho primário	Taxa de sucesso de isolamento e expansão até passagem 3 com critérios de identidade mantidos
Indicadores de sucesso laboratorial	Rendimento clonogênico, tempo de duplicação, estabilidade imunofenotípica, cariótipo $2n = 38$, ausência de micoplasma
Indicadores de sucesso clínico	Estabilização ou redução de creatinina e SDMA, redução da relação proteína:creatinina urinária, manutenção do estágio IRIS
Via e dose	Intravenosa, 2×10^6 células/kg, duas a três aplicações com intervalo de 14 dias
Efeitos adversos monitorados	Reações à infusão, alterações hemodinâmicas, tromboembolismo pulmonar, deterioração renal acima do esperado
Análise de viabilidade	Etapas executáveis com infraestrutura convencional de cultivo celular; isolamento e caracterização de vesículas extracelulares dependentes de parceria com centro multiusuário
Limites declarados	Ausência de estudos com USCs felinas; anticorpos validados escassos; volume urinário reduzido; diferenciação renal exploratória

Fonte: Elaboração própria (2026).

A figura D1 sintetiza a fase laboratorial do protocolo (*in vitro*), destacando as adaptações metodológicas exigidas para felinos. Entre as adequações, enfatizam-se a cistocentese ecoguiada exclusiva, a flexibilização do pH de triagem devido à disfunção tubular do nefropata e a caracterização molecular que contorna a escassez de anticorpos validados.

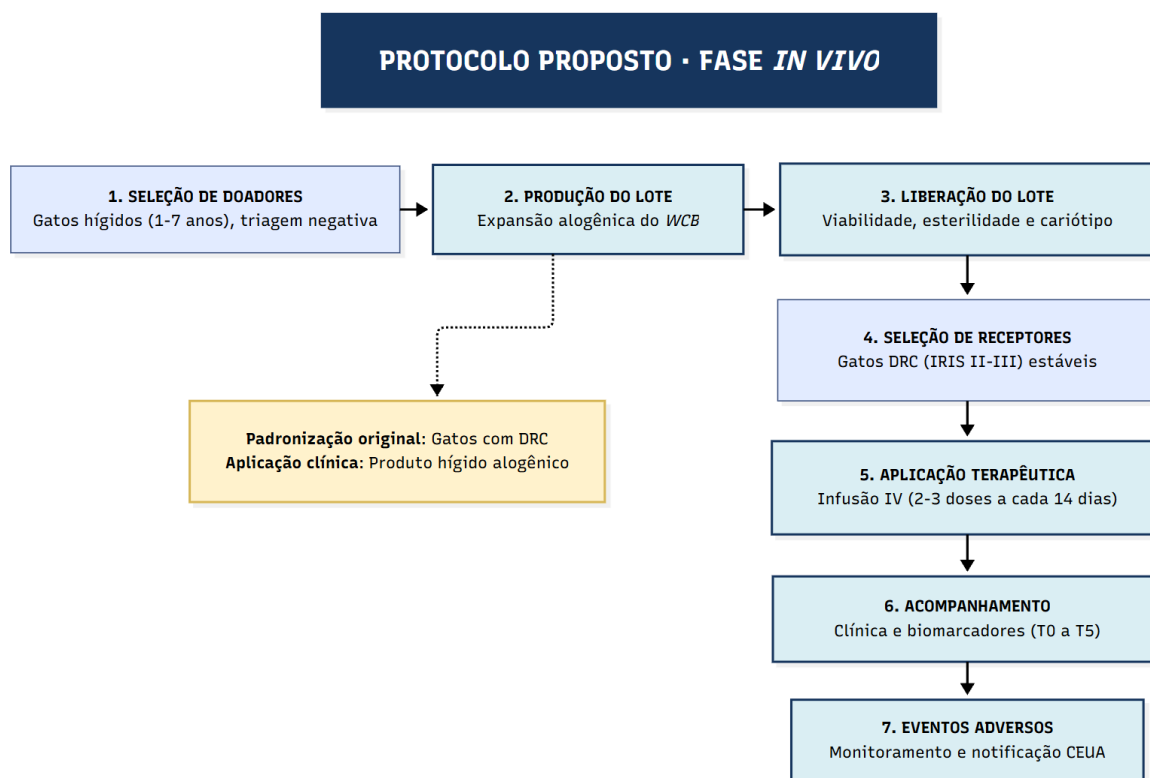
Figura D1 - Fase *in vitro* do protocolo proposto



Fonte: Elaboração própria (2026).

A figura D2 delinea a etapa clínica (in vivo), justificando o uso terapêutico de produto alogênico hígido em razão da progressão rápida da doença impedir a espera pelo cultivo autólogo. A seleção de receptores foca nos estágios IRIS II e III, excluindo o IRIS IV devido à fibrose extensa que inviabiliza a eficácia do secretoma.

Figura D2 - Fase *in vivo* do protocolo proposto



Fonte: Elaboração própria (2026).