



ISOLAMENTO E EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA URINA DE GATOS PARA APLICAÇÕES EM DOENÇAS RENAIAS

Camilly Cristini Benan Silva¹, Nivaldo Campanholi Junior², Júlia Beatriz Costa de Oliveira³,
Isabele Picada Emanuelli⁴

¹Acadêmica do Curso de Biomedicina, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/ICETI- UniCesumar. Camilly007@hotmail.com

²Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Nivaldocampanholi24@gmail.com

³Mestranda do Programa de Tecnologias Limpas, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Bolsista Fundação Araucária - UniCesumar. Jubia.oliveira15@gmail.com

⁴Docente no Curso de Pedagogia, UNICESUMAR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. Isabele.emanuelli@unicesumar.edu.br

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se por lesões morfoestruturais irreversíveis que evoluem progressivamente para insuficiência e falência renal. Com alta incidência em felinos, afeta cerca de 10% dos gatos com mais de 10 anos, sendo responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Diversas terapias com células-tronco vêm sendo investigadas para o tratamento dessas doenças, e entre elas, as células-tronco derivadas da urina (USCs) — um tipo emergente de célula-tronco adulta obtida de forma menos invasiva — mostram grande potencial para aplicações em tecidos e na medicina regenerativa. Este estudo tem como objetivo padronizar um método simplificado de isolamento, cultivo e expansão *in vitro* de USCs felinas, visando sua aplicação futura no tratamento da DRC. Serão utilizadas urina fresca, centrifuga refrigerada (4°C), PBS estéril (pH 7,4), antibióticos (penicilina/estreptomicina 1%), filtro celular (40 µm) e meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino ou soro autólogo, 1% de antibiótico e 5 ng/mL de FGF básico. A urina (50–100 mL) será coletada por cistocentese ou sondagem uretral de gatos atendidos no Hospital Veterinário da UniCesumar, acondicionada em tubos Falcon com PBS e antibiótico, transportada sob refrigeração e processada em até duas horas no laboratório do Centro de Biotecnologia Animal (Biotec). O processamento seguirá as etapas de filtração, isolamento celular, cultivo e expansão. Espera-se padronizar o protocolo de obtenção e cultivo de USCs felinas, demonstrando sua viabilidade e aplicabilidade na medicina regenerativa veterinária, com benefícios à saúde, bem-estar animal e possível contribuição para práticas mais sustentáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Células-tronco urinárias; Doença renal crônica; Felinos; Medicina regenerativa.

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se por lesões morfoestruturais irreversíveis, que podem evoluir progressivamente para insuficiência e falência renal. Trata-se de uma enfermidade de alta incidência em felinos, afetando cerca de 10% dos gatos com mais de 10 anos de idade, sendo responsável por taxas elevadas de morbidade e mortalidade (Mazzuti; Ferreira, 2021). Diante desse cenário, há um interesse crescente na busca por ferramentas que auxiliem no diagnóstico, prognóstico e tratamento da DRC em cães e gatos (Waki et al., 2010).

Nos últimos anos, diferentes abordagens terapêuticas baseadas no uso de células-tronco têm sido propostas para o tratamento de doenças degenerativas. Essas células são progenitoras com capacidade de se diferenciar em um ou mais tipos celulares especializados, apresentando características que as qualificam como fontes promissoras para aplicações em terapia celular (Bittencourt et al., 2016). De forma geral, possuem potencial ilimitado de replicação e, se devidamente estimuladas, podem originar diversas linhagens celulares.

Dois grandes grupos de células-tronco têm sido investigados: as derivadas de tecidos embrionários e as adultas (Lojudice; Sogayar, 2008). No entanto, questões éticas e



limitações técnicas ainda restringem o uso das fontes mais convencionais, mantendo seu emprego majoritariamente em fase experimental (Sun et al., 2024). Entre as fontes alternativas, destacam-se as células-tronco derivadas da urina (USCs), classificadas como células-tronco adultas obtidas por meio de um método minimamente invasivo. As USCs vêm demonstrando grande potencial para aplicações em engenharia tecidual e medicina regenerativa (Kloskowski et al., 2015; Zhang et al., 2021). A coleta não invasiva e repetida das amostras, aliada à viabilidade celular obtida, torna essa abordagem ainda mais atrativa para ensaios clínicos e aplicações laboratoriais. Avanços em biomateriais também têm ampliado a aplicabilidade das USCs, permitindo maior direcionamento terapêutico, principalmente em doenças renais crônicas (Yu et al., 2023).

A DRC se desenvolve de forma silenciosa e os sinais clínicos geralmente surgem quando a função renal já está comprometida (Milistetd et al., 2022). O rim exerce funções excretoras, regulatórias e endócrinas, e a perda de sua função resulta em alterações metabólicas como azotemia, hiperfosfatemia, aumento do PTH, acidose metabólica, anemia não regenerativa, isostenúria, distúrbios eletrolíticos e proteinúria. Clinicamente, observam-se perda de peso, desidratação, úlceras orais, halitose, êmese, melena, poliúria e polidipsia (Borosky et al., 2023). O tratamento deve ser individualizado, com foco em retardar a progressão da doença, preservar néfrons funcionais e melhorar a qualidade de vida (Leal et al., 2024). As diretrizes incluem evitar agentes nefrotóxicos, corrigir causas pré e pós-renais, manter a hidratação, adotar dietas específicas e controlar distúrbios secundários como hipertensão e acidose (Milistetd et al., 2022; Leal et al., 2024).

Diante das limitações dos tratamentos convencionais, as terapias celulares surgem como alternativas promissoras. Além dos benefícios clínicos, esse tipo de abordagem pode contribuir para a sustentabilidade ambiental ao reduzir o uso prolongado de fármacos e a geração de resíduos. O uso de células-tronco também está alinhado aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), especialmente o ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), ODS 8 (Trabalho Decente e Crescimento Econômico) e ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis) (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, 2017).

Na última década, os estudos com células-tronco têm avançado tanto na medicina humana quanto na veterinária (Colomé et al., 2008; Castro-Silva et al., 2010), com foco em sua plasticidade (totipotente, pluripotente ou multipotente) e origem (embrionária ou adulta) (Oliveira, 2017; Santos et al., 2013; Alves et al., 2019). Diversos trabalhos demonstraram sua eficácia em regeneração tecidual (Narazaki; Cristante, 2011; Ryu et al., 2012; Bittencourt et al., 2016; Stolfi et al., 2016). As fontes mais estudadas são medula óssea, tecido adiposo, sangue periférico e cordão umbilical (Takeuchi; Tannuri, 2006), mas, recentemente, a urina tem se mostrado uma alternativa promissora, permitindo o isolamento de células-tronco urinárias com capacidade de diferenciação e regeneração (Mahla, 2016; Guan et al., 2015). Trata-se de um método de baixo custo, minimamente invasivo e viável mesmo em animais com condição clínica estável.

A padronização da obtenção de células-tronco derivadas da urina (USCs) em espécies não humanas, especialmente felinos, é limitada e poucos estudos estão disponíveis. Portanto, é necessário desenvolver protocolos simples, reprodutíveis e eficientes para isolamento e cultivo in vitro dessas células, com potencial para pesquisas em biotecnologia celular e medicina regenerativa, incluindo outras espécies. Este estudo foca no potencial terapêutico das USCs em gatos, especialmente para a doença renal crônica (DRC), importante causa de morbidade na espécie. A pergunta é: seria possível isolar, cultivar e expandir in vitro células-tronco urinárias felinas com viabilidade e reprodutibilidade? A hipótese é que sim, via protocolo viável e padronizável.

A justificativa baseia-se na crescente importância da medicina veterinária regenerativa e nas vantagens das USCs, obtidas minimamente invasivas, com menor estresse, coletas repetidas e menor risco de complicações, sendo prática e segura para



uso clínico. Além dos benefícios à saúde animal, contribuem para práticas veterinárias mais sustentáveis, alinhadas aos ODS 3 (Saúde e Bem-Estar) e 12 (Consumo e Produção Responsáveis). O objetivo é padronizar isolamento, cultivo e expansão de USCs felinas por revisão bibliográfica, experimentação, análise morfológica e documentação detalhada, garantindo reprodutibilidade para futuras pesquisas biomédicas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa experimental laboratorial de natureza aplicada, com delineamento exploratório-descritivo, cujo objetivo é estabelecer e documentar um protocolo simplificado para o isolamento e cultivo in vitro de células-tronco derivadas da urina de felinos.

A metodologia será baseada nos princípios descritos por Schosserer et al. (2015), com modificações para adaptação à manipulação de amostras urinárias obtidas de gatos domésticos. Todo o processo será conduzido sob condições assépticas em ambiente de laboratório de cultivo celular, com observações baseadas em critérios morfológicos por microscopia óptica.

2.1 COLETA DE URINA

Para a coleta de urina serão utilizados os seguintes materiais: centrífuga refrigerada (4°C), PBS estéril (pH 7.4), antibióticos (Penicilina/Estreptomicina 1%), filtro celular (40 µm), meio de cultura: DMEM/F12 + 10% de soro fetal bovino (FBS) ou soro autólogo + 1% penicilina/estreptomicina + 5 ng/mL FGF básico.

A coleta de urina fresca (50–100 mL, preferencialmente da primeira micção da manhã) será realizada a partir de cistocentese ou sondagem uretral de gatos do Hospital Veterinário do Centro Universitário CESUMAR (UniCesumar), Maringá - PR. As amostras coletadas serão acondicionadas de forma asséptica em tubos Falcon contendo tampão fosfato salino (PBS) e antibiótico. Em seguida, serão transportadas, sob refrigeração, até o laboratório do Centro de Biotecnologia Animal (Biotec) do UniCesumar para serem processadas em câmara de fluxo laminar a fim de evitar contaminação, dentro de 2 horas para evitar morte celular.

2.2 PROCESSAMENTO, CULTURA E EXPANSÃO

Será centrifugada a urina 300 x g por 10 minutos (4°C). Descartando o sobrenadante e ressuspendendo o pellet em PBS + 1% penicilina/estreptomicina. Posteriormente, será repetido a centrifugação 2 vezes para remover detritos. Filtração e Isolamento.

Será passado a suspensão por um filtro de 40 µm para remover células epiteliais descamadas. E após ressuspendendo as células no meio de cultura celular DMEM com 10% de soro.

Para o cultivo será semeado as células em placas de cultura e mantendo em incubadora a 37°C com 5% CO₂. Trocando o meio a cada 48–72 horas. Colônias de células-tronco (morfologia fibroblastóide) deverão aparecer em 5–7 dias.

2.3 OBSERVAÇÃO MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

Após o isolamento e semeadura das células em placas de cultura, estas serão mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂, sendo observadas rotineiramente sob microscópio óptico invertido. As células serão caracterizadas morfolologicamente por meio de observações não invasivas, considerando os seguintes critérios: Adesão ao plástico: avaliação qualitativa da capacidade de adesão ao fundo da placa, típica de células-tronco



mesenquimais; Morfologia: presença de células com morfologia fusiforme ou fibroblastóide, compatível com o perfil esperado de USCs; Confluência: estimativa visual da área ocupada pelas células em relação à superfície total da placa (ex: 30%, 70%, 100%); Organização das colônias: observação de agrupamentos celulares homogêneos, com bordas bem definidas e ausência de alterações morfológicas sugestivas de contaminação ou senescência; Tempo para aderência inicial e tempo para primeira divisão: registro aproximado do intervalo entre semeadura e os primeiros sinais de fixação e proliferação. As observações serão documentadas por registro fotográfico periódico (ex: 24h, 72h, 7 dias) utilizando câmera acoplada ao microscópio.

2.3 DOCUMENTAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO

Durante todo o processo experimental, cada etapa será descrita detalhadamente e registrada, visando sua reprodutibilidade futura. Para isso, serão documentados: volumes utilizados na coleta, centrifugação e ressuspensão; tempo entre coleta e início do cultivo; temperatura e condições de incubação; frequência de trocas de meio; morfologia celular ao longo dos dias de cultivo; tempo médio para observação de colônias.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados serão analisados com o apoio de um software estatístico, como o R. Para as variáveis que resultam em números (como tempo para adesão ou número de colônias), serão calculadas medidas como média, mediana, valor mínimo e máximo, e desvio padrão. Antes de comparar os dados entre diferentes amostras ou condições, será feito um teste (Shapiro-Wilk) para verificar se os dados seguem uma distribuição normal. Se os dados forem normais, serão usados testes estatísticos como a ANOVA. Caso contrário, serão aplicados testes mais apropriados para esse tipo de dado, como o teste de Kruskal-Wallis.

Para comparar resultados como presença ou ausência de colônias, serão usados testes como o qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Também será possível avaliar se há relação entre algumas variáveis, como o tempo de cultivo e o grau de confluência, usando o teste de correlação de Spearman. Em todas as comparações, será considerado como estatisticamente significativo um valor de p menor que 0,05.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A padronização de um protocolo simples, eficiente e reprodutível para o isolamento e cultivo *in vitro* de células-tronco derivadas da urina (USCs) de felinos representa um avanço relevante para a medicina regenerativa veterinária. O método proposto visa obter células viáveis, com características morfológicas e proliferativas adequadas, aplicáveis em estudos voltados ao tratamento da doença renal crônica em gatos e com possível aplicação em outras espécies, promovendo avanços científicos e práticas sustentáveis.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. *et al.* The therapeutic use of stem cells. **Revista Saúde em Foco**, n. 11, 2019.
BITTENCOURT, M. K. *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Cell Medicine**, v. 8, n. 3, p. 63–77, 2016.



BOROSKY, J. C. *et al.* Euglena gracilis as an adjuvant for the treatment of a dog with chronic kidney disease – case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 75, n. 6, p. 1065–1068, 2023.

CASTRO-SILVA, I. I.; COUTINHO, L. A. C. R.; GRANJEIRO, J. M. Revisão sistemática sobre o uso de células-tronco mesenquimais em terapias de perdas ósseas. **Innovations Implant Journal**, v. 5, n. 3, p. 29–34, 2010.

COLOMÉ, L. M. *et al.* Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2529–2534, 2008.

GUAN, J. *et al.* Bone morphogenetic protein 2 gene transduction enhances the osteogenic potential of human urine-derived stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 5, 2015.

KLOSKOWSKI, T. *et al.* Urine – A waste or the future of regenerative medicine? **Medical Hypotheses**, v. 84, n. 4, p. 344–349, 2015.

LEAL, N. R. *et al.* Manejo nutricional de cães com doença renal crônica. **Ciências da Saúde**, v. 28, n. 139, out. 2024.

MILISTETD, M. *et al.* Effects of intravenous administration of allogeneic mesenchymal stromal cells, derived from adipose tissue, in five dogs with chronic kidney disease. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 74, n. 2, mar./abr. 2022.

NARAZAKI, D. J.; CRISTANTE, A. F. Avanços no uso de células-tronco em ortopedia. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 4, p. 359–367, 2011.

OLIVEIRA, V. C. *et al.* Characterization of putative haematopoietic cells from bovine yolk sac. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, n. 4, p. 1132–1140, 2017.

RYU, H. H. *et al.* Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 12, p. 1617–1630, 2012.

SCHOSSERER, M.; *et al.* Urine is a novel source of autologous mesenchymal stem cells for patients with epidermolysis bullosa. **BMC Research Notes**, v. 8, p. 767, 2015.

STOLFI, J. L.; PAI, C. C.; MURPHY, W. J. Preclinical modeling of hematopoietic stem cell transplantation – advantages and limitations. **FEBS Journal**, v. 283, n. 9, p. 1595–1606, 2016.

SUN, Y. *et al.* Urine-derived stem cells: promising advancements and applications in regenerative medicine and beyond. **Heliyon**, v. 10, n. 6, 2024.

TAKEUCHI, C. A.; TANNURI, U. A polêmica da utilização de células-tronco embrionárias com fins terapêuticos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 2, p. 63, mar./abr. 2006.



WAKI, M. F.; MAZZANTI, A.; TRONCOSO, J. F. Classification into stages of chronic kidney disease in dogs and cats: clinical, laboratorial and therapeutic approach. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, out. 2010.

YU, P.; OPARA, E. C.; ZHANG, Y. Power of pee: urine-derived stem cells in urological disorders. **UroPrecision**, v. 1, p. 38–44, 2023.

ZHANG, W. *et al.* Células-tronco derivadas da urina: aplicações no reparo da pele, osso e cartilagem articular. **Burns & Trauma**, v. 9, 2021.