

BIOTRANS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA TRANSLACIONAL

CIBELE FERREIRA PIMENTEL

**FIBROSE HEPÁTICA *IN VITRO* INDUZIDA POR TGF- β : DAS ALTERAÇÕES
ESTRUTURAIS AO IMPACTO NA COMUNICAÇÃO INTERCELULAR EM
ESFEROIDES MULTICELULARES**

DUQUE DE CAXIAS

2025

Cibele Ferreira Pimentel

FIBROSE HEPÁTICA *IN VITRO* INDUZIDA POR TGF- β : DAS ALTERAÇÕES
ESTRUTURAIS AO IMPACTO NA COMUNICAÇÃO INTERCELULAR EM
ESFEROIDES MULTICELULARES

Tese de Doutorado apresentada ao
programa de pós-graduação em
Biomedicina Translacional – BIOTRANS
(UNIGRANRIO, UERJ & Inmetro)
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em
Ciências Biomédicas.

Orientadores: Prof. Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes
Prof^a Dr^a Regina Coeli dos Santos Goldenberg
Coorientador: Prof. Dr. Marlon Lemos Dias

DUQUE DE CAXIAS

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

RESUMO

PIMENTEL, Cibele Ferreira. **FIBROSE HEPÁTICA *IN VITRO* INDUZIDA POR TGF- β : DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS AO IMPACTO NA COMUNICAÇÃO INTERCELULAR EM ESFEROIDES MULTICELULARES**. Duque de Caxias, 2025. TESE (Doutorado em Biomedicina Translacional) – Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS - Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2025.

A fibrose hepática é caracterizada pela substituição progressiva do tecido hepático normal por uma matriz extracelular desorganizada. Junções comunicantes, mediadas pelas conexinas Cx26, Cx32 e Cx43, desempenham papel fundamental na comunicação intercelular e na manutenção da homeostase tecidual. No entanto, o impacto dos processos fibróticos sobre essas junções permanece pouco explorado. Para investigar essa questão, desenvolvemos um modelo 3D *in vitro* de fibrose hepática induzida por TGF- β , utilizando esferoides multicelulares compostos por células tumorais humanas (HepG2), células estelares hepáticas (GRX) e células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual (CeSaM; n=10, aprovação do Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho 056/09). Após sete dias de cultura, os esferoides controle e fibróticos (tratados com 10 ng/mL de TGF- β) foram avaliados qualitativamente por volumetria e esfericidade, e posteriormente submetidos a análises de histologia (HE e picrossírius), imunofluorescência (α -SMA, COL I/III, Cx26, Cx32, Cx43, albumina, CYP3A4 e Ki-67), microscopia eletrônica de transmissão e varredura (MET e MEV), e avaliação da sinalização de Ca^{2+} intercelular. Os resultados mostraram que o tratamento com TGF- β promoveu a obtenção de esferoides fibróticos com tamanho reduzido, e alterações ultraestruturais típicas da fibrose hepática, tais como afastamento das membranas celulares e acúmulo de colágeno. Também observamos transdiferenciação das células estreladas hepáticas (CEHs) em miofibroblastos. Verificou-se ainda a redução significativa da proliferação celular, acompanhada de menor marcação de albumina e detecção difusa de CYP3A4. Observou-se redução nas marcações das Cx32 e Cx43 acompanhada de alterações morfofuncionais nas Cx26, Cx32 e Cx43. Esses achados indicam que o processo fibrótico causou prejuízo nas junções comunicantes, sugerindo que a disfunção das conexinas pode contribuir para a progressão da fibrose hepática. A análise da sinalização de Ca^{2+} mostrou que a amplitude, propagação e responsividade estavam significativamente reduzidas nos esferoides fibróticos,

indicando prejuízo na comunicação intercelular. Portanto, a fibrose hepática compromete a integridade estrutural e funcional dos esferoides multicelulares, afetando proliferação, metabolismo, secreção, sinalização de Ca^{2+} e comunicação via conexinas. O modelo 3D HepG2, GRX e CeSaM representa uma plataforma viável para investigar mecanisticamente a fibrose hepática e testar estratégias antifibróticas, oferecendo uma abordagem integrada que reduz o uso de animais em pesquisa, em consonância com os princípios dos 3R's.

Palavras-chave: Fibrose hepática, junções comunicantes, conexinas, esferoides multicelulares, TGF- β , sinalização de cálcio.

ABSTRACT

Liver fibrosis is characterized by the progressive replacement of normal liver tissue by a disorganized extracellular matrix. Communicating junctions, mediated by the connexins Cx26, Cx32 and Cx43, play a fundamental role in intercellular communication and in maintaining tissue homeostasis. However, the impact of fibrotic processes on these junctions remains poorly explored. To investigate this issue, we developed a 3D in vitro model of TGF- β -induced liver fibrosis using multicellular spheroids composed of human liver cancer cell line (HepG2), hepatic stellate cell line (GRX) and menstrual blood-derived mesenchymal stromal cells (CeSaM; n=10, Clementino Fraga Filho University Hospital Ethics Committee approval 056/09). After seven days of culture, the control and fibrotic spheroids (treated with 10 ng/mL of TGF- β) were qualitatively assessed by volumetry and sphericity, and subsequently subjected to histological analysis (HE and picrosirius), immunofluorescence (α -SMA, COL I/III, Cx26, Cx32, Cx43, albumin, CYP3A4 and Ki-67), transmission and scanning electron microscopy (MET and SEM), and evaluation of intercellular Ca²⁺ signaling. The results showed that treatment with TGF- β led to fibrotic spheroids with a reduced size and ultrastructural changes typical of liver fibrosis, such as the separation of cell membranes and the accumulation of collagen I and III. We also observed transdifferentiation of stellate cells into myofibroblasts. There was also a significant reduction in cell proliferation, accompanied by lower albumin labeling and diffuse detection of CYP3A4. There was a reduction in Cx32 and Cx43 labeling accompanied by morphofunctional changes in Cx26, Cx32 and Cx43. These findings indicate that the fibrotic process caused damage to the gap junctions, suggesting that dysfunction of the connexins may contribute to the progression of liver fibrosis. Analysis of Ca²⁺ signaling showed that amplitude, propagation and responsiveness were significantly reduced in fibrotic spheroids, indicating impaired intercellular communication. Therefore, liver fibrosis compromises the structural and functional integrity of multicellular spheroids, affecting proliferation, Ca²⁺ signaling and communication via connexins. The 3D HepG2, GRX and CeSaM model represents a viable platform for mechanistically investigating liver fibrosis and testing antifibrotic strategies, offering an integrated approach that reduces the use of animals in research, in line with the 3R's principles.

Keywords: Liver fibrosis, gap junctions, connexins, multicellular spheroids, TGF-

β , calcium signaling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da unidade funcional do fígado humano.	239
Figura 2. Representação da ultraestrutura de um hepatócito.....	30
Figura 3. Representação dos tipos celulares encontrados no fígado normal.	32
Figura 4. Representação das Junções Comunicantes formadas por Conexinas	34
Figura 5. Representação da classificação dos estágios de gravidade da fibrose hepática.....	46
Figura 6. Representação das alterações nas células hepáticas e MEC na fibrose hepática.....	417
Figura 7. Representação dos modelos de culturas 2D e 3D.	52
Figura 8. Representação esquemática da estrutura do esferoide multicelular e a organização do ácino hepático.....	55
Figura 9. Micrografias ópticas de contraste de fase das células HepG2, GRX e CeSaM no tempo de 4 dias de cultivo.....	78
Figura 10. Micrografias ópticas de contraste de fase do esferoide multicelular no tempo de 7 dias de cultivo.....	79
Figura 11. Imagem ilustrativa da formação do esferoide multicelular com as células HepG2, GRX e CeSaM em 24 horas.	80
Figura 12. Fotomicrografias de contraste de fase representativas das análises volumétricas dos esferoides controle e fibrótico.....	83
Figura 13. Fotomicrografias de contraste de fase representativas das análises da esfericidade dos esferoides multicelulares em 7 dias de cultivo, n=10	86
Figura 14. Médias dos diâmetros maior e menor e valores de razão entre os diâmetros dos esferoides controles no tempo de 7 dias de cultivo, n=10.....	88
Figura 15. Imagem representativa de secções teciduais de esferoides controle e fibrótico corados com HE.	89
Figura 16. Imagem representativa de secções teciduais de esferoides controle e fibrótico corados com PS.	91
Figura 17. Imagens representativas da ativação das células estreladas hepáticas nos	

esferoides multicelulares.....	93
Figura 18. Imagens representativas do colágeno tipo I nos esferoides multicelulares.	96
Figura 19. Imagens representativas do colágeno tipo III nos esferoides multicelulares.	99
Figura 20. Imagens representativas da conexina 26 (Cx26) nos esferoides multicelulares.	103
Figura 21. Imagens representativas da conexina 32 (Cx32) nos esferoides multicelulares.	107
Figura 22. Imagens representativas da conexina 43 (Cx43) nos esferoides multicelulares.	Erro! Indicador não definido. 12
Figura 23. Imagens representativas da albumina nos esferoides multicelulares. Erro! Indicador não definido.	18
Figura 24. Imagens representativas de CYP3A4 nos esferoides multicelulares.. Erro! Indicador não definido.	20
Figura 25. Imagens representativas de Ki67 nos esferoides multicelulares. Erro! Indicador não definido.	24
Figura 26. Eletromicrografias dos esferoides multicelulares. Erro! Indicador não definido.	29
Figura 27. Eletromicrografias dos esferoides multicelulares. Erro! Indicador não definido.	31
Figura 28. Eletromicrografias dos esferoides multicelulares. Erro! Indicador não definido.	3
Figura 29. Eletromicrografias dos esferoides multicelulares. Erro! Indicador não definido.	35
Figura 30. Imagens representativas da sinalização de cálcio intracelular nos esferoides multicelulares.....	Erro! Indicador não definido. 38
Figura 31. Gráficos representativos da sinalização de cálcio intracelular nos esferoides multicelulares.....	Erro! Indicador não definido. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação das conexinas expressas no fígado humano.	328
Tabela 2: Relação de anticorpos primários e diluições utilizadas.	70
Tabela 3: Relação de anticorpos secundários e diluições utilizadas.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Monocamada
3D	Tridimensional
ALD	Doença hepática alcoólica
ATP	Adenosina trifosfato
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BSA	Albumina de Soro bovino (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
CaCl	Cloreto de cálcio
CCl₄	Tetracloroeto de carbono
CEHs	Células estreladas hepáticas
CENABIO	Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem
CeSaM	Células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual
Col1	Colágeno tipo I
Col3	Colágeno tipo III
CPMP	Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão
CTNNB1	gene humano que codifica a proteína beta-catenina (do inglês <i>catheenin beta 1</i>)
Cx26	Conexina 26
Cx32	Conexina 32
Cx43	Conexina 43
Cxs	Conexinas
CYP11A1	Enzima da família do citocromo P450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol.
CYP17A1	Enzima da família do citocromo P450 da biossíntese de hormônios esteroides
CYP2E1	Enzima da família do citocromo P450 do metabolismo de xenobióticos e toxinas.
CYP3A4	Enzima da família do citocromo P450 do metabolismo dos medicamentos, toxinas e outros compostos

DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol (do inglês 4',6-diamidino-2-phenylindole)
DEN	Acetato de dietilnitrosamina
DILI	Lesão hepática induzida por drogas (do inglês drug induced liver injury)
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMN	Dietilnitrosamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EM	Esferoides multicelulares
EPM	Erro padrão da média
ERC	Células regenerativas do endométrio
F	Fluorescência
F₀	Fluorescência basal
F0	Sem fibrose
F1	Fibrose grau 1
F2	Fibrose grau 2
F3	Fibrose grau 3
F4	Fibrose grau 4
FDA	Administração de alimentos e medicamentos (do inglês Food and Drug Administration)
FH	Fibrose hepática
GRX	Linhagem de células estreladas murina
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hank (do inglês <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>)

HBV	Hepatite B viral
HCV	Hepatite C viral
HDLs	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina e eosina
HEPES	Tampão (ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinoetanossulfônico)
HepG2	Linhagem celular humana tumoral hepática (hepatócitos do ciclo celular G2)
High	Alto
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IP3	Inositol trisfosfato
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular (do inglês <i>International Society for Cellular a Therapy</i>)
ITPR	Receptor Inositol 1,4,5-trisfosfato
ITPR1	Receptor tipo 1 Inositol 1,4,5-trisfosfato
ITPR2	Receptor tipo 2 Inositol 1,4,5-trisfosfato
ITPR3	Receptor tipo 3 Inositol 1,4,5-trisfosfato
JCs	Junções comunicantes
KCl	Cloreto de potássio
Kda	Kilodalton
Ki67	Marcador de proliferação celular
LDLs	Lipoproteína de baixa densidade
Low	Baixo
LX-2	Linhagem de células estreladas humana
MASH	Esteato-hepatite associada à disfunção metabólica
MASLD	Doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica
MEC	Matriz extracelular
MenSCs	Células-tronco estromais derivadas do sangue menstrual

MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMCs	Células mesenquimais derivadas do sangue menstrual
MMPs	Metaloproteinases
MPTs	Modulação pós-traducionais
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OsO₄	Óxido de ósmio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PLAMOL	Plataforma de Microscopia Óptica de Luz Gustavo de Oliveira Castro
PLC	Fosfolipases C
PS	Picrosírius
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (do inglês <i>Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RE	Retículo endoplasmático
REG	Retículo endoplasmático rugoso
REL	Retículo endoplasmático liso
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	Fator de crescimento transformador Beta
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (do inglês, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases)
TTA	Tioacetamida
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa (do inglês Very Low Density)

Lipoprotein)

α SMA

Alfa-actina de músculo liso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	FÍGADO	25
1.1.1	Funções do fígado.....	25
1.1.2	Hepatócitos	30
1.1.3	Células estreladas hepáticas	31
1.1.4	Junções comunicantes e conexinas	34
1.1.5	Sinalização de Cálcio	38
1.2	DOENÇAS HEPÁTICAS	42
1.2.1	Fibrose hepática	44
1.2.2	MEC e o remodelamento tecidual hepático	45
1.2.3	Fibrose: Alterações nas Células hepáticas e MEC	46
1.3	MODELOS DE ESTUDOS DE DOENÇAS HEPÁTICAS	48
1.4	MODELOS 2D X 3D.....	50
1.4.1	Esferoides	53
1.5	UTILIZAÇÃO DO TGF- β PARA INDUÇÃO DE FIBROSE <i>IN VITRO</i>	56
2	JUSTIFICATIVA.....	57
2.1	A ESCOLHA DAS CÉLULAS	57
2.1.1	Linhagem de Células Tumorais Hepáticas HepG2	57
2.1.2	Linhagem de Células Estreladas Hepáticas GRX	58
2.1.3	Células Estromais Mesenquimais derivadas de Sangue Menstrual- CeSaM	59
3	OBJETIVOS	61
3.1	OBJETIVO GERAL	61
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
4.1	LINHAGENS CELULARES HepG2, GRX e CeSaM	62
4.2	CULTIVO, MANUTENÇÃO e EXPANSÃO DAS CÉLULAS	63
4.3	PREPARAÇÃO DO HIDROGEL DE AGAROSE PARA A FORMAÇÃO DOS ESFEROIDES – Solução de agarose	64
4.4	FORMAÇÃO DE ESFEROIDES MULTICELULARES CONTROLES	64
4.5	ACOMPANHAMENTO MICROSCÓPICO DA FORMAÇÃO DOS ESFEROIDES MULTICELULARES	65
4.6	PRODUÇÃO DE ESFEROIDES MULTICELULARES FIBRÓTICOS	65
4.7	VOLUMETRIA DOS ESFEROIDES MULTICELULARES	66

4.8	MEDIÇÃO DOS DIÂMETROS MAIOR E MENOR DOS ESFEROIDES MULTICELULARES CONTROLES E FIBRÓTICOS	66
4.9	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS ESFEROIDES: FIXAÇÃO, INCLUSÃO E EMBLOCAMENTO	67
4.10	COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM HEMATOXILINA E EOSINA E PICROSÍRIUS	68
4.11	IMUNOFLUORESCÊNCIA	69
4.12	PORCENTAGEM DE KI67: INDICADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	71
4.13	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO – MET	71
4.14	CRIOFRATURA	72
4.15	ANÁLISE DA SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DE CÁLCIO	73
4.16	ESTATÍSTICA.....	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1	CONFLUÊNCIA DAS CÉLULAS: HepG2, GRX e CeSaM.....	75
5.2	FORMAÇÃO DOS ESFEROIDES HEPÁTICOS.....	79
5.2.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS ESFEROIDES MULTICELULARES	79
5.3	O TRATAMENTO COM TGF- β REDUZ O VOLUME E A ESFERICIDADE DOS ESFEROIDES MULTICELULARES	82
5.4	O TRATAMENTO COM TGF- β AFETOU A ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS ESFEROIDES MULTICELULARES	88
5.5	O TRATAMENTO COM TGF- β PROMOVEU DEPÓSITO DE MATRIZ EXTRACELULAR	90
5.6	O TRATAMENTO COM TGF- β INDUZ ATIVAÇÃO DE CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS NOS ESFEROIDES MULTICELULARES.....	92
5.7	O TRATAMENTO COM TGF- β INDUZ ALTERAÇÕES NO CONTEÚDO E DISPOSIÇÃO DE COLÁGENO DO TIPO I NO ESFEROIDE MULTICELULAR	95
5.8	O TRATAMENTO COM TGF- β INDUZ ALTERAÇÕES NA DISTRIBUIÇÃO DAS JUNÇÕES COMUNICANTES FORMADAS POR CONEXINAS NO ESFEROIDE MULTICELULAR.....	101
5.9	O TRATAMENTO COM TGF- β INDUZ ALTERAÇÕES NA FUNCIONALIDADE DO ESFEROIDE MULTICELULAR	116
5.10	O TRATAMENTO COM TGF- β INDUZ ALTERAÇÕES NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DO ESFEROIDE MULTICELULAR.....	122
5.11	O TRATAMENTO COM TGF- β INDUZ ALTERAÇÕES NA ULTRAESTRUTURA DO ESFEROIDE MULTICELULAR	126
5.12	O TRATAMENTO COM TGF- β INDUZ ALTERAÇÕES NA AMPLITUDE DE SINALIZAÇÃO DE CA ²⁺ NO ESFEROIDE MULTICELULAR.....	137

6	CONCLUSÃO.....	142
	REFERÊNCIAS.....	144

1. INTRODUÇÃO

1.1 FÍGADO

O fígado é o segundo maior órgão do corpo e representa a maior massa de tecido glandular do organismo, pesando cerca de 1,5 kg em seres humanos adultos. Anatomicamente está localizado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma e acima do estômago e intestino (Campana et al., 2021; Junqueira; Carneiro, 2023). É envolto por uma fina membrana fibrosa, denominada cápsula de Glisson, revestido de tecido conjuntivo que se torna mais espesso no hilo, o qual a veia porta e a artéria hepática penetram o fígado e saem os ductos hepáticos direito e esquerdo, bem como os ductos linfáticos (Junqueira; Carneiro, 2023). É um órgão multilobular composto por quatro segmentos hepáticos denominados lobos hepáticos: lobo direito, esquerdo, quadrado e caudado (Campana et al., 2021). Possui vascularização abundante e a sua posição no sistema circulatório é privilegiada para captar, transformar e acumular metabólitos, bem como para neutralizar e eliminar substâncias tóxicas que tenham sido absorvidas pelo organismo (Gardner; Lee, 2024). Este órgão é conhecido pelo seu potencial funcional que garante a saúde do organismo.

1.1.1 Funções do fígado

Atualmente, a literatura aponta cerca de mais de 500 funções essenciais atribuídas ao fígado (Pawlina, 2025; Katawala, 2024). Dentre elas, o metabolismo de fármacos que consiste em reações enzimáticas que convertem diversas substâncias em compostos hidrossolúveis, facilitando sua excreção biliar ou urinária. O processo divide-se em Fase I, com reações de oxidação, redução, hidratação, hidrólise e isomerização, e Fase II, com reações de conjugação a moléculas polares, como ácido glucurônico e sulfato. As monooxigenases, pertencentes à família do citocromo P450, participam por cerca de 90% dessas biotransformações e são produzidas principalmente no retículo endoplasmático (REL) das células hepáticas (Junqueira; Carneiro, 2023). Assim, o processo de detoxificação é realizado pela enzima CYP3A4, responsável por metabolizar os medicamentos atualmente utilizados por via oral, além de toxinas e compostos endógenos (Klyushova et al., 2022).

As enzimas CYP, envolvidas no metabolismo dos xenobióticos, estão localizadas principalmente nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático liso (REL) dos hepatócitos. Mas, a maioria dos órgãos, como membranas intestinais, cérebro, pulmões e rins expressam enzimas CYP em graus variados (Heidarzadehpilehrood et al., 2022). Segundo Klyushova e colaboradores (2022), destacam-se como responsáveis pelo metabolismo de esteroides a CYP11A1, que catalisa a conversão do colesterol em pregnenolona, passo inicial e limitante da biossíntese dos hormônios esteroides, a CYP17A1, que participa tanto da atividade da 17 α -hidroxilase quanto da 17,20-liase, essenciais para a síntese androgenética e estrogênica e a CYP2E1, associada ao metabolismo de vários xenobióticos, a qual também está presente nas mitocôndrias, contribuindo para reações de oxidação durante a desintoxicação (Gaviria-Calle et al., 2018).

Portanto, o fígado realiza reações de metabolismo de fármacos, além de desempenhar um papel relevante na eliminação da amônia da corrente sanguínea, e na produção de fatores de coagulação, como a protrombina e fibronogênio. Além disso, o fígado sintetiza a maior parte das proteínas plasmáticas circulantes do corpo, como a albumina, produzida e secretada exclusivamente pelo órgão, que é fundamental para a manutenção do controle osmótico do plasma, mantendo o nível de glicemia e regulando os níveis circulantes das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs) (Moman, Gupta, Vacarallo, 2025). Este órgão ainda produz pequenas quantidades de outras proteínas plasmáticas, como as lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) e as lipoproteínas de alta densidade (HDLs). As LDLs transportam ésteres de colesterol do fígado para outros tecidos. Já as HDLs removem o colesterol dos tecidos periféricos e o transportam para o fígado (Pawlina, 2025).

Além disso, as glicoproteínas como a transferrina e a hepcidina, desempenham papéis centrais na regulação da homeostase do ferro. A transferrina é responsável pelo transporte do ferro no plasma, prevenindo a toxicidade pelo ferro livre, enquanto a hepcidina, hormônio peptídico produzido no fígado, controla a absorção e liberação do ferro nos tecidos (Camaschella; Nai; Silvestri, 2020). O ferro é armazenado no citoplasma das células hepáticas, na forma de ferritina, ou pode ser convertido em grânulos de hemossiderina (Pawlina, 2025). A regulação equilibrada dessas proteínas é fundamental para manter níveis adequados de ferro, evitando tanto a deficiência quanto o acúmulo excessivo, que podem causar danos celulares e disfunções

hepáticas (Camaschella et al., 2020).

Ademais, o fígado atua na geração de anticorpos, as alfa-globulinas e beta-globulinas e na resposta imunológica (Camaschella; Nai; Silvestri, 2020; Pawlina, 2025).

Este órgão ainda facilita a quebra e o armazenamento de substâncias, como o glicogênio, e atua como um reservatório de vitaminas, incluindo A, D, E, K e B12, garantindo que o corpo tenha acesso a esses nutrientes quando necessário (Moman; Gupta; Varacallo, 2025). A vitamina A desempenha um papel vital em diversas funções do organismo, incluindo a visão, o sistema imunológico e a saúde da pele. A deficiência dessa vitamina pode levar a problemas de visão, como cegueira noturna, e comprometer o sistema imunológico (Pawlina, 2025). A vitamina D atua na absorção de cálcio e fósforo, essenciais para a saúde óssea e muscular, além de exercer um papel no sistema imunológico. A vitamina E é um antioxidante que protege as células contra danos causados pelos radicais livres. Enquanto isso, a vitamina K é essencial para a coagulação sanguínea, pois ajuda na síntese de proteínas que participam desse processo. Já a B12 colabora na proteção contra deficiências, especialmente em pessoas com problemas de absorção intestinal (Moman; Gupta; Varacallo, 2025).

No fígado, processos como a glicogênese (síntese de glicogênio a partir de glicose), a lipogênese (síntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA) e a gliconeogênese (produção de glicose a partir de precursores não-carboidratos como aminoácidos, lactato e glicerol) são essenciais para manter a homeostase energética e a estabilidade dos níveis de glicose no sangue, especialmente durante jejum ou exercício (Pawlina, 2025).

Nos lóbulos hepáticos, os hepatócitos estão dispostos em placas ou ilhas que formam a unidade funcional básica conhecida como ácino hepático (Pawlina, 2025). Essa estrutura apresenta formato hexagonal, sendo delimitada pela tríade portal na extremidade e pela veia central no centro do lóbulo. Cada tríade portal contém ramos da veia porta, artéria hepática, ductos biliares e vasos linfáticos, formando o espaço porta: local onde se encontram os vasos sanguíneos fundamentais para o fígado (Arias, 2020) (Figura 1).

Dessa forma, os ácinos são delimitados pelos espaços porta: a veia porta, que traz sangue rico em nutrientes do intestino; a artéria hepática, que fornece sangue oxigenado; e os ductos biliares, responsáveis pelo transporte da bile. O sangue circula

do espaço porta pelos sinusoides, capilares fenestrados entre os hepatócitos, facilitando as trocas metabólicas (Pawlina, 2025; Paris et al., 2022).

De acordo com Paris e colaboradores (2022), o fígado é um órgão altamente vascularizado e funcionalmente heterogêneo. A partir da veia centrolobular originam-se pequenos vasos sanguíneos chamados sinusoides hepáticos. Estes, por sua vez, se entrelaçam com os cordões de hepatócitos, facilitando as trocas eficientes entre o sangue e as células hepáticas, incluindo o fornecimento de nutrientes e oxigênio, além da remoção de metabólitos e outras substâncias sintetizadas pelos hepatócitos (Pawlina, 2025; Paris et al., 2022). Essa importante e desenvolvida rede vascular contribui para a heterogeneidade metabólica e funcional dos hepatócitos ao longo do lóbulo hepático (Moman, Gupta, Varacallo, 2025).

Devido à variação no suprimento de oxigênio e nutrientes, os hepatócitos são organizados em zonas metabólicas distintas. As células próximas ao espaço porta (zona 1) recebem maior aporte de oxigênio e são especializadas em processos como gliconeogênese, β -oxidação de ácidos graxos e síntese de proteínas, como a albumina. Os hepatócitos da zona intermediária (zona 2) participam principalmente da síntese de glutamina e do metabolismo de xenobióticos. Enquanto os da zona centrolobular (zona 3) que recebe menos aporte de oxigênio e nutrientes e susceptível à hipoxia, estão envolvidos na glicólise, lipogênese e síntese de ácidos biliares (Figura 1) (Moman, Gupta, Varacallo, 2025).

Portanto, a zonação dos hepatócitos ao longo do lóbulo hepático é essencial por diferenciar a biologia dessas células, de maneira a torná-las mais especializadas em certas reações metabólicas de acordo com a localização em que as células se encontram (Moman, Gupta, Varacallo, 2025; Arias et al., 2020).

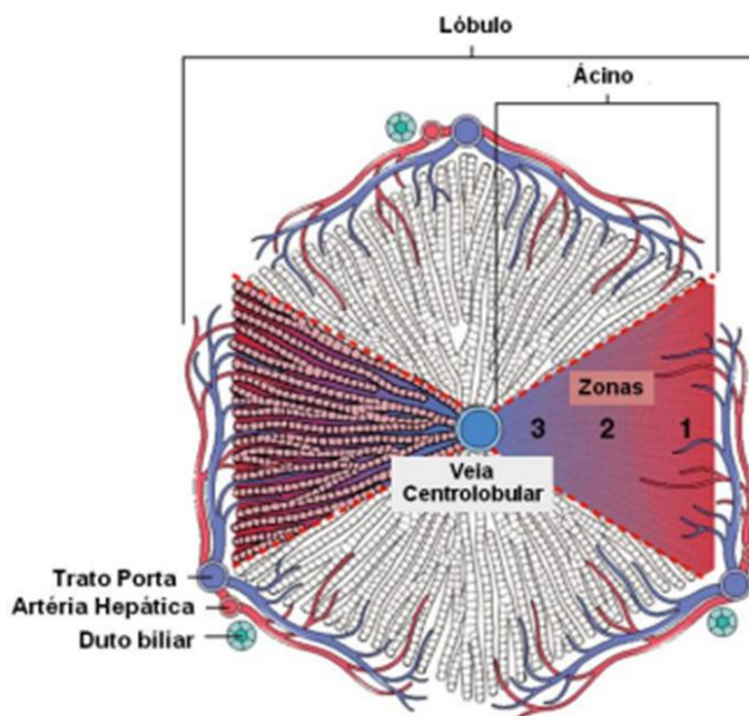


Figura 1. Representação da unidade funcional do fígado humano. A representação da unidade funcional do fígado: o ácino hepático, uma estrutura losangular, com tríades portais nos vértices e uma veia central no centro. Dentro do ácino, as três zonas, a zona 1 com maior aporte de oxigênio e nutrientes, a zona 2, intermediária e a zona 3, com menor aporte de oxigenação e nutrientes, é mais suscetível a danos por hipóxia e agentes tóxicos. Fonte: Junqueira; Carneiro, 2023.

Assim, a composição celular do fígado inclui células parenquimatosas (hepatócitos) e não parenquimáticas, como os colangiócitos, células de Kupffer, células endoteliais dos sinusoides hepáticos e CEHs, que contribuem para a imunidade, remodelamento tecidual e homeostase hepática (Pawlina, 2025). Os colangiócitos são as células que revestem os ductos biliares. As células de Kupffer, os macrófagos residentes do fígado, contribuem para a homeostase hepática por meio da remoção de patógenos, apresentação de antígenos e promoção de tolerância imunológica (Paris et al., 2022). Já as células endoteliais sinusoidais formam uma barreira fenestrada que facilita a troca de substâncias entre o sangue e os hepatócitos (Arias et al., 2020).

Coletivamente, essas e as suas demais funções estabelecem o fígado como o centro metabólico do corpo. Para desempenhar todas essas funções ele conta com uma maquinaria celular muito importante composta majoritariamente por hepatócitos.

Portanto, o fígado é um órgão que executa inúmeras funções vitais, em grande parte atribuídas às atividades especializadas realizadas pelos hepatócitos (Arias et

al., 2020).

1.1.2 Hepatócitos

O hepatócito é a célula do parênquima mais multifacetada do organismo, com funções endócrinas e exócrinas e que também detoxifica, transporta e estoca diversas substâncias (Figura 2).

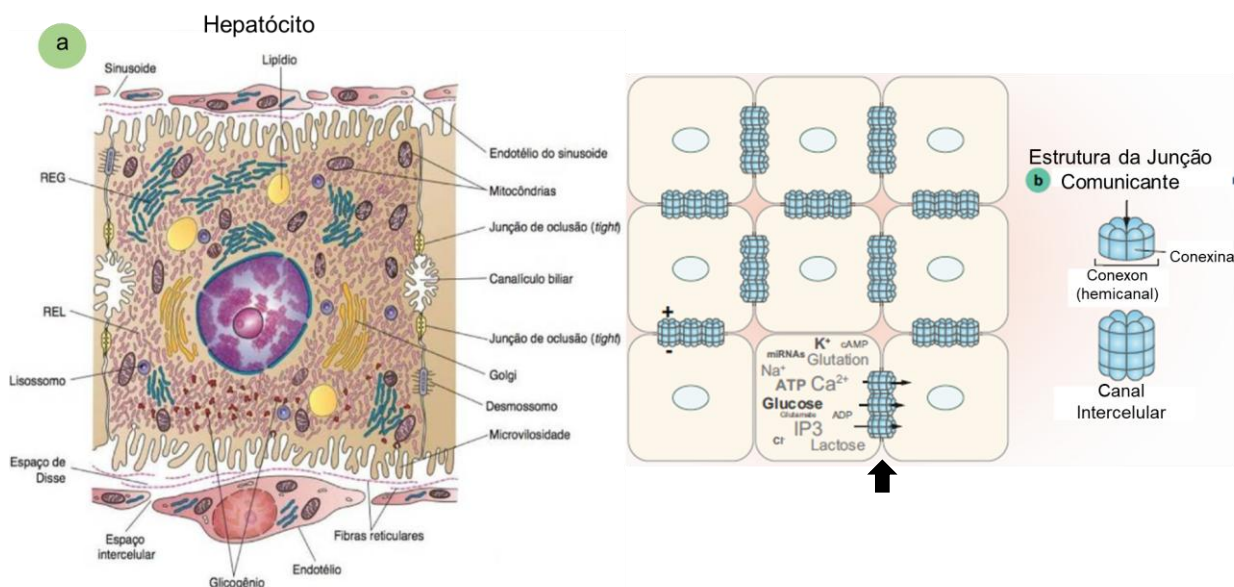


Figura 2. (a) Representação esquemática da ultraestrutura de um hepatócito. A figura mostra o núcleo central, rico em organelas, como: mitocôndrias, retículo endoplasmático: liso (REL) e rugoso (REG). Complexo de Golgi, localizados perto dos canalículos biliares. Lisossomo e inclusões: podendo conter depósitos de glicogênio ou lipídeo. As microvilosidades do hepatócito (apical e basal) e o espaço sinusoidal (sinusoide) e o endotélio do sinusoide. O espaço de Disse com fibras reticulares e o espaço intercelular entre o endotélio. Na parte baso-lateral as junções dos tipos oclusão (tight) e desmossomo. (b) Representação esquemática da estrutura da junção comunicante, evidenciando a conexina, o conexon (hemicanal) e o canal intercelular. Nota-se a seta preta indicando os canais formados pelas conexinas (junções comunicantes) que permitem a comunicação direta entre os hepatócitos adjacentes. Esses canais proteicos permitem a passagem de pequenas moléculas, como K^+ , Na^+ , cAMP, mRNAs, ATP, glicose, ADP, IP₃, lactose. Fonte: Junqueira; Carneiro, 2023.

Hepatócitos são células poliédricas, com seis ou mais superfícies, e apresentam um ou dois núcleos arredondados, contendo um ou dois nucléolos. Alguns núcleos são poliplóides e são caracterizados pelo seu tamanho maior (Junqueira; Carneiro, 2023). O citoplasma é eosinofílico, principalmente devido ao grande número de mitocôndrias, que podem chegar até cerca de 25% do volume celular (Pawlina, 2025). A célula hepática contém abundante RE, tanto liso quanto

granuloso. O REL é um sistema lábil, que reage prontamente às moléculas recebidas pelo hepatócito. Sob condições em que o hepatócito é desafiado por medicamentos, toxinas ou estimulantes metabólicos, o REL pode se tornar a organela predominante da célula, elevando assim a capacidade de detoxificação do órgão (Campana et al., 2021). Já o retículo endoplasmático rugoso (RER) é a organela responsável pelos processos de oxidação, metilação e conjugação requeridos para a inativação ou detoxificação de vários fármacos, drogas e substâncias antes de sua excreção pelo organismo. Além disso, os complexos de Golgi no hepatócito também são numerosos (Figura 2) (Gardner; Lee, 2024). As funções dessa organela incluem a formação de lisossomos e a secreção de proteínas plasmáticas (albumina, proteínas do sistema complemento), glicoproteínas (transferrina), VLDL, LDL e HDL. Geralmente o hepatócito não armazena proteínas em grânulos de secreção no citoplasma, mas secreta continuamente para a circulação sanguínea ou linfática (Junqueira; Carneiro, 2023; Pawlina, 2025).

Além dos hepatócitos, o fígado depende de outros tipos celulares para sustentar e equilibrar seu potencial metabólico.

1.1.3 Células não parenquimatosas do fígado

Na fisiologia normal do fígado, as células estreladas hepáticas (CEHs), um tipo celular não parenquimatoso, apresentam morfologia estrelada e permanecem em um estado quiescente (Kamm; McCommis, 2022). As CEHs residem no espaço de Disse e possuem corpos celulares fusiformes com núcleos ovais ou alongados (Figura 3) (Gan et al., 2025). Em relação à ultraestrutura, exibem RER moderadamente desenvolvido, complexo de Golgi reduzido e prolongamentos citoplasmáticos proeminentes (Pawlina, 2025). Essas projeções desempenham um papel importante na detecção de sinais quimiotáticos para serem transmitidos ao mecanismo da célula para gerar uma força contrátil (Kamm; McCommis, 2022). Entretanto, em consonância com esses pesquisadores, a principal função das CEHs parece ser o armazenamento de retinoides ou metabólitos contendo vitamina A dentro das gotículas lipídicas citoplasmáticas (Figura 3).

No espaço de Disse, as CEHs secretam citocinas e fatores de crescimento que nutrem as células vizinhas (Gan et al., 2025). Quando os níveis de vitamina A no sangue diminuem, o fígado mobiliza seus locais de armazenagem nas células

estreladas hepáticas para manter a homeostase sistêmica desta vitamina. Além do armazenamento, essas células exercem papel fundamental na regulação do metabolismo hepático e na resposta a lesões (Allameh et al., 2023).

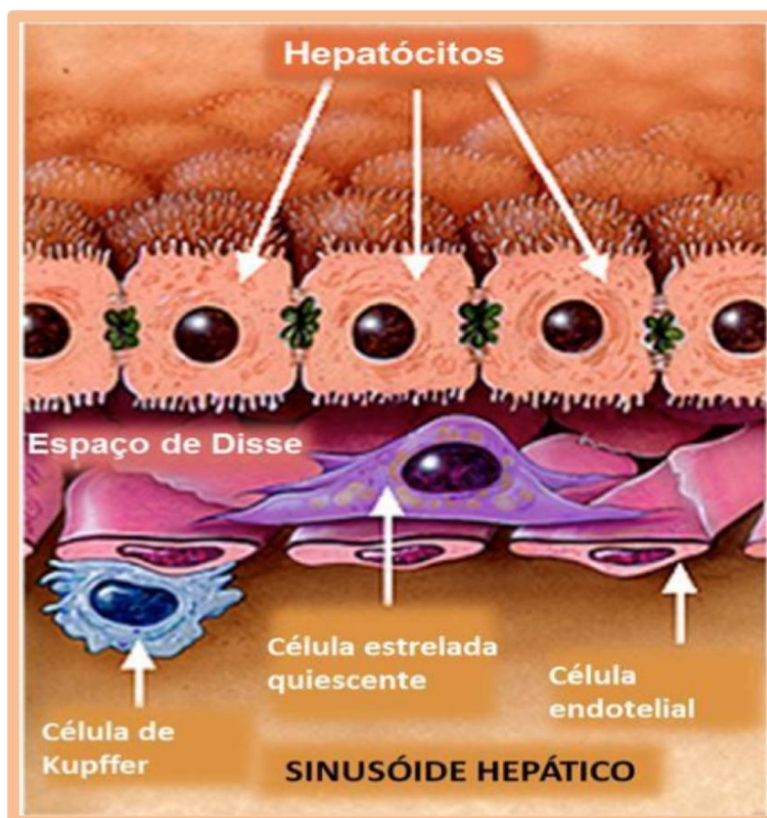


Figura 3. Representação dos tipos celulares encontrados no fígado normal. A figura mostra na parte superior os hepatócitos, com suas microvilosidades. Na parte inferior, o espaço de Disse contendo a célula de Kupffer, o macrófago tecidual, a célula estrelada quiescente, evidenciando gotículas de gordura, representando a vitamina A. A célula endotelial e o sinusóide hepático também estão demonstrados. Fonte: Junqueira; Carneiro, 2023.

As CEHs também contribuem para a manutenção da arquitetura saudável do fígado, participando do remodelamento da matriz extracelular (MEC). Elas desempenham um papel fundamental nas interações célula-célula, nas redes de citocinas e na regulação do fluxo sanguíneo sinusoidal. Além disso, participam da tolerância imunológica hepática por meio de suas propriedades imunomoduladoras para preservar a integridade estrutural e funcional do fígado (Bourebaba; Marycz, 2021).

De acordo com Kamm & McCommis (Kamm; McCommis, 2022), as CEHs constituem uma população menor, mas desempenham funções no órgão normal e em resposta a lesões. As CEHs são conhecidas principalmente pela sua ativação após

lesões hepáticas e pela produção da MEC rica em colágeno. Funções menos apreciadas dessas células incluem a amplificação da resposta inflamatória hepática e a expressão de fatores de crescimento que são críticos para o desenvolvimento do fígado e tanto para o início como para o término da regeneração hepática. Estudos recentes de sequenciamento de RNA das CEHs indicaram que a sua ativação envolve uma diversidade de alterações fenotípicas (Gan et al., 2025).

No fígado, além das CEHs, também estão presentes outros tipos celulares importantes, como os macrófagos residuais do tecido, denominados células de Kupffer, as células endoteliais sinusoidais e os colangiócitos que revestem os ductos intra e extra-hepáticos da árvore biliar, bem como contribuem para a modificação da bile derivada dos hepatócitos (Gan et al., 2025). As células de Kupffer, juntamente com outras células imunitárias, desempenham um papel fundamental na defesa contra os agentes patógenos da circulação portal. Assim, em conjunto, essas células localizadas no espaço de Disse, situado entre as superfícies basais dos hepatócitos e das células endoteliais, permitem a troca rápida de macromoléculas entre o lúmen sinusoidal e os hepatócitos (Figura 3) (Pawlina, 2025).

Segundo Gong e colaboradores (Gong et al., 2023), a plasticidade tanto dos hepatócitos quanto dos colangiócitos é um dos principais eventos que tornam a regeneração hepática possível. Em condições fisiológicas normais, essas células permanecem quiescentes, mas sob estímulos específicos entram em ciclo celular, aumentando sua capacidade proliferativa. Esse processo é controlado por um equilíbrio sincronizado entre sinais que promovem e inibem a divisão celular. Assim, essas células desempenham um papel central na prevenção da perda tecidual hepática (Gong et al., 2023; Li; Acosta; Jiang, 2023).

Diante disso, a comunicação intercelular entre hepatócitos e outras células é essencial para a manutenção do microambiente hepático e a regulação das funções celulares (Su et al., 2024). Para tal, estruturas proteicas especializadas presentes nas membranas plasmáticas das células, denominadas junções comunicantes (JCs), possibilitam essa comunicação, permitindo o transporte seletivo e direto de pequenos íons, moléculas e sinais eletroquímicos que promovem a coordenação e a integração funcional entre as células hepáticas (Pawlina, 2025; Zhou et al., 2023).

1.1.4 Conexons, junções comunicantes e conexinas

De acordo com Li e colaboradores (Li; Acosta; Jiang, 2023), os conexons são regiões especializadas da membrana plasmática que se organizam circularmente, formando hemicanais hidrofílicos transmembranares. Os conexons são compostos por proteínas da família das conexinas (Cxs) que se organizam em seis monômeros, formando hexâmeros (Figura 4).

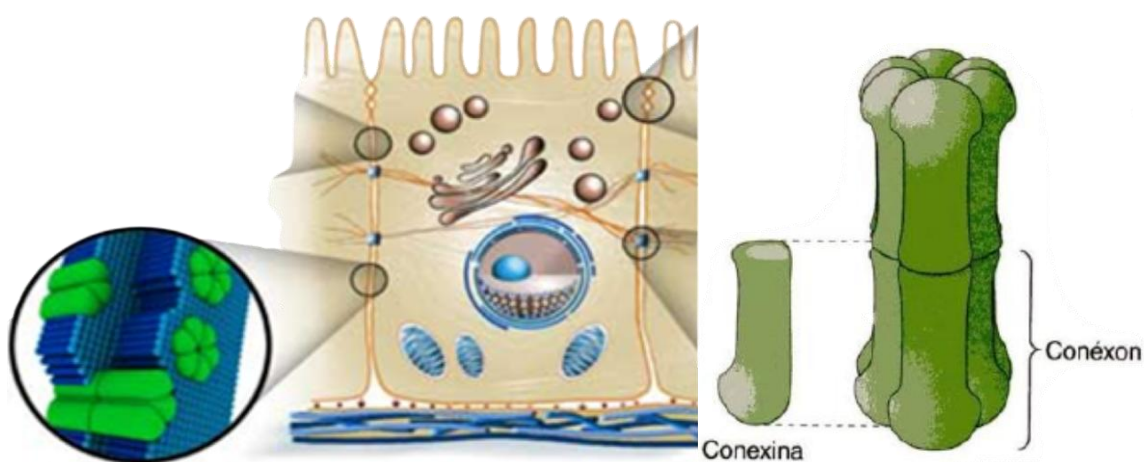


Figura 4. Representação das Junções Comunicantes formadas por Conexinas
Fonte: Junqueira; Carneiro, 2023.

Os monômeros de Cxs são inicialmente sintetizados no RER (local que ocorre o dobramento e a montagem inicial das proteínas) e, em seguida, transportados para o complexo de Golgi (podem sofrer modificações pós-traducionais), os quais se organizam em estruturas hexaméricas (Li; Acosta; Jiang, 2023). Posteriormente, essas estruturas são levadas por vesículas até a superfície da membrana celular, onde se agrupam para formar os conexons. Quando alinhados ao conexon da célula adjacente formam às JCs que conectam o citoplasma das células vizinhas permitindo a troca direta de sinais elétricos e químicos entre as células, além de conectar o interior celular com o microambiente extracelular, atuando assim como integradoras de tecidos e, portanto são fundamentais para a manutenção da homeostase tecidual (Kutova; Pospelov; Balalaeva, 2023; Zhou et al., 2023).

As conexinas são classificadas de acordo com o peso molecular (de 26 a 59 kDa), precedidas por “Cx”. Até o momento, 21 tipos foram identificados para humanos (Trevisan et al., 2019). No fígado as isoformas mais comuns são as Cxs 26, 32 e 43,

as quais estão envolvidas em processos metabólicos e respostas a danos teciduais (Willebrords et al., 2018).

O acoplamento entre conexons de células adjacentes possibilita a passagem de íons e pequenas moléculas hidrossolúveis, como íons de cálcio, sódio e potássio e pequenas moléculas mensageiras (abaixo de 1,5 KDa e hidrofílicas) como glicose, glutamato, glutathione, trifosfato de adenosina (ATP), monofosfato de adenosina cíclico, trifosfato de inositol (IP3), essenciais ao metabolismo celular (Van Campenhout et al., 2021).

A atividade das Cxs é rigorosamente regulada por processos de síntese, tráfego e degradação, além de estímulos fisiológicos como voltagem de membrana, pH e concentrações intracelulares de cálcio (Leroy et al., 2022). No fígado, as Cx26, Cx32 e Cx43 apresentam distribuição específica entre hepatócitos e células não parenquimáticas, as quais desempenham papéis centrais na comunicação intercelular (Zhou et al., 2023).

Ademais, essas proteínas podem atuar como hemicanais, estabelecendo comunicação entre o citoplasma e o meio extracelular. Embora geralmente fechados em condições fisiológicas, sob estímulos de estresse mecânico, despolarização de membrana ou alterações iônicas, podem liberar moléculas sinalizadoras, como ATP, amplificando processos inflamatórios que podem levar a lesão tecidual (Crespo Yanguas et al., 2018).

Nesse contexto, se faz necessário compreender o papel das Cxs na fisiologia hepática. Já foi demonstrado por Ajoalabady e colaboradores (2023), Leroy e colaboradores (2022) e Willebrords e colaboradores (2018), que as células hepáticas apresentam distribuição variada dessas proteínas (Tabela 1). Neste estudo, o foco foi direcionado às Cxs relacionadas ao metabolismo hepático: Cx26, Cx32 e Cx43 (Leroy et al., 2022).

A Cx26 está presente em cerca de 5% das células hepáticas e a sua principal função é manter a polaridade dos hepatócitos (Crespo Yanguas et al., 2018). Ela atua como barreira física contra a entrada de patógenos, como o vírus da hepatite B. Apresenta expressão zonada, principalmente na região periportal, onde forma canais heterotípicos com a Cx32, regulando a sinalização metabólica intralobular. A expressão da Cx26 é modulada por hormônios, como o glucagon, que induz especificamente sua transcrição (Katturajan; Evan Prince, 2021). Além disso, a Cx26

está envolvida na homeostase iônica, na regulação metabólica e no controle da divisão celular dos hepatócitos. Funcionalmente, a distribuição zonal da Cx26 permite o trânsito de sinais iônicos e metabólitos, influenciando nos processos de metabolismo glicolítico e a resposta a lesões hepáticas (Crespo Yanguas et al., 2018).

A Cx32 é a principal proteína que forma os canais de comunicação intercelular e é majoritariamente expressa em hepatócitos normais (Paštar et al., 2021). A sua função é descrita como crítica para o intercâmbio de sinais metabólicos e a resposta a lesões. Ela interage na coordenação metabólica entre os hepatócitos e está envolvida na liberação de glicose em resposta às demandas energéticas e na sinalização de cálcio intracelular. Além disso, confere maior estabilidade à Cx26 mesmo em condições de lesão (Ajooolabady et al., 2023).

Em consonância com Zhou e colaboradores (Zhou et al., 2023), a Cx32 participa ativamente da transmissão de sinais de cálcio em hepatócitos, regulando a liberação de Ca^{2+} do RE por meio dos receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (ITPR). Um mecanismo essencial para processos como proliferação celular, apoptose e metabolismo hepático. Eventos cruciais para o funcionamento e a sobrevivência das células. Alterações na homeostase do cálcio podem induzir a abertura dos hemicanais formados pela Cx32, permitindo a propagação de ondas de Ca^{2+} entre células adjacentes e fortalecendo, assim, a comunicação intercelular no fígado (Leroy et al., 2022).

Portanto, a Cx32 é vital para a integridade e função hepática, representativa na comunicação intercelular que modula respostas a lesões, bem como regula o metabolismo lipídico (Leroy et al., 2022).

Já a Cx43 é expressa principalmente em células estromais, como as CEHs (Leroy et al., 2022). Ela exerce papel regulador na proliferação celular e na resposta inflamatória, além de desempenhar efeito protetor por estar envolvida em processos de apoptose, necrose e vias de sinalização (Paštar et al., 2021). No fígado, sua expressão pode ser modulada em condições de estresse celular (Crespo Yanguas et al., 2018). As enzimas proteolíticas, as metaloproteinases (MMPs), desempenham papel crucial nesse contexto, promovendo a degradação seletiva da MEC que permite o remodelamento necessário para a regeneração e reparo dos tecidos (Shan et al., 2023). Paralelamente, as citocinas e as CEHs regulam processos inflamatórios e sinalizações que influenciam a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular.

Células residentes do sistema imunológico, como as células de Kupffer, participam ativamente da remoção de detritos celulares e da liberação de fatores de crescimento, consolidando o ambiente propício para a reparação tecidual (Zhou *et al.*, 2023).

Embora a Cx43 seja amplamente estudada no tecido cardíaco, a sua disfunção está associada a processos de remodelamento tecidual e respostas inflamatórias capazes de agravar a formação excessiva de MEC e alterações estruturais no tecido hepático (Herradón *et al.*, 2021). Achados recentes sugerem que mecanismos semelhantes também atuam no fígado, em especial, na modulação da atividade das CEHs. Dessa forma, a Cx43 destaca-se como um alvo terapêutico promissor para o controle da progressão de lesões hepáticas crônicas (Leroy *et al.*, 2022).

Além das Cxs mencionadas, de acordo com a Tabela 1, o fígado ainda apresenta as Cx37 e Cx40. Segundo Ajoalabady e colaboradores (2023), tanto a Cx37 como a Cx40 são expressas principalmente nas células endoteliais da artéria hepática e da veia porta. Essas proteínas formam canais de JCs importantes para a comunicação intercelular vascular hepática, controlando o fluxo de íons e pequenas moléculas que influenciam a função endotelial e a homeostasia hepática. Enquanto a Cx37 tem papel crucial na manutenção da integridade vascular e resposta a estímulos hemodinâmicos, a Cx40 contribui para a coordenação do tônus vascular, impactando a perfusão hepática. Assim, as Cx37 e Cx40 são essenciais para a regulação da microcirculação hepática e podem influenciar nos processos fisiológicos e em condições clínicas relacionadas à circulação hepática e à formação de tecido cicatricial (Willebrords *et al.*, 2018).

Tabela 1: Relação das conexinas expressas no fígado humano.

Conexinas	Tipos Celulares
26	Hepatócitos; CEHs; células endoteliais sinusodais; células de <i>Kupffer</i>
32	Hepatócitos; células endoteliais biliares; células endoteliais sinusodais
37	Células endoteliais da artéria hepática; células endoteliais da veia porta
40	Células endoteliais da artéria hepática; células endoteliais da veia porta
43	Células epiteliais biliares; células de <i>Kupffer</i> ; CEHs; células endoteliais sinusodais; células endoteliais da artéria hepática; células endoteliais da veia porta; células mesoteliais (cápsulas Glisson)

Fonte: (Willebrords *et al.*, 2018; modificada, Acta Cir Bras. 2019).

Diante das considerações das diferentes isoformas de Cxs, é relevante destacar um denominador comum: todas participam das vias de sinalização mediadas por mensageiros secundários, essenciais para a comunicação intercelular mediada por JCs (Ajoalabady *et al.*, 2023).

Dentre esses mensageiros, destaca-se o íon cálcio que assume papel central na regulação dessa comunicação (Ajoalabady *et al.*, 2023). A seletividade das JCs medeia sua difusão entre células adjacentes, promovendo a sincronização das ondas de cálcio (Paštar *et al.*, 2021). No fígado, o cálcio intracelular está diretamente associado a processos fundamentais, como regeneração de hepatócitos, proliferação e diferenciação celular, metabolismo energético e resposta a estímulos hormonais (Nascimento *et al.*, 2024; Guerra *et al.*, 2019).

1.1.5 Sinalização de Cálcio

O cálcio não é apenas um mediador intracelular, mas um integrador de vários processos que contribuem tanto para a manutenção da homeostase como para a progressão de lesões hepáticas (Nascimento *et al.*, 2024; Ulrich; Glaser; Thomas, 2025). A especificidade dessa via de sinalização reflete a relevância do cálcio como segundo mensageiro modulando tanto nas respostas fisiológicas como nas doenças

hepáticas (Ulrich; Glaser; Thomas, 2025).

A sinalização de cálcio nas células hepáticas só acontece via receptores de Inositol 1,4,5-trisfosfato (ITPR), os quais são os únicos canais intracelulares de cálcio. Nos hepatócitos saudáveis, as únicas isoformas encontradas são as ITPR1 e ITPR2 (Jin et al., 2021). O ITPR3 é expresso em situações patológicas como no tumor hepático (Nascimento et al., 2024). Na fisiologia normal do fígado os receptores do tipo ITPR ajudam a regular as funções hepáticas (Guerra et al., 2019).

Segundo Guerra e colaboradores (Guerra et al., 2019), a expressão e localização de diferentes isoformas de ITPR podem influenciar a resposta celular. A isoforma ITPR1 desempenha um papel crucial no metabolismo e proliferação de hepatócitos, funções essenciais para o fígado normal. Outra função do ITPR1 nos hepatócitos está relacionada à regeneração hepática. Já o ITPR2 exibe uma função essencial no fígado, regulando a formação de bile e a secreção de bicarbonato, bem como regenerando hepatócitos (Jin et al., 2021).

A sinalização de cálcio nas células hepáticas ocorre quando um agonista, como hormônios ou fatores de crescimento, se liga aos receptores de membrana plasmática dos hepatócitos, ativando as fosfolipases C (PLC) por meio das subunidades beta e gama (Guerra et al., 2019). Essas enzimas clivam o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), um lipídio essencial das membranas celulares que serve como precursor dos segundos mensageiros. A clivagem da molécula PIP2 gera o IP3, mensageiro secundário, que se difunde no citoplasma para ligar-se ao receptor ITPR1/2. Assim, os canais são abertos e o cálcio do RE é liberado para o citoplasma ou nucleoplasma (Ajoalabady et al., 2023; Guerra et al., 2019).

De acordo com Ajoalabady e colaboradores (Ajoalabady et al., 2023), o aumento da concentração intracelular de cálcio é crucial para ativar diversas funções hepáticas, como a secreção de albumina e ácidos biliares, regulação da proliferação celular, uma característica essencial dos hepatócitos para a regeneração tecidual, além da regulação da transcrição gênica e indução da apoptose. Assim, alterações na homeostasia do cálcio intracelular podem comprometer a resposta frente a estímulos fisiológicos e adversos, evidenciando sua importância para a manutenção do equilíbrio estrutural e funcional do fígado (Ajoalabady et al., 2023; Guerra et al., 2019).

Diante desse cenário, torna-se essencial compreender as interações com a MEC e os mecanismos de remodelamento tecidual, especialmente em contextos de reparo

e regeneração hepática (GAN *et al.*, 2025). Além da presença de células especializadas, as JCs, os íons de cálcio e diversas proteínas, como albumina, globulinas, lipoproteínas, fatores da coagulação, entre outras, o fígado também conta com a MEC hepática, atuando em conjunto, para manutenção da homeostase tecidual (PAWLINA, 2025).

A MEC hepática saudável é composta por uma rede tridimensional complexa que inclui uma ampla gama de macromoléculas distintas (Arias *et al.*, 2020). Entre essas, destacam-se os colágenos, principalmente o tipo I que está presente em grandes quantidades e, em menores proporções, dos tipos III, IV, V, VI, VII e VIII, além de glicosaminoglicanos (GAGs), fibronectina, laminina, entactina e tenascina (Pawlina, 2025). Os colágenos fibrilares principais (colágeno I, III, V e VI) conferem suporte e integridade estrutural ao parênquima hepático, enquanto o colágeno tipo IV, em associação com laminina, entactina e tenascina, delimita a membrana basal e favorece a adesão e organização celular (Arias *et al.*, 2020).

Nesse contexto, destacam-se os GAGs, que possuem carga negativa e atraem cátions, os quais retêm moléculas de água, contribuindo para a adequada hidratação da MEC hepática (Gan *et al.*, 2025). Ademais, GAGs e proteoglicanos participam ativamente na modulação da rigidez da matriz, controlando a difusão de nutrientes e o equilíbrio mecânico do microambiente hepático (Gartner; Hlatt, 2024). Essa estrutura da MEC não apenas oferece suporte físico aos tecidos, mas também atua como um microambiente dinâmico que regula o comportamento celular, influenciando processos como crescimento, diferenciação e motilidade celular (Pawlina, 2025; Arias *et al.*, 2020).

No fígado, a MEC confere propriedades mecânicas fundamentais ao órgão, como elasticidade e rigidez, essenciais para sua integridade estrutural e funcional. Além disso, ela facilita a troca e distribuição de fluidos através dos tecidos, proporcionando um ambiente que sustenta a atividade metabólica intensa das células hepáticas. As interações contínuas entre as células hepáticas - tanto parenquimatosas quanto não parenquimatosas - e a MEC promovem essas características de suavidade, elasticidade e resistência, garantindo a funcionalidade adequada do fígado (Arias *et al.*, 2020).

Por ser constituída por várias proteínas, dentre elas, os colágenos, pode orientar a manutenção do fenótipo dos hepatócitos, influenciando sua diferenciação e

especialização tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A manutenção e a degradação dessas proteínas influenciam diretamente processos biológicos, tal como crescimento, proliferação, diferenciação e migração celular (Arias et al., 2020). Essa modelação ocorre por meio de sinais bioquímicos e mecânicos que a MEC transmite às células, essencial para a integridade e funcionalidade do tecido hepático (Dzobo; Dandara, 2023).

Em fígados adultos, a MEC é constituída principalmente por fibronectina, que se destaca como componente estrutural e funcional fundamental, seguida por grande proporção de colágenos tipos I e III, além de proteoglicanos sulfatados. Apresenta ainda, em menor proporção, laminina, ácido hialurônico e colágeno tipo IV (Arias et al., 2020).

A fibronectina e o colágeno tipo I são descritos como sendo envolvidos na diferenciação do epitélio do ducto biliar *in vitro*. Por outro lado, a laminina e o colágeno tipo IV são amplamente expressos no tecido conjuntivo hepático, incluindo a veia porta. A laminina e o colágeno tipo IV poderiam potencializar a capacidade do colágeno tipo I na indução do processo de formação do epitélio das vias biliares (Arias et al., 2020).

Em um fígado saudável, os componentes da MEC são encontrados no espaço de Disse, na região periportal, nas paredes das veias centrais e na cápsula de Glisson. A MEC está distribuída de forma heterogênea ao longo do ácino hepático (Arias et al., 2020; Pawlina, 2025).

O espaço de Disse é composto por colágenos fibrilares do tipo I, III e V e colágeno microfibrilar VI. Já a matriz intersticial contém mais dos colágenos fibrilares e moléculas associadas e menos componentes da membrana basal. Ela é mais densa e é em grande parte confinada para a área da tríade portal, das veias centrais e da cápsula do fígado (Arias et al., 2020).

É importante afirmar que a deposição de MEC é uma parte substancial do processo de cicatrização, que ocorre em coordenação com a regeneração hepatocelular. A síntese de MEC facilita a regeneração do dano tecidual e fornece indução positiva para os processos de reparação (Arias et al., 2020). A MEC hepática não é apenas um suporte estrutural, mas um ambiente dinâmico que regula adesão, migração, diferenciação e sobrevivência celular (Ortiz et al., 2021).

De acordo com Ortiz e colaboradores (Ortiz et al., 2021), em condições

fisiológicas, existe um equilíbrio entre síntese e degradação da MEC, mediado por enzimas proteolíticas como metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs). As MMPs são responsáveis pela degradação controlada dos componentes da matriz, incluindo colágenos, essenciais para a remodelamento tecidual no fígado saudável (Shan et al., 2023). Essa atividade permite a manutenção da homeostase da MEC sem comprometer a integridade estrutural do órgão (Shan et al., 2023).

Já os inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) regulam a atividade dessas enzimas, formando um equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação das proteínas e glicoproteínas da MEC (Shan et al., 2023). Tal balanço MMPs/TIMPs é fundamental para preservar o funcionamento fisiológico hepático, controlando processos de reparos durante a regeneração e manutenção do tecido (Ortiz et al., 2021).

Nesse contexto, o metabolismo da MEC hepática depende de um sistema sincronizado que mantém a função do órgão por meio de *feedback* positivo (Arias et al., 2020). Como é um órgão complexo com funções digestivas, endócrinas e imunorreguladoras, o torna fundamental para manter a homeostase fisiológica através das suas funções no metabolismo, resposta imunitária e por seu papel crucial na detoxificação (Shan et al., 2023). Dessa forma, o fígado por estar constantemente exposto a muitos agentes tóxicos, fica suscetível a desenvolver diversas injúrias. Apesar da sua capacidade regenerativa, é importante abranger as principais causas e estatísticas das doenças hepáticas para destacar a urgência de elucidar os mecanismos e estratégias de intervenção (Devarbhavi et al., 2023).

1.2 DOENÇAS HEPÁTICAS

De acordo com Devarbhavi e colaboradores (Devarbhavi et al., 2023) as doenças hepáticas representam uma importante causa de morbidade e mortalidade no mundo, com cerca de 2 milhões de mortes por ano, o que equivale a aproximadamente 4% de todas as mortes globais. No Brasil, um estudo recente revelou que as mortes por doenças hepáticas correspondem cerca de 3% do total de óbitos no país, gerando um custo anual de aproximadamente 300 milhões de reais (Guimarães et al., 2024).

Um número significativo de brasileiros é afetado por doenças hepáticas decorrentes do consumo abusivo de álcool e do aumento da obesidade, que são considerados importantes problemas de saúde pública. Segundo o Boletim

Epidemiológico de Hepatites Virais do Ministério da Saúde (Brasil, [S.d.]), foram confirmados 25.063 novos casos de hepatites virais em 2024, sendo a hepatite B a mais prevalente, seguida pelas hepatites C e A. Entre 2000 e 2024, o Brasil acumulou mais de 826 mil casos confirmados de hepatites virais, com prevalência assegurada da hepatite C e B (Gan et al., 2025).

As doenças hepáticas abrangem uma gama diversificada de disfunções e podem ser desencadeadas por múltiplos agentes etiológicos (Gan et al., 2025). De acordo com Tacke e colaboradores (Krenkel et al., 2019), entre as principais etiologias destacam-se as hepatites virais (HBV, HCV), a doença hepática relacionada ao álcool (ALD), a lesão hepática induzida por fármacos (DILI) e as doenças metabólicas associadas à disfunção hepática, como a doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (MASLD) e sua forma progressiva, a esteato-hepatite associada à disfunção metabólica (MASH) (Le et al., 2025).

Segundo Gan e colaboradores (Gan et al., 2025), as doenças do fígado representam uma diversidade de distúrbios caracterizados por lesão dos hepatócitos, infiltração de células inflamatórias e ativação das CEHs, que, cumulativamente, prejudicam a função hepática e perturbam a sua arquitetura. As doenças hepáticas agudas resultam frequentemente de infecções por vírus hepatotrópicos, embora a lesão hepática induzida por medicamentos (DILI) também esteja tornando-se cada vez mais prevalente em todo o mundo (Tacke et al., 2024). Por outro lado, as doenças hepáticas crônicas surgem normalmente de fatores agressores como o consumo de álcool, infecções pelo vírus da hepatite B (VHB) e pelo vírus da hepatite C (VHC), juntamente com uma incidência crescente de doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica (MASLD) (Buttler et al., 2025).

Segundo Buttler e colaboradores (Buttler et al., 2025), a MASH caracteriza-se pela presença de esteatose, inflamação lobular e degeneração hepatocelular, podendo evoluir para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. Atualmente, estima-se que até 25% da população mundial apresente algum grau de MASLD, e cerca de 20% desses casos progridam para MASH, refletindo o impacto da obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica sobre o fígado. O diagnóstico definitivo frequentemente depende de biópsia hepática, o que limita intervenções precoces e eficazes (Tacke et al., 2024; Krenkel et al., 2019).

O transplante hepático permanece, até o momento, a única alternativa viável

para pacientes em fase terminal. No entanto, a escassez de doadores representa uma limitação significativa para a efetividade dessa estratégia (Gan et al., 2025).

A ausência de biomarcadores biológicos para o diagnóstico preciso e o estadiamento de doenças hepáticas específicas representa um desafio significativo (Le et al., 2025). Como tal, o desenvolvimento de novos biomarcadores e métodos não invasivos é crucial para a detecção precoce de doenças hepáticas assintomáticas. Esses avanços podem ajudar a identificar mais cedo os indivíduos de alto risco, permitindo intervenções precoces para interromper a progressão da doença (Buttler et al., 2025; Le et al., 2025).

Embora tenha havido um progresso notável na compreensão da origem e progressão das doenças hepáticas por meio de tecnologias avançadas, as opções terapêuticas aprovadas pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) continuam limitadas, e as intervenções médicas existentes muitas vezes proporcionam benefícios mínimos de sobrevivência a longo prazo (Gan et al., 2025). A complexidade da fisiopatologia das doenças hepáticas e a heterogeneidade substancial dos fenótipos das doenças significam que os modelos atuais em modelos animais não mimetizam adequadamente todo o espectro das doenças hepáticas humanas, incluindo ALD e MASLD e MASH (Ulrich; Glaser; Thomas, 2025).

Um dos maiores desafios científicos está em compreender como esses mecanismos se alteram diante das diversas doenças hepáticas (Buttler et al., 2025). Em todas elas, independente do tipo de injúria, a fibrose hepática constitui o ponto determinante, considerada como o denominador comum e preocupante dos distúrbios hepáticos (Leroy et al., 2022; Ulrich; Glaser; Thomas, 2025).

1.2.1 Fibrose hepática

A fibrose hepática (FH) é um processo dinâmico de reparo e cicatrização que ocorre em resposta a lesões agressivas, agudas ou crônicas no fígado resultante do desequilíbrio entre síntese e degradação de colágenos e proteínas da MEC (Parola; Pinzani, 2019; Ulrich; Glaser; Thomas, 2025). É caracterizada pela infiltração de células do sistema imunológico que promovem inflamação e estimulam a deposição excessiva de MEC, principalmente nas regiões periportais e pericentradas, alterando a arquitetura do fígado (Paula et al., 2025). Esse processo dinâmico ocorre em um

ambiente inflamatório, envolvendo diferentes tipos celulares, citocinas e fatores de crescimento, que desequilibram o microambiente hepático. A ativação das CEHs após lesão é o principal gatilho que aumenta a produção de colágenos tipo I e III, fibronectina e laminina, os principais componentes da MEC na fibrose (Garbuzenko, 2022; Vieira et al., 2024).

1.2.2 MEC e o remodelamento tecidual hepático

O acúmulo excessivo de MEC comprime os sinusoides, aumenta a resistência ao fluxo sanguíneo, reduz a difusão de oxigênio e prejudica a troca metabólica, contribuindo para isquemia e morte celular (Parola; Pinzani, 2019; Vieira et al., 2024). Em casos de lesão persistente, a deposição contínua de proteínas da MEC e a redução da atividade das MMPs que degradam essa matriz levam à formação de tecido fibrótico que substitui a MEC normal (De Zawadzki et al., 2025). Em estágios iniciais, a FH é um processo dinâmico e potencialmente reversível, entretanto a sua progressão culmina na cirrose, estágio avançado com alterações que podem ser irreversíveis (Vieira et al., 2024).

Em condições fisiológicas, a homeostase da MEC é regulada e orquestrada por um equilíbrio entre os processos de fibrogênese e fibrólise, que correspondem, respectivamente, à síntese e à degradação das macromoléculas fibrosas responsáveis por prover suporte estrutural e funções biológicas aos tecidos multicelulares (De Zawadzki et al., 2025). O desequilíbrio entre esses processos, induzido pela natureza crônica da lesão hepática, desencadeia a fibrose. Esta é altamente conservada e desenvolvida em resposta à lesão crônica do parênquima composto por hepatócitos (Vieira et al., 2024). Assim, a morte dessas células induz um processo inflamatório, mediado pela ativação do inflamossomo e recrutamento de células imunológicas, como os macrófagos teciduais e CEHs, que se diferenciam em miofibroblastos produtores de colágeno, promovendo remodelação cicatricial da MEC (Wang et al., 2023a).

Em consonância com De Zawadzki e colaboradores (De Zawadzki et al., 2025), o conceito de fibrose “quente” está associado à intensa infiltração imune e inflamação, enquanto a fibrose “fria” é marcada por baixa resposta inflamatória e ativação de miofibroblastos por vias autócrina/parácrina. Essa nomenclatura tem relevância clínica, pois identifica os graus de reversibilidade, em especial aquelas que envolvem

modulação do sistema imune e potenciais respostas terapêuticas (De Zawadzki et al., 2025).

De acordo com Cheemerla & Balakrishnan (Cheemerla; Balakrishnan, 2021), a gravidade da fibrose pode ser classificada em estágios de acordo com o grau de tecido cicatricial presente (Figura 5).

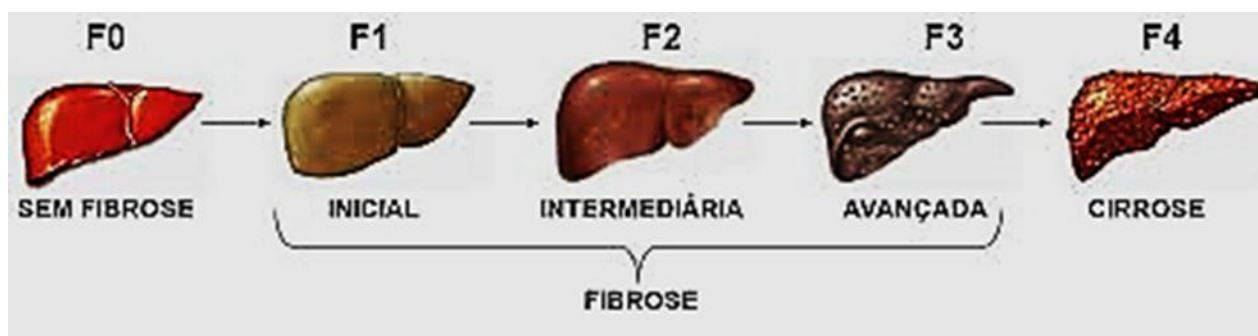


Figura 5. Representação da classificação dos estágios de gravidade da fibrose hepática.

F0 (sem fibrose); **F1**: inicial, fibrose leve; **F2**:intermediária, fibrose que se estende para áreas próximas à veia porta; **F3**: avançada, fibrose que se estende além das áreas da veia porta, formando várias pontes de fibrose que conectam a veia porta às regiões centrais do fígado; **F4**: evolução para cirrose, caracterizada por uma destruição significativa da arquitetura hepática e formação de nódulos de regeneração. Fonte: *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2022.

Ainda que a cirrose represente o estágio terminal, estudos recentes relatam que a regressão é possível quando o agente agressor da lesão seja removido, reforçando o potencial de intervenções antifibróticas (Akkız; Gieseler; Canbay, 2024).

Assim, aprofundar os estudos sobre a dinâmica e biologia das CEHs e compreender os seus mecanismos celulares, é fundamental, visto que essas células constituem o papel central na perpetuação do processo fibrótico. Desta forma, estas podem representar um alvo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras contra a fibrose (Sauer et al., 2024).

1.2.3 Fibrose: Alterações nas Células hepáticas e MEC

As CEHs são responsáveis pelos processos fibróticos que ocorrem em resposta a morte de hepatócitos e/ou estímulos inflamatórios, incluindo as células de Kupffer, plaquetas, leucócitos e células endoteliais sinusoidais (Pawlina, 2025). Em condições normais, as CEHs que estavam quiescentes começam a proliferar e sofrem transdiferenciação para células semelhantes a miofibroblastos. Estes são as

principais células fibrogênicas no fígado fibrótico e no fígado normal são derivados de pericitos mesenquimais residentes, ou CEHs (Sauer et al., 2024). São proliferativos, migratórios, contráteis e segregam proteínas da MEC (Figura 6). Estas funções contribuem normalmente para a reparação dos tecidos em condições homeostáticas, mas a ativação sustentada em doenças hepáticas crônicas conduz à fibrose, onde são detectáveis pela expressão da desmina (células quiescentes) e da alfa-actina do músculo liso (α SMA - em células ativadas) (Wang et al., 2023a).

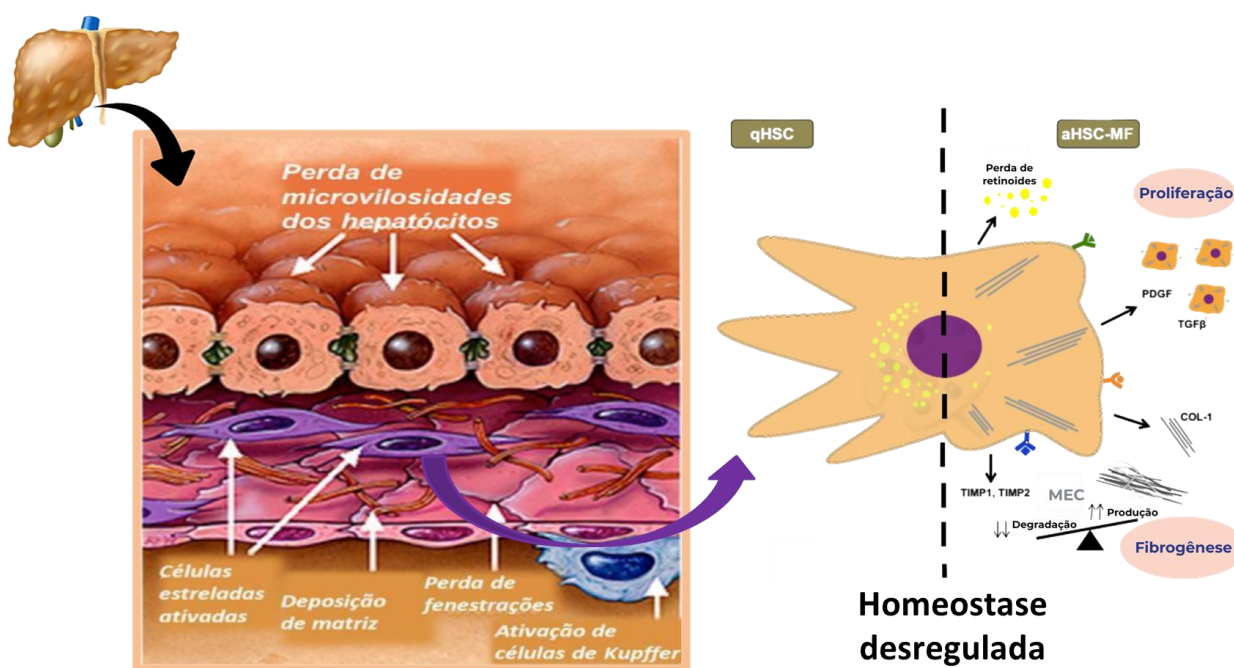


Figura 6. Representação das alterações nas células hepáticas e MEC na fibrose hepática. Células estreladas quando ativadas mudam seu fenótipo fibroblástico de células quiescentes para miofibroblastos, deixam de armazenar vitamina A e proliferam devido ao ambiente inflamatório, estimulando fatores de crescimento na tentativa de reparar o tecido. Esse processo leva ao acúmulo de colágeno, principalmente o colágeno tipo I, formando tecido cicatricial. Embora a cicatrização seja um processo normal na fibrogênese, no estágio de fibrose ocorre um desequilíbrio, com produção excessiva de colágeno e proteínas da matriz, ou seja, na fibrose, ocorre o desbalanço entre as MMPs e TIMPS, seus inibidores. Essa deposição de matriz altera os perfis de colágenos, levando a perda de fenestrações das células endoteliais, com a ativação das células de kupffer. A homeostase desse fígado fica desregulada prejudicando a comunicação intercelular entre os hepatócitos que estão lesionados, com perda de suas microvilosidades. Fonte: Junqueira; Carneiro, 2023.

De acordo com Khomich e colaboradores (Khomich; Ivanov; Bartosch, 2019), as CEHs ativadas perdem suas gotículas de lipídios (vitamina A), proliferam rapidamente e aumentam significativamente uma série de genes, especialmente relacionados à síntese de colágenos, fibronectinas, laminina e ácido hialurônico (Figura 6). A comunicação intercelular mediada por JCs é fundamental para a

homeostase e metabolismo das CEHs. Essas células são ativadas por alterações na despolarização da membrana, variações de cálcio intra e extracelular, estresse mecânico, oxidativo, isquêmico e inflamatório (Willebrords et al., 2018).

Além disso, elas também produzem citocinas pró-fibrogênicas, fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas, que por sua vez regulam e impactam a arquitetura do tecido. As células de Kupffer, os macrófagos teciduais também podem estimular a ativação e proliferação das CEHs por meio das ações de citocinas, e em particular o fator de crescimento transformador β (TGF- β) (Khomich; Ivanov; Bartosch, 2019).

As alterações observadas nas células e na MEC evidenciaram a complexidade dos processos que sustentam a fibrose hepática. Nesse cenário, as contextualizações dos modelos de estudos existentes na literatura reforçam a importância de investigar a fisiopatologia das doenças hepáticas e impulsionar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Sauer et al., 2024).

1.3 MODELOS DE ESTUDOS DE DOENÇAS HEPÁTICAS

Apesar dos avanços em modelos animais e monocamadas celulares, ainda há uma necessidade de desenvolver modelos translacionais mais precisos que reproduzam a complexidade do microambiente do fígado (Ezhilarasan, 2023).

Segundo Fu e colaboradores (2024), um sistema experimental baseado em modelos celulares, esferoides e organoides oferece um potencial translacional para o estudo da progressão da esteato-hepatite associada à disfunção metabólica (MASH) e da fibrose hepática. Esses modelos podem reproduzir o microambiente hepático lesionado pela doença, permitindo investigar os mecanismos moleculares envolvidos bem como avaliar as intervenções terapêuticas. Desta maneira, esse se apresentaria como um sistema que pode representar os pontos críticos na evolução das doenças crônicas do fígado. Neste sentido, ainda é possível indicar as disparidades significativas entre os modelos animais e as condições humanas em termos de fisiopatologia e resultados do tratamento, uma vez que numerosos ensaios clínicos demonstraram que os medicamentos eficazes em modelos animais não oferecem benefícios clínicos em humanos (FU et al., 2024).

De acordo com Kim e colaboradores (Kim et al., 2025), as propriedades de absorção química, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade diferem entre as

espécies, resultando em doses de medicamentos que são benéficas e não tóxicas em animais, mas que apresentam eficácia insuficiente ou causam efeitos secundários em humanos. Esta discrepância sublinha a necessidade de desenvolver outros modelos mais padronizados, que possam preencher estas lacunas e melhorar o sucesso translacional.

Para compreender os mecanismos envolvidos na fibrose hepática e avaliar novas abordagens terapêuticas, diversos modelos experimentais têm sido desenvolvidos, abrangendo sistemas *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, cada um com vantagens e limitações (Li et al., 2024).

Os modelos *in vivo*, baseados em animais, principalmente em camundongos e ratos, continuam sendo utilizados por reproduzirem a complexidade fisiológica e imunológica do fígado. Dentre os agentes químicos mais empregados para indução de fibrose destacam-se o tetracloreto de carbono (CCl₄) (Cui et al., 2025), a tioacetamida (TAA), a dimetilnitrosamina (DMN) (Karmacharya et al., 2022) e o acetato de dietilnitrosamina (DEN) (Wang et al., 2023b). Esses agentes são capazes de promover lesão hepatocelular, inflamação e deposição de colágenos. Modelos de obstrução biliar, como a ligadura do ducto biliar (Piazza et al., 2024), são utilizados para investigar fibrose de origem colestática. Já as abordagens dietéticas, como dietas deficientes em metionina e colina ou ricas em gordura, permitem explorar a relação entre disfunção metabólica e fibrose, mimetizando aspectos da MASLD/MASH (Fu et al., 2024).

Em paralelo, os modelos *in vitro* oferecem maior controle experimental e menor variabilidade biológica. As culturas bidimensionais (2D) de CEHs isoladas são amplamente utilizadas para estudar mecanismos de ativação e regulação gênica, embora apresentem rápida perda de características morfológicas *in vivo* (Kim et al., 2025; Xie et al., 2025). Para superar essas limitações, os modelos 3D, como esferoides e organoides hepáticos, têm ganhado destaque por mimetizarem de forma mais fidedigna a arquitetura e o microambiente hepático. Esses sistemas permitem investigar a interação entre CEHs, hepatócitos e células imunes (Moro et al., 2024; Pingitore et al., 2019; Rabiet et al., 2024). Além disso, permitem a quantificação de colágenos, a análise da expressão de marcadores como α -SMA, Colágenos I e III e TGF- β 1, bem como estudos farmacológicos com maior relevância translacional (Pingitore et al., 2019; Sedda et al., 2025).

Os modelos *ex vivo*, como os de perfusão hepática e os cortes de tecido de precisão (precision-cut liver slices, PCLS), preservam a integridade das interações celulares e da MEC, representando um elo intermediário entre sistemas simplificados e o organismo completo. Esses modelos são singularmente úteis para explorar toxicidade de fármacos, respostas inflamatórias e mecanismos de reparo tecidual em tecidos humanos ou animais (Geng et al., 2025; Li et al., 2024).

Assim, a integração entre esses diferentes modelos tem sido relevante para aprofundar o entendimento dos mecanismos de fibrose e para o desenvolvimento de terapias antifibróticas (Geng et al., 2025). Enquanto os modelos *in vivo* oferecem um contexto fisiológico sistêmico, os modelos *in vitro* e *ex vivo* proporcionam abordagens mecanísticas e reprodutíveis, essenciais para a triagem de compostos e validação de alvos moleculares (Li et al., 2024). A combinação dessas estratégias representa, portanto, o caminho mais promissor para o avanço no estudo e tratamento das doenças hepáticas (Sedda et al., 2025).

Nesse cenário, a linhagem de células proveniente de câncer humano (HepG2) têm sido amplamente utilizada em estudos metabólicos e toxicológicos (Kasprzak-Drozd et al., 2024), as células estrelares hepáticas (GRX) representa um modelo relevante para investigar a ativação das CEHs e os mecanismos de fibrose (Codotto et al., 2025), e as células estromais mesenquimais do sangue menstrual, as CeSaM, despontam como fonte promissora de suporte aos outros tipos celulares devido ao seu potencial proliferativo e ação parácrina (Moro et al., 2024).

Assim, a integração dessas três populações celulares oferece um modelo abrangente para compreender processos metabólicos, fibrogênicos e regenerativos no fígado, ampliando a relevância translacional dos achados.

1.4 MODELOS 2D X 3D

De acordo com Moro e colaboradores (Moro et al., 2024), os modelos de cultura 2D baseiam-se no crescimento de uma única linhagem celular sobre superfícies planas e aderentes, como placas de Petri ou frascos de cultura, contendo meio suplementado. Essa técnica pode ser empregada a diferentes tipos de tecidos e linhagens celulares e, historicamente, contribuiu de forma fundamental para o avanço das ciências biomédicas devido à sua simplicidade, baixo custo e reprodutibilidade (Vis; Ito; Hofmann, 2020).

Apesar dessas vantagens, os sistemas 2D evidenciam limitações importantes. O ambiente plano e rígido dessas culturas restringe as interações célula-célula e célula-MEC, o que interfere na polaridade, na morfologia e na organização celular (Figura 7). Essa configuração estática pode alterar a expressão gênica e a resposta fisiológica das células, comprometendo a fidelidade em relação aos processos que ocorrem *in vivo* (Langhans, 2018; Vis; Ito; Hofmann, 2020). Contudo, o cultivo 2D representa uma ferramenta importante para ensaios de toxicidade e viabilidade celular, sendo amplamente útil para analisar os efeitos de compostos terapêuticos, genotoxicidade e mutagênese (Moro et al., 2024).

Tradicionalmente, estudos em toxicologia e farmacologia se baseavam nesses modelos 2D e em experimentos com animais. No entanto, ambas as abordagens apresentam limitações significativas, como a ausência de interações 3D e a expressão reduzida de enzimas metabólicas essenciais, incluindo as da família do citocromo P450, especialmente em linhagens hepáticas como a HepG2, cuja atividade enzimática limitada restringe sua aplicabilidade em estudos de metabolismo de fármacos (Kim et al., 2025; Zingales et al., 2023).

Nesse contexto, os modelos 3D (Figura 7) surgem como uma alternativa que reproduz de forma semelhante às condições fisiológicas. Esses sistemas permitem que as células cresçam e interajam em três dimensões, reproduzindo de forma mais próxima a arquitetura e as funções dos tecidos vivos (Saxton; Stevens, 2023).

Assim, nas culturas 3D, diferentes tipos celulares podem ser organizados dentro de uma MEC, o que favorece a difusão adequada de nutrientes, oxigênio e fármacos, além de viabilizar uma resposta metabólica mais próxima do fisiológico (Lee; Pathak; Jeong, 2019).

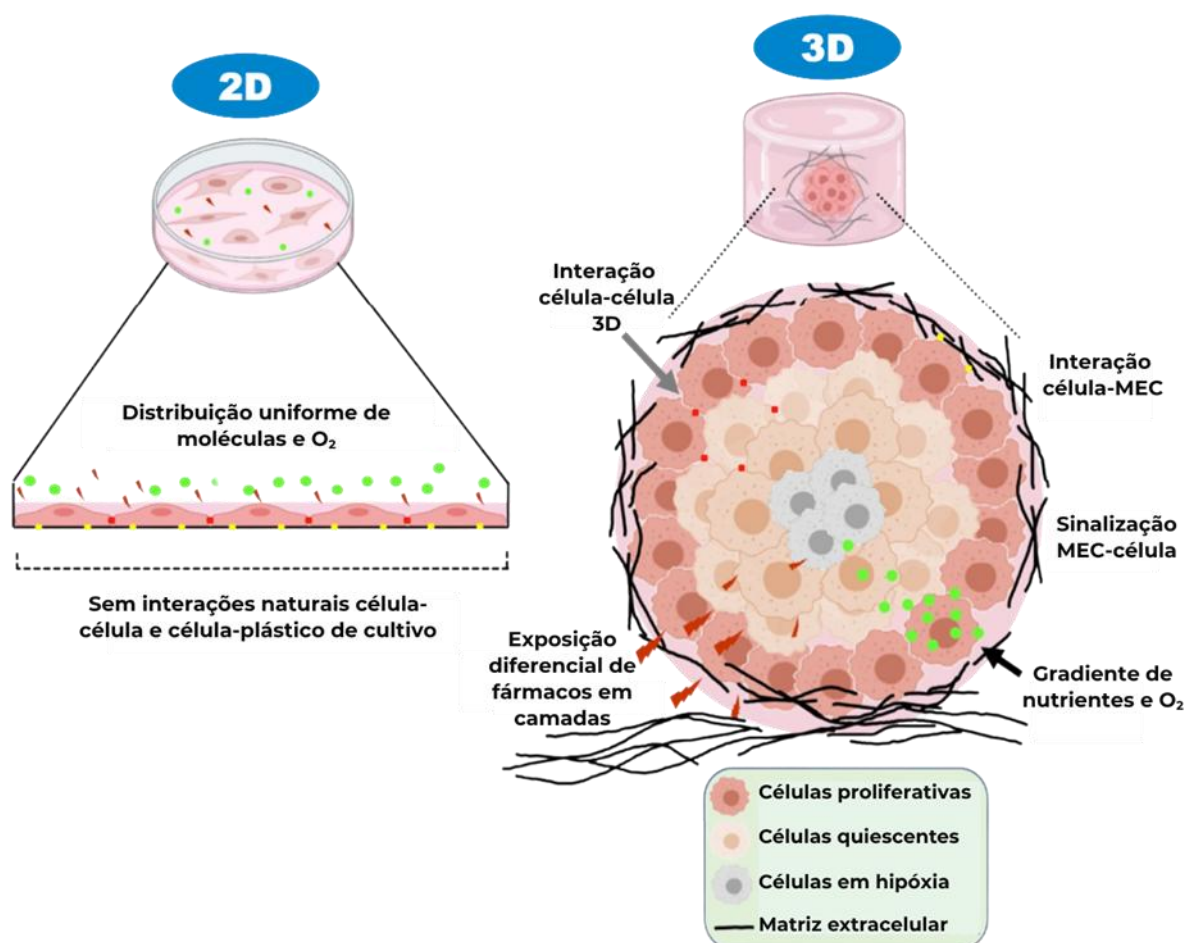


Figura 7. Representação dos modelos de culturas 2D e 3D. No modelo 2D tradicional, as células crescem na forma de monocamada ao longo de uma superfície plana, sem interações naturais. Todas as células estão expostas às mesmas concentrações de nutrientes, oxigênio e fármacos. No modelo 3D de cultivo, as células estão em contato com diferentes gradientes de oxigênio e nutrientes. Com interações célula-célula, célula-MEC, sinalização MEC-célula e exposição diferencial de fármacos em camadas. Fonte: Salinas-Vera e colaboradores (2022).

Com o aperfeiçoamento dessas tecnologias, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) passou a reconhecer a relevância dos modelos 3D em protocolos regulatórios, integrando-os progressivamente às suas diretrizes de teste. A OECD representa um marco importante para a substituição e redução do uso de animais, ao mesmo tempo em que aumenta a eficácia e o valor preditivo dos testes *in vitro* (OECD, 2025; Zingales et al., 2023).

O aprimoramento de modelos que conciliem representatividade biológica e redução de experimentação animal foi crucial para o avanço científico (OECD, 2025). As culturas 3D superam as restrições dos sistemas 2D ao mimetizar de forma mais precisa a organização e o comportamento dos tecidos (Bose; Clevers; Shen, 2021). Segundo Salinas-Vera (Salinas-Vera et al., 2022), nos organismos humanos, as

células estão organizadas de forma 3D e heterogênea; a distribuição de nutrientes, oxigênio e metabólitos é influenciada pela difusão através da MEC, pela proximidade da microcirculação e pelo metabolismo celular.

Entre os modelos 3D relatados na literatura, incluem os sistemas baseados em matrizes 3D, que empregam hidrogéis ou *scaffolds* para permitir interações célula-matriz complexas; os organoides, derivados de células-tronco com alto grau de auto-organização e funcionalidade; e os “organ-on-chip”, que acoplam microfluídica e cultura celular para simular condições fisiológicas dinâmicas (Kirpes; Hu; Sly, 2022; Moro et al., 2024). Entre esses modelos, os esferoides destacam-se por oferecer um equilíbrio entre simplicidade experimental, custo reduzido e relevância biológica (Park; Park; Suh, 2024).

Dessa forma, a utilização de cultura 3D, como os esferoides, representa um avanço significativo na investigação dos mecanismos relacionados à fibrose hepática, oferecendo uma compreensão mais integrada da comunicação intercelular e da remodelação tecidual (Park; Park; Suh, 2024).

1.4.1 Esferoides

É interessante pensar que o modelo de cultivo de esferoides usa a tendência natural de muitos tipos celulares de se agregarem. Eles podem ser formados por culturas de uma única ou de múltiplas células, sendo uma ferramenta biotecnológica promissora para a identificação de novos fármacos ou alvos terapêuticos (Abuwatfa; Pitt; Hussein, 2024). Os esferoides podem ser definidos como unidades morfofuncionais miméticas de um tecido vivo, podendo ser produzidos a partir de um ou mais tipos celulares. Esses agregados esféricos se auto-organizam de maneira espontânea ou mediante estímulos externos, sem a necessidade de um substrato de adesão. Assim, são úteis em muitas estratégias de terapia celular e medicina regenerativa (Moro et al., 2024). Esses microtecidos destacam-se por oferecer um equilíbrio entre simplicidade experimental, custo reduzido e relevância biológica. Eles permitem interações célula-célula mais próximas das condições *in vivo*, sendo amplamente aplicados em estudos de toxicidade, triagem de fármacos e modelagem de doenças (Park; Park; Suh, 2024).

Ao contrário dos modelos 2D, que restringem a expressão de enzimas como o citocromo P450, os esferoides podem favorecer a restauração das atividades

metabólicas específicas, bem como promover uma comunicação celular mais representativa do tecido *in vivo*. Uma ferramenta biotecnológica promissora para a identificação de novos fármacos ou alvos terapêuticos (Salinas-Vera et al., 2022).

Nos últimos anos, modelos baseados em esferoides hepáticos têm se destacado como ferramentas estratégicas para reproduzir a complexidade funcional do fígado *in vitro* (Abuwatfa et al., 2024). Dessa forma, esta estrutura 3D não só favorece o crescimento celular, como também facilita a difusão de nutrientes, metabólitos e oxigênio, fundamentais para a manutenção da viabilidade e funcionalidade celular (Abuwatfa et al., 2024).

De acordo com Park e colaboradores (Park; Park; Suh, 2024), os esferoides podem oferecer propriedades físicas e químicas, incluindo porosidade controlada, permeabilidade, química superficial e propriedades mecânicas que mimetizam a MEC natural. Entre esses modelos, destacam-se os esferoides formados exclusivamente por HepG2, que apresentam capacidade de autoagregação e mantêm parcialmente funções hepáticas *in vitro* para respostas a fármacos e viabilidade celular (Abuwatfa; Pitt; Hussein, 2024).

Abordagens recentes têm explorado co-culturas heterotípicas, integrando hepatócitos com células endoteliais sinusoidais e macrófagos, com o objetivo de recriar um microambiente mais fisiológico e interativo (Abuwatfa et al., 2024). Essa integração celular favorece a viabilidade, a polarização e a manutenção das funções hepáticas ao longo do tempo (Abuwatfa et al., 2024).

Além dos modelos homotípicos e heterotípicos, um estudo mais recente realizado por Kim e colaboradores (2024), têm explorado o uso de células-tronco pluripotentes humanas (hPSCs) na formação de esferoides hepáticos. Esses pesquisadores desenvolveram estruturas 3D auto-organizadas derivadas de hPSCs, capazes de reproduzir a complexidade do microambiente hepático, como metabolismo, toxicidade e resposta a agentes externos. Assim, configurando-se como uma plataforma promissora para testes farmacológicos e de hepatotoxicidade (Kim et al., 2024).

Outros achados a fim de obter a formação de microtecidos organizados, tem utilizado diversas linhagens celulares para serem exploradas nesse contexto. Entre as mais utilizadas estão os hepatócitos humanos HepG2, amplamente empregados por sua alta capacidade proliferativa e manutenção de funções metabólicas, e as

CEHs humanas (LX-2), importantes para o estudo dos mecanismos de fibrose em um ambiente 3D (Moro et al., 2024; Park et al., 2024). Outra linhagem descrita é a HepaRG, que apresenta diferenciação mais próxima das células hepáticas primárias, permitindo análises mais realistas da toxicidade e metabolismo de fármacos (Park et al., 2024).

A principal vantagem do modelo de esferoide hepático é permitir a formação de gradientes com diferentes tipos celulares (Moro et al., 2024). Nesse modelo, as células se agregam simultaneamente, formando camadas distintas: a externa, com maior penetração de oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento, citocinas e fármacos; a intermediária; e a central, a qual há menor aporte dessas substâncias (Park; Park; Suh, 2024). Então o esferoide multicelular pode mimetizar a organização tecidual do ácino hepático, caracterizado por zonas (Figura 8).

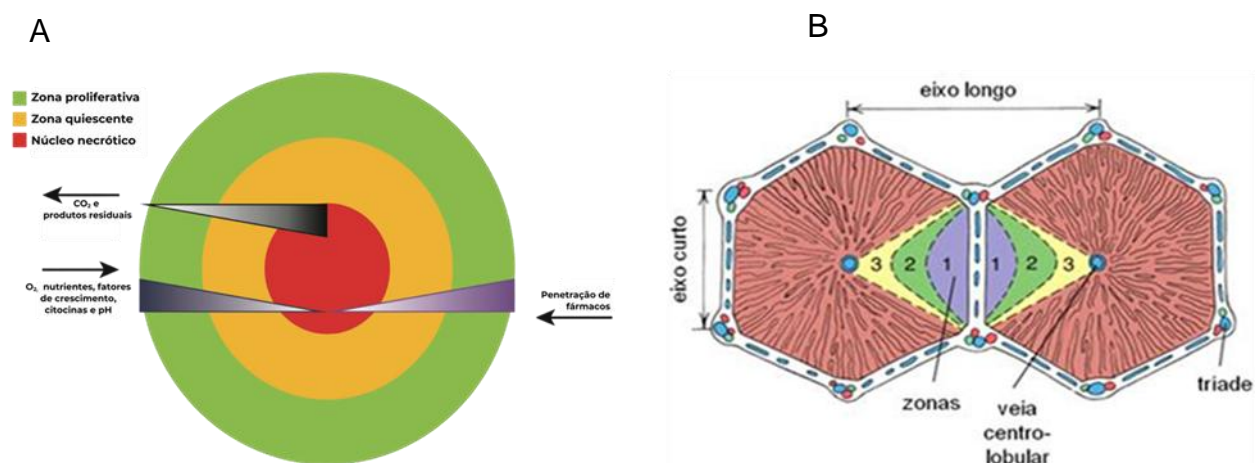


Figura 8. Representação esquemática da estrutura do esferoide multicelular e a organização do ácino hepático. **(A)** Representação das camadas distintas de um esferoide multicelular: a camada externa (verde), com maior difusão de oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento, citocinas e fármacos; a camada intermediária (amarela) a zona quiescente; e a região central (vermelha), correspondente ao núcleo necrótico, caracterizado pela baixa disponibilidade dessas substâncias. **(B)** Organização tecidual do ácino hepático, segmentado em zonas funcionais, ilustrando a semelhança estrutural e fisiológica com o modelo de esferoide. Fonte: Adaptado de *Image-Based Characterization of 3-D Cell Culture Models Grown in Spheroid Microplates* (American Laboratory, 2023) e Pawlina, 2025.

Assim, com o aperfeiçoamento do mimetismo do microambiente hepático *in vivo*, tornou-se possível avançar em estratégias para indução controlada da fibrose em cultura celular (Lee et al., 2022). Esse modelo de EM representa uma ponte essencial entre os estudos pré-clínicos e a aplicação clínica, oferecendo uma plataforma robusta para investigar a fibrose com maior importância fisiológica (Dominijanni; Devarasetty; Soker, 2020).

1.5 UTILIZAÇÃO DO TGF- β PARA INDUÇÃO DE FIBROSE *IN VITRO*

Dada a importância de estudar a fibrose, diferentes estratégias foram criadas para mimetizá-la *in vitro*. Dentre elas destaca-se o uso de citocinas como o TGF- β . Segundo Dominijanni; Devarasetty; Soker, (2020). O fator TGF- β é considerado um agente crítico na fibrose crônica de muitos órgãos, incluindo o fígado. A expressão simultânea de proteínas TGF- β e MEC durante modelos experimentais de fibrose hepática propõe a possibilidade de que essa citocina desempenhe um papel fundamental no desenvolvimento de fibrose (Hurrell et al., 2020).

Mannaerts e Dominijanni (2020) aplicaram o TGF- β em culturas CEHs, para induzir a transição fenotípica de fibroblastos em miofibroblastos. A sua ativação é processo essencial para a deposição excessiva de MEC. Eles mostraram que essa citocina, regula a síntese e reparo tecidual durante a fibrose. Um mecanismo central para a progressão da fibrose hepática que fundamenta os processos fisiopatológicos envolvidos. Já Hurrell e colaboradores (2020) realizaram seus estudos em modelos *in vivo*, utilizando camundongos submetidos a indução de fibrose hepática por diferentes agentes fibrogênicos. Além disso, fizeram análises de tecidos humanos com fibrose. Esses experimentos demonstraram a co-expressão de TGF- β e proteínas da MEC em regiões fibróticas dos fígados, evidenciando o papel dessa citocina na progressão do processo fibrótico (Hurrell et al., 2020).

Lee e colaboradores (2022) utilizaram modelos 3D, tal como organoides e esferoides, tratados com TGF- β para simular o microambiente fibrótico e viabilizar o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos. Outros achados de Guzzeloni e colaboradores (2022) e Khomich e colaboradores (2020), aplicaram o fator TGF- β em sistemas celulares e 3D, demonstrando sua capacidade de estimular a proliferação de fibroblastos, produção da MEC e remodelamento tecidual.

Portanto, diferentes modelos foram abordados, culturas celulares, esferoides, organoides, modelos animais e amostras humanas, o que confere relevância translacional ao nosso estudo. A escolha do TGF- β como agente indutor da fibrose hepática nos modelos experimentais apresentados neste trabalho encontrou respaldo para investigar a fibrose hepática em esferoides multicelulares

2. JUSTIFICATIVA

2.1 A escolha das células

Uma grande variedade de tipos celulares existe e podem ser empregados para mimetizar o tecido hepático. Frente a isso, o presente estudo utilizou três diferentes tipos celulares.

As células HepG2, GRX e CeSaM foram selecionadas por sua relevância na representação dos principais compartimentos do fígado. Essa associação permitiu investigar, de forma integrada, a fibrose hepática e seus efeitos nas junções comunicantes. Abaixo estão descritas algumas informações gerais sobre cada uma delas.

2.1.1 Linhagem de Células Tumorais Hepáticas HepG2

A linhagem imortalizada de hepatócitos tumorais humano, as HepG2, é uma importante ferramenta experimental derivada de um tumor hepático humano. Ela foi isolada em 1975 e originalmente descrita como derivada de um hepatocarcinoma, obtida a partir de uma biópsia hepática de um indivíduo caucasiano masculino, de 15 anos, diagnosticado com hepatocarcinoma bem diferenciado (Arzumanian; Kiseleva; Poverennaya, 2021).

Ainda que por décadas tenha sido referida como hepatocarcinoma, estudos posteriores esclareceram que a célula HepG2 é derivada de um hepatoblastoma, um tipo de tumor hepático maligno predominante em crianças, caracterizado por um fenótipo epitelial e um cariótipo hiperdiploide que varia entre 48 e 54 cromossomos por células (López-Terrada et al., 2009; Ranganathan; Lopez-Terrada; Alaggio, 2020). De acordo com Arzumanian e colaboradores esta distinção é fundamental, pois o hepatoblastoma representa um tumor embrionário, o que confere às HepG2 propriedades moleculares e funcionais diferentes das lesões no carcinoma hepatocelular adulto. Dentre elas, destaca-se a exclusão do terceiro éxon do gene CTNNB1, que confere a origem embrionária da HepG2 e contribui para o seu padrão proliferativo e contínuo (Arzumanian; Kiseleva; Poverennaya, 2021; Ranganathan; Lopez-Terrada; Alaggio, 2020).

A morfologia dessas células é epitelial, com aspecto arredondado e crescem, geralmente, aderidas ao plástico de cultura, proliferam sobrepostas e formam

aglomerados confluentes (clusters), conforme descrito pelo fabricante em sua folha de dados (catálogo: C3A [HepG2/C3A, derivative of HepG2 (ATCC HB-8065)] (ATCC® CRL-10741™)). Além disso, elas apresentam uma fácil manutenção e estabilidade fenotípica em cultura, o que foi caracterizado em trabalho anterior do grupo (Pimentel, 2017, 2019).

As células HepG2 são usadas frequentemente como um modelo de cultivo *in vitro*, pois essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas características das células normais do fígado, como por exemplo, a albumina, protrombina e fibrinogênio (Pawlina, 2025). E permanece a ser amplamente utilizada em estudos de metabolismo hepático, toxicologia e sinalização celular.

2.1.2 Linhagem de Células Estreladas Hepáticas GRX

A linhagem de células estreladas murina contínua (GRX) foi obtida a partir de granulomas fibróticos induzidos no fígado de camundongos C3H/HeN por infecção experimental com *Schistosoma mansoni*. A morfologia celular da linhagem GRX mostra que possuem núcleos semiesféricos nucleolares, que se tornam alongados e recuados nas células que cresceram em multicamadas, apresentando características típicas de CEHs, evidenciando sua plasticidade fenotípica (Schröder et al., 2022).

Essa linhagem é capaz de produzir tecido conjuntivo e MEC, apresentando características morfológicas típicas de miofibroblastos e pode, em condições adequadas, acumular gotículas de gordura. As células GRX apresentam um fenótipo altamente proliferativo (Kamm; McCommis, 2022). Por sua origem no tecido conjuntivo, elas expressam proteínas da MEC, incluindo colágenos tipo I, III e IV, além de vimentina e fibronectina. A expressão de alfa-actina de músculo liso (α -SMA) confirma sua derivação de CEHs e indica a aquisição de um fenótipo ativado (Schröder et al., 2022). Essa dualidade fenotípica confirma a sua plasticidade e reforça a importância da linhagem GRX como modelo para estudos das CEHs e seu papel fundamental nos processos biológicos. Essas células ativadas são responsáveis pela capacidade de adaptação, tornando-se um modelo interessante para o estudo dos mecanismos celulares envolvidos em reparo, remodelamento e respostas adaptativas dos tecidos (Dos Santos et al., 2025).

2.1.3 Células Estromais Mesenquimais derivadas de Sangue Menstrual- CeSaM

As células CeSaM são obtidas por métodos não invasivos, pois é um material descartado. Essas células vem sendo utilizadas pelo nosso grupo desde 2008 (Asensi et al., 2014). Além das propriedades comuns às células estromais mesenquimais, conforme a orientação da Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (ISCT): aderência ao plástico quando mantidas em condições padrão de cultura; expressar mais de 90% dos antígenos CD29, CD73, CD90 e CD105, e não expressar os antígenos CD34, CD45, CD14 e o antígeno leucocitário humano HLA-DR na superfície e a capacidade de diferenciação *in vitro* em adipócitos, condrócitos e osteócitos. Segundo Santos e colaboradores (Santos et al., 2014), quando cultivadas com células-tronco embrionárias, as CeSaM atuam como uma camada alimentadora. No trabalho da Gonçalves e colaboradores (Gonçalves et al., 2020), é demonstrado que embriões de camundongos se desenvolvem melhor quando cultivados sobre a CeSaM. Sugerindo que a expansão em larga escala é possível em uma proposta terapêutica, já que estas células não apresentam alterações no fenótipo e nem anormalidades em seu cariótipo.

Assim, as células CeSaM são capazes de aderir ao suporte de cultura, exibir uma morfologia fibroblastoide, além de apresentarem uma alta taxa de proliferação dobrando a sua população em 19-36 horas. A imunofenotipagem é preservada após a 68ª passagem enzimática (Carvalho; Goldenberg, 2021).

Portanto, a CeSaM, por ser uma célula estromal mesenquimal, atua como suporte estrutural, fornecendo estabilidade aos demais tipos celulares nas culturas *in vitro*. Isso torna-se uma tarefa desafiadora diante da complexidade envolvida em reproduzir o microambiente hepático necessário para que as células desempenhem e mantenham as suas características e funções adequadamente. Essa complexidade funcional reforça a relevância do desenvolvimento de modelos experimentais que mimetizem a organização e as interações celulares observadas *in vivo*, como as culturas já descritas na literatura: 2D e 3D (Vis; Ito; Hofmann, 2020).

No caso do fígado, por representar um órgão multicelular, a formação de EM pode ser interessante para reproduzir de forma mais próxima o microambiente hepático. A combinação de HepG2 (hepatócitos), GRX (CEHs) e CeSaM (células estromais mesenquimais) constitui um modelo promissor para investigar os

mecanismos envolvidos na fibrose hepática (Kim et al., 2025).

TOTAL DE FOLHAS: 150