



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA – BACHARELADO**

**EFEITOS DA BENZOFENONA-2 E BENZOFENONA-3 SOBRE O METABOLISMO,  
A MIGRAÇÃO E A INTEGRIDADE NUCLEAR DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS  
HTR-8/SVNEO**

**ALINE DA SILVA LIMA**

Foz do Iguaçu  
2025

**EFEITOS DA BENZOFENONA-2 E BENZOFENONA-3 SOBRE O METABOLISMO, A  
MIGRAÇÃO E A INTEGRIDADE NUCLEAR DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS  
HTR-8/SVNEO**

**ALINE DA SILVA LIMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz

Coorientador: Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa

Foz do Iguaçu  
2025

ALINE DA SILVA LIMA

**EFEITOS DA BENZOFENONA-2 E BENZOFENONA-3 SOBRE O METABOLISMO, A  
MIGRAÇÃO E A INTEGRIDADE NUCLEAR DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS  
HTR-8/SVNEO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz  
UNILA

---

Profa. Dra. Nathalia Correa Chagas de Souza  
UNILA

---

Profa. Msc. Vyctória dos Santos Ramos  
UFABC

Foz do Iguaçu, 17 de dezembro de 2025.

Dedico este trabalho a quem, sem interesses que sirvam a si, decide permanecer por aquilo que é genuinamente afeto.

## AGRADECIMENTOS

Concluir este trabalho vai além de encerrar um ciclo acadêmico. Representa um processo exitoso de avanço na jornada, graças às experiências e, sobretudo, às pessoas que sustentaram cada etapa do percurso.

Agradeço aos meus orientadores, **Jorge Ruiz** e **Weber Feitosa**, pela parceria, pelo esmero, pelos ensinamentos e pelo acompanhamento constante. À **Universidade Federal da Integração Latino-Americana**, pelas portas abertas; aos coordenadores do Curso de Biotecnologia, **Michel Passarini** e **Cristian Rojas**, por assumirem a liderança e se dedicarem ao curso com tanta garra e prontidão; e aos **professores** que, destacando-se no exercício da profissão, ampliaram meus conhecimentos científicos e o meu olhar humano.

Agradeço às pessoas que permaneceram por afeto verdadeiro. Sobretudo a **Andre Mafra**, pelos anos de partilha, cuidado inigualável, apoio e presença genuína em todos os meus momentos, desde o início até à conclusão da graduação. À sua família, que me acolheu por legítima bondade e altruísmo, quando o sangue não foi suficiente para sustentar permanência e cuidado. À minha irmã, **Liane Gouveia**, por sua generosidade e força, sendo sempre uma fonte de inspiração. À minha amiga de longa data, **Ester Moraes**, pela presença constante, configurando a família que perdura.

Agradeço também aos amigos que fiz nesta jornada — **Paula Rafaela, Leonardo Ruiz, Maria Catalan, Ilenia Nava, Sebastián Marquez, Luis Enrique, Laura Beatriz, Matheus Moraes, Wara Zanga, Ivan Mateo, Guilherme Vinicius e Fernando Guerra** — pois foi por meio de vocês que a trajetória se tornou mais leve, divertida e enriquecedora.

Sou grata ao processo em sua essência singular: às alegrias, aos obstáculos e aos recomeços, que me instigaram à resiliência e à superação. Destaco, como ponto-chave do meu percurso, a frase de Cora Coralina: *“Recria tua vida, sempre, sempre. Remove pedras e planta roseiras e faz doces. Recomeça.”*

Por fim, este trabalho é, para além de uma marca de conclusão, um gesto de retribuição — fruto do que recebi e do que desejo devolver ao mundo.

*Vivemos do que recebemos, mas construímos uma vida  
com o que damos.*

**Winston Churchill**

## RESUMO

A exposição humana a contaminantes ambientais, como os filtros ultravioleta (UV), é uma crescente preocupação para a saúde reprodutiva. As benzofenonas (BPs), amplamente aplicadas em produtos de consumo, atravessam a barreira placentária, mas seus efeitos diretos na função trofoblástica permanecem pouco elucidados. O presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar os efeitos da Benzofenona-2 (BP-2) e Benzofenona-3 (BP-3) sobre a viabilidade metabólica, integridade nuclear, estado oxidativo e capacidade migratória de células trofoblásticas humanas de primeiro trimestre *in vitro* (linhagem HTR-8/SVneo). A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT (24, 48 e 72h) para determinação do IC50, enquanto a funcionalidade celular foi analisada pelo ensaio de cicatrização (*scratch assay*). Adicionalmente, uma triagem multiparamétrica com as sondas Hoechst 33342, Iodeto de Propídio (PI) e CellROX® Green foi empregada para avaliar densidade celular, necrose e estresse oxidativo. Os resultados demonstraram que a BP-2 induziu toxicidade metabólica severa em 24h, enquanto a BP-3 apresentou um perfil de toxicidade cumulativa ao longo do tempo. No ensaio funcional, a BP-3 inibiu significativamente a migração celular ( $p < 0,01$ ), impedindo o fechamento da ferida. A análise multiparamétrica revelou um fenômeno de retenção celular nos grupos tratados, onde as células permaneceram fisicamente aderidas e com núcleos íntegros, mas metabolicamente deprimidas e incapazes de migrar, sem detecção de morte celular lítica ou surto oxidativo nas condições testadas. Conclui-se que as BPs testadas comprometem a fisiologia trofoblástica por mecanismos distintos, onde a BP-2 causa choque metabólico e a BP-3 induz um estado de quiescência e paralisia funcional da invasão, sugerindo que a exposição a estes compostos pode contribuir para falhas na placentação, como na pré-eclâmpsia, independentemente da morte celular imediata.

**Palavras-chave:** benzofenona; trofoblasto; HTR-8/SVneo; migração celular; toxicidade; placenta.

## RESUMEN

La exposición humana a contaminantes ambientales, como los filtros ultravioleta (UV), es una preocupación creciente para la salud reproductiva. Las benzofenonas (BPs), ampliamente aplicadas en productos de consumo, atraviesan la barrera placentaria, pero sus efectos directos sobre la función trofoblástica siguen siendo poco claros. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar y comparar los efectos de la Benzofenona-2 (BP-2) y la Benzofenona-3 (BP-3) sobre la viabilidad metabólica, integridad nuclear, estado oxidativo y capacidad migratoria de células trofoblásticas humanas del primer trimestre *in vitro* (línea HTR-8/SVneo). La citotoxicidad se evaluó mediante el ensayo MTT (24, 48 y 72 h) para determinar la IC50, mientras que la funcionalidad celular se analizó mediante el ensayo de cicatrización (scratch assay). Adicionalmente, se empleó un cribado multiparamétrico con las sondas Hoechst 33342, Yoduro de Propidio (PI) y CellROX® Green para evaluar densidad celular, necrosis y estrés oxidativo. Los resultados demostraron que la BP-2 indujo una toxicidad metabólica severa a las 24 h, mientras que la BP-3 presentó un perfil de toxicidad acumulativa a lo largo del tiempo. En el ensayo funcional, la BP-3 inhibió significativamente la migración celular ( $p < 0,01$ ), impidiendo el cierre de la herida. El análisis multiparamétrico reveló un fenómeno de retención celular en los grupos tratados, donde las células permanecieron físicamente adheridas y con núcleos íntegros, pero metabólicamente deprimidas e incapaces de migrar, sin detectarse muerte celular lítica ni estallido oxidativo en las condiciones probadas. Se concluye que las BPs testadas comprometen la fisiología trofoblástica por mecanismos distintos, donde la BP-2 causa un choque metabólico y la BP-3 induce un estado de quiescencia y parálisis funcional de la invasión, sugiriendo que la exposición a estos compuestos puede contribuir a fallos en la placentación, como en la preeclampsia, independientemente de la muerte celular inmediata.

**Palabras clave:** benzofenona; trofoblasto; HTR-8/SVneo; migración celular; toxicidad; placenta.

## ABSTRACT

Human exposure to environmental contaminants, such as ultraviolet (UV) filters, is a growing concern for reproductive health. Benzophenones (BPs), widely applied in consumer products, cross the placental barrier, yet their direct effects on trophoblast function remain poorly elucidated. The present study aimed to evaluate and compare the effects of Benzophenone-2 (BP-2) and Benzophenone-3 (BP-3) on metabolic viability, nuclear integrity, oxidative status, and migratory capacity of first-trimester human trophoblast cells (HTR-8/SVneo line). Cytotoxicity was assessed by the MTT assay (24, 48, and 72h) to determine IC<sub>50</sub>, while cellular functionality was analyzed by the wound healing (scratch) assay. Additionally, a multiparametric High Content Screening using Hoechst 33342, Propidium Iodide (PI), and CellROX® Green probes was employed to assess cell density, necrosis, and oxidative stress. Results showed that BP-2 induced severe acute metabolic toxicity at 24h, whereas BP-3 exhibited a cumulative toxicity profile over time. In the functional assay, BP-3 significantly inhibited cell migration ( $p < 0.01$ ), preventing wound closure. Multiparametric analysis revealed a cell retention phenomenon in treated groups, where cells remained physically adherent with intact nuclei but metabolically depressed and unable to migrate, with no lytic cell death or oxidative burst detected under the tested conditions. It is concluded that the tested BPs compromise trophoblast physiology through distinct mechanisms, where BP-2 causes metabolic shock and BP-3 induces a state of quiescence and functional paralysis of invasion, suggesting that exposure to these compounds may contribute to placentation failures, such as preeclampsia, independently of immediate cell death.

**Key words:** benzophenone; trophoblast; HTR-8/SVneo; cell migration; toxicity; placenta.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BP <sub>s</sub>	Benzofenonas
BP-2	Benzofenona-2
BP-3	Benzofenona-3
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EDCs	Desreguladores Endócrinos
EVT	Trofoblastos Extravilosos
ILACVN	Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza
PE	Pré-eclâmpsia
PI	Iodeto de Propídio
RCIU	Restrição de crescimento intrauterino
RE	Retículo Endoplasmático
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
UFABC	Universidade Federal do ABC
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino-Americana
UPR	Resposta a Proteínas Mal Dobradas
UV	Filtros Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1 BIOLOGIA DO TROFOBLASTO E O MODELO HTR-8/SVneo.....	14
2.2 BENZOFENONAS: QUÍMICA, EXPOSIÇÃO E TOXICOCINÉTICA.....	16
2.3 DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA E INTERAÇÃO COM RECEPTORES NUCLEARES.....	17
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO COMO MECANISMO POTENCIAL DE TOXICIDADE PLACENTÁRIA.....	17
.....	18
2.5 JUSTIFICATIVA.....	18
2.6 OBJETIVOS.....	19
2.6.1 Objetivo Geral.....	19
2.6.2 Objetivos Específicos.....	19
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>20</b>
3.1 CULTURA E MANUTENÇÃO CELULAR.....	20
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRATAMENTO.....	21
3.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE METABÓLICA E DETERMINAÇÃO DO IC50 (ENSAIO MTT).....	21
3.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR (WOUND HEALING ASSAY).....	22
3.5 ANÁLISE DE TRIAGEM MULTIPARAMÉTRICA.....	23
3.5.1 Marcação Nuclear com Hoechst 33342.....	23
3.5.2 Avaliação de Estresse Oxidativo Intracelular (CellROX Green).....	24
3.5.3 Avaliação da Integridade de Membrana por Iodeto de Propídio (PI).....	24
3.5.4 Protocolo de Coloração Multiplex e Aquisição de Imagens.....	24
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
4.1 ANÁLISE CINÉTICA DA CITOTOXICIDADE E DETERMINAÇÃO DO IC50....	25
4.2 IMPACTO FUNCIONAL NA MIGRAÇÃO.....	28
4.2.1 Análise da Motilidade Celular.....	28
.....	31
4.2.2 Interpretação: Paralisia Funcional vs. Citotoxicidade.....	31
4.3 ANÁLISE MULTIPARAMÉTRICA E LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS.....	32
4.3.1 Quantificação da Densidade Celular.....	32
.....	33
4.3.2 Avaliação Morfológica e Qualitativa.....	33
4.3.3 Avaliação de Estresse Oxidativo e Necrose: Considerações Técnicas.....	34
4.4 DISCUSSÃO INTEGRADA: DESACOPLAMENTO METABÓLICO FUNCIONAL. 34	
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A contínua exposição humana a contaminantes ambientais emergentes tornou-se uma preocupação iminente na saúde pública moderna, especialmente no que tange a saúde reprodutiva e ao desenvolvimento fetal.<sup>1</sup> Historicamente, o ambiente intrauterino, considerado um santuário protegido, hoje é reconhecido como um compartimento vulnerável à bioacumulação de compostos exógenos capazes de transpor a barreira placentária.<sup>2</sup> Entre estes compostos, as benzofenonas (BPs) destacam-se como um componente orgânico dos filtros ultravioletas (UV) amplamente difundidas.<sup>3</sup> A sua aplicação estende-se desde produtos de cuidados pessoais de uso diário – como protetores solares, cosméticos faciais, vernizes de unhas e hidratantes labiais – até a indústria, com aplicações que visam a prevenção da fotodegradação de polímeros plásticos e tintas.<sup>4</sup>

A circulação generalizada desses compostos no cotidiano moderno é evidenciada de maneira expressiva pela sua detecção frequente em fluidos biológicos humanos. Estudos epidemiológicos e de biomonitoramento detectaram a presença de BPs e seus metabólitos na urina, soro sanguíneo e, mais criticamente, no líquido amniótico, sangue do cordão umbilical e no tecido placentário de gestantes.<sup>5</sup> Estas descobertas indicam que a exposição materna resulta também em exposição fetal, destacando a relevância de investigar a segurança desses compostos durante períodos críticos do desenvolvimento.

Este trabalho foca-se em dois derivados específicos desta classe química: a Benzofenona-2 (BP-2) e a Benzofenona-3 (BP-3, também conhecida como oxibenzona). A BP-3 é, irrefutavelmente, o filtro UV mais amplamente utilizado em escala global, presente em milhares de produtos de consumo. A sua eficácia na absorção de radiação UV de amplo espectro é contraposta por evidências da sua atividade como desregulador endócrino (EDC), possuindo propriedades estrogênicas fracas e antiandrogênicas.<sup>6</sup> Por outro lado, a BP-2, embora menos frequente em protetores solares tópicos, é um derivado estrutural utilizado em perfumes e embalagens, e possui uma estrutura polihidroxilada que lhe confere uma potência estrogênica intrínseca superior à da BP-3.<sup>7</sup>

A placenta humana desempenha um papel central e essencial na gestação. Longe da caracterização simplista de uma barreira física passiva, a placenta constitui um órgão endócrino, imunológico e metabólico altamente ativo que administra a troca de nutrientes, gases e resíduos entre o feto e a mãe. A unidade funcional fundamental da placenta é o trofoblasto. A integridade e a funcionalidade das células trofoblásticas são fundamentais

para o estabelecimento e a manutenção da gravidez. Perturbações na viabilidade, proliferação ou capacidade invasiva destas células podem desencadear uma cascata de eventos patológicos que culminam em complicações obstétricas graves, tais como a pré-eclâmpsia (PE), a restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e aborto espontâneo.<sup>8</sup>

A hipótese central que norteia esse estudo propõe que a exposição às BPs compromete funções essenciais dos trofoblastos extravilosos (EVT) humanos, afetando o metabolismo celular, a dinâmica de adesão e a capacidade migratória. Embora desequilíbrios redox possam participar desse processo, os mecanismos envolvidos parecem decorrer de alterações metabólicas e funcionais, mais do que de morte celular programada induzida por estresse oxidativo.

Para validar essa hipótese e elucidar os mecanismos moleculares envolvidos, este estudo emprega a linhagem celular *HTR-8/SVneo*. Este modelo celular é amplamente reconhecido e utilizado na biologia reprodutiva por recapitular as características fenotípicas críticas dos EVT invasores de primeiro trimestre.<sup>9</sup> No contexto placentário, entender como BP-2 e BP-3 modulam o comportamento dos EVT é de particular relevância, visto que alterações na proliferação, metabolismo, adesão ou migração dessas células podem comprometer etapas vitais da placentação. Embora estudos prévios possam sugerir que filtros UV orgânicos afetam vias metabólicas e processos de motilidade celular, as evidências específicas em modelos de trofoblastos humanos permanecem limitadas.

Diante da escassez de dados integrados sobre os impactos funcionais das BPs em *HTR-8/SVneo*, este estudo busca caracterizar seus efeitos sobre metabolismo, viabilidade, morfologia nuclear e migração celular. Esta abordagem permite não apenas identificar potenciais mecanismos de ação, mas também contribuir para a compreensão da toxicologia dessas substâncias em um modelo relevante para o desenvolvimento gestacional.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A compreensão dos potenciais impactos toxicológicos das BPs sobre a fisiologia placentária exige uma análise criteriosa da literatura disponível. Esta seção sintetiza o conhecimento atual sobre a biologia do trofoblasto, as propriedades físico-químicas das BPs, os seus mecanismos de desregulação endócrina e os processos celulares mais frequentemente descritos na literatura como alvos de filtros UV orgânicos, reconhecendo

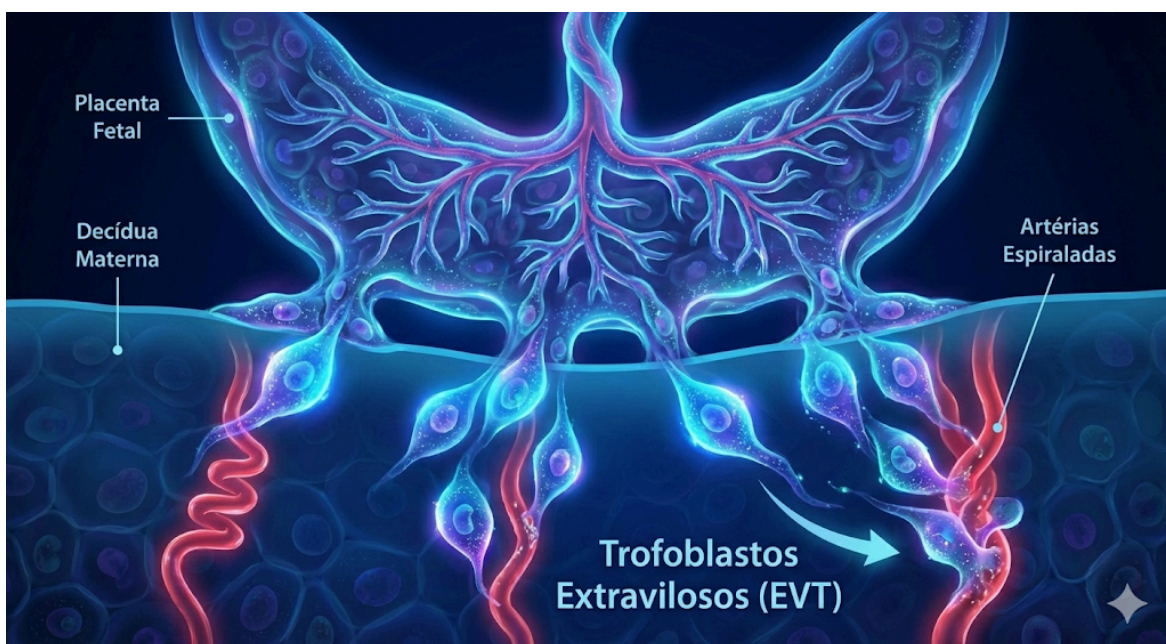
que os mecanismos relatados variam conforme o tipo celular e as condições experimentais.

## 2.1 BIOLOGIA DO TROFOBLASTO E O MODELO *HTR-8/SV<sub>NEO</sub>*

O desenvolvimento da placenta humana é um processo biológico de complexidade notável, caracterizado por uma invasão controlada do tecido materno pelo tecido fetal, mimetizando, em certos aspectos, o comportamento de células tumorais metastáticas, porém sob rigoroso controle espaço-temporal.<sup>10</sup> Após a implantação do blastocisto na parede intrauterina, as células do trofoblasto diferenciam-se em duas vias principais com funções distintas. A primeira via origina o trofoblasto viloso, que forma as vilosidades coriônicas flutuantes responsáveis pelas trocas metabólicas e gasosas entre a circulação materna e fetal. A segunda via, de interesse central neste estudo, origina o trofoblasto extraviloso.<sup>11</sup>

As células do trofoblasto extraviloso desempenham uma função essencial e singular: elas migram para fora da vilosidade, invadem a decídua materna (camada funcional do endométrio durante a gravidez) e penetram o miométrio adjacente, conforme ilustrado pela figura 1.

**Figura 1.** Representação esquemática da invasão dos Trofoblastos Extravilosos (EVT) e do remodelamento das Artérias Espiraladas na interface materno-fetal.



Fonte: Imagem gerada por IA generativa (Banana Gemini), a partir de prompt próprio, 2025.

O objetivo final desta invasão é alcançar e remodelar as artérias espiraladas uterinas. No processo fisiológico normal, os EVT<sub>s</sub> destroem a camada muscular lisa e o endotélio dos vasos maternos, substituindo-os por uma matriz fibrinoide e pelas células trofoblásticas.<sup>8</sup> Essa transformação converte as artérias espiraladas – que originalmente são vasos de alta resistência, baixo fluxo e sensíveis a agentes vasoativos – em condutos de baixa resistência, alto fluxo e sensíveis à vasoconstrição materna, sendo essa adaptação hemodinâmica essencial para garantir suprimento sanguíneo abundante e contínuo para o feto em crescimento, independentes das flutuações da pressão arterial sistêmica materna.<sup>8</sup>

Falhas nesse processo de diferenciação, migração e invasão trofoblástica são a base etiológica das “síndromes obstétricas”. A invasão trofoblástica superficial ou incompleta resulta na manutenção de artérias espiraladas de alta resistência, levando à hiperfusão placentária, isquemia e liberação de fatores antiandrogênicos na circulação materna, caracterizando o quadro clínico da pré-eclâmpsia e da restrição de crescimento intrauterino.<sup>8</sup>

Para investigar estes processos *in vitro* e avaliar a toxicidade de xenobióticos, a escolha do modelo celular é determinante. A linhagem celular *HTR-8/SVneo* estabeleceu-se como um modelo padrão-ouro para estudo do EVT de primeiro trimestre. Esta linhagem foi derivada a partir de explantes de vilosidades coriônicas humanas de gestações precoces (6 a 12 semanas) e imortalizada através da transfecção com o gene que codifica o antígeno T grande do vírus símio 40 (SV40).<sup>12</sup> A imortalização confere às células uma capacidade proliferativa estendida, superando a senescência replicativa que limita o uso do trofoblasto primário, sem, contudo, induzir um fenótipo tumorigênico completo.<sup>13</sup>

Estudos de caracterização fenotípica confirmam que as células *HTR-8/SVneo* retêm marcadores cruciais das suas células progenitoras invasoras *in situ*. Elas expressam uma combinação complexa de marcadores epiteliais, como a citoqueratina 7 (CK7), e marcadores mesenquimais, refletindo o processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT) que ocorre funcionalmente durante a invasão trofoblástica *in vivo*.<sup>14</sup> Além disso, expressam um repertório específico de integrinas (incluindo  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$  e  $\beta 1$ ) e moléculas de adesão que são indispensáveis para a integração com a matriz extracelular decidual.<sup>9</sup> Esta fidelidade fenotípica valida o uso das *HTR-8/SVneo* para ensaios de migração e invasão, bem como para avaliação toxicológica de compostos com potencial de interferência nestas funções vitais.

## 2.2 BENZOFENONAS: QUÍMICA, EXPOSIÇÃO E TOXICOCINÉTICA

As benzofenonas constituem uma família de cetonas aromáticas bicíclicas, caracterizadas pela presença de dois anéis de benzeno ligados por um grupo carbonila.<sup>15</sup> A estrutura química base confere a estas moléculas a capacidade de absorver e dissipar a radiação ultravioleta, protegendo a pele e materiais sintéticos contra danos foto-induzidos.<sup>16</sup> No entanto, pequenas variações nos substituintes dos anéis aromáticos alteram de maneira severa as suas propriedades físico-químicas e biológicas.<sup>17</sup>

A Benzofenona-3, quimicamente denominada 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (ou oxibenzona), possui um grupo hidroxila e um grupo metoxi. Esta configuração confere-lhe uma natureza lipofílica significativa, o que facilita a sua penetração através do estrato córneo da pele humana e sua travessia através de membranas biológicas, incluindo a barreira hematoencefálica e placentária.<sup>6</sup> Estudos farmacocinéticos em humanos demonstram que a BP-3 é absorvida sistemicamente após aplicação tópica, sendo excretada na urina na forma conjugada ou livre. A sua meia-vida biológica e a exposição contínua levam a uma presença quase constante no organismo de populações urbanas.<sup>18</sup>

A Benzofenona-2, ou 2,2',4,4'-tetraidroxibenzofenona, distingue-se pela presença de quatro grupos hidroxila e ausência de grupos metoxi. Esta estrutura polihidroxilada assemelha-se mais estritamente à estrutura esteroideal do 17 $\beta$ -estradiol, o principal estrogênio endógeno, do que a estrutura da BP-3.<sup>19</sup> Esta semelhança estrutural é a fonte da sua atividade biológica distinta, conferindo-lhe maior afinidade de ligação aos receptores de estrogênio e um potencial de desregulação endócrina mais pronunciado em certos tecidos.<sup>7</sup>

A toxicocinética destas substâncias na gestação é particularmente preocupante. A placenta, embora atue como uma barreira seletiva toxicológica, é permeável a compostos lipofílicos de baixo peso molecular como as BPs.<sup>20</sup> A detecção de concentrações na ordem de nanogramas por mililitro (ng/mL) ou microgramas por litro ( $\mu$ g/L) no líquido amniótico e no sangue do cordão umbilical confirma que o feto está exposto a estas substâncias durante a organogênese.<sup>11</sup> Além disso, a capacidade metabólica do feto e da placenta para detoxificar estes xenobióticos é frequentemente imatura ou saturável, podendo levar a uma acumulação local superior à observado na circulação materna.<sup>21</sup>

## 2.3 DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA E INTERAÇÃO COM RECEPTORES NUCLEARES

A classificação das BPs como Desreguladores Endócrinos fundamenta-se na sua capacidade de mimetizar ou antagonizar a ação de hormônios endógenos, alterando a homeostasia fisiológica. O mecanismo molecular primário dos EDCs envolve a interação direta com receptores nucleares, atuando como agonistas ou antagonistas, dependendo do tecido e do co-ativador presente.<sup>22</sup>

A BP-3 demonstra um perfil de atividade complexo, atuando, de forma predominante, como um antiandrogênico e possuindo uma atividade estrogênica fraca. Estudos *in silico* e ensaios de ligação competitiva *in vitro* indicam que a BP-3 pode ligar-se a receptores de estrogênio alfa (ER $\alpha$ ) e beta (ER $\beta$ ), bem como ao receptor de androgênio (AR).<sup>23</sup> Em modelos animais, a exposição à BP-3 foi associada a alterações na expressão gênica de receptores hormonais no útero e na glândula pituitária, sugerindo uma perturbação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada.<sup>24</sup> No contexto da migração trofoblástica, pesquisas recentes apontam que a BP-3 pode inibir a motilidade celular através do antagonismo da via do receptor de androgênio, que desempenha um papel na regulação da invasão celular.<sup>23</sup>

A BP-2, devido à sua estrutura tetraidroxilada, apresenta atividade estrogênica mensurável *in vitro* e *in vivo*. Ensaios uterotróficos em roedores ovariectomizados demonstraram que a administração de BP-2 induz um aumento significativo no peso uterino – um marcador clássico de atividade estrogênica – embora com potência substancialmente inferior à do 17 $\beta$ -estradiol.<sup>25</sup> Ademais, a BP-2 interfere na regulação do ciclo estral e na foliculogênese ovariana, promovendo atresia folicular e reduzindo a fertilidade.<sup>24</sup> Esta atividade estrogênica suscita preocupação de que a BP-2 possa interferir na sinalização hormonal placentária, que é dependente de um equilíbrio entre progesterona e estrogênios para manutenção da quiescência uterina e promoção da diferenciação trofoblástica.

## 2.4 ESTRESSE OXIDATIVO COMO MECANISMO POTENCIAL DE TOXICIDADE PLACENTÁRIA

A literatura científica converge para o estresse oxidativo como um mecanismo unificador subjacente à toxicidade de muitos poluentes ambientais na placenta. O

estresse oxidativo define-se como um desequilíbrio bioquímico entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) – tais como ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) – e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante endógenos de neutralizar estes intermediários reativos.<sup>8</sup>

Na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, a isquemia placentária resultante de uma invasão trofoblástica deficiente leva a ciclos de hipóxia e reoxigenação. Esta flutuação na tensão de oxigênio é um potente indutor de geração de ROS mitocondrial. O excesso de ROS causa danos diretos a macromoléculas vitais: peroxidação de lipídios de membrana, oxidação de proteínas estruturais e enzimáticas, além de danos ao DNA nuclear e mitocondrial.<sup>26</sup>

No contexto específico das BPs, estudos em outros tipos celulares, como queratinócitos e neurônios, indicam que estas moléculas podem atuar como pró-oxidantes. A estrutura química das BPs, sob irradiação UV ou metabolização enzimática, pode gerar intermediários reativos capazes de transferir energia para o oxigênio molecular, gerando oxigênio singlete ou radicais livres.<sup>27</sup> O dano oxidativo induzido por BP-3 tem sido associado à apoptose mitocondrial, caracterizada pela perda do potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c e ativação da cascata de caspases.<sup>28</sup>

A vulnerabilidade do trofoblasto ao estresse oxidativo é exacerbada pelo fato de que a placenta é um órgão rico em mitocôndrias, devido à sua alta demanda energética para o transporte ativo e biossíntese hormonal.<sup>16</sup> O dano mitocondrial induzido por xenobióticos pode, portanto, potencialmente comprometer a bioenergética placentária, levando à falência funcional e morte celular.<sup>5</sup> Outrossim, o estresse oxidativo no retículo endoplasmático (RE) ativa a Resposta a Proteínas Mal Dobradas (UPR), uma via de sinalização que, se ativada cronicamente, desvia a célula da sobrevivência para a apoptose, um fenômeno observado em placentas de gestações com RCIU.<sup>8</sup>

## 2.5 JUSTIFICATIVA

A relevância deste estudo fundamenta-se na crescente e imensurável exposição da população gestante a contaminantes ambientais, especificamente as BPs, presentes em uma vasta gama de produtos de consumo e uso diário. Apesar de comprovada capacidade de atravessar a barreira placentária e atingir o compartimento fetal, existe

uma significativa lacuna no conhecimento científico acerca de seus efeitos diretos na funcionalidade das células trofoblásticas de primeiro trimestre.

Um amplo espectro de estudos toxicológicos existentes têm o enfoque em desfechos clássicos de morte celular aguda, muitas vezes negligenciando alterações funcionais sutis, mas críticas, como a inibição da migração celular e a senescência metabólica. A integridade destes processos é fundamental para a invasão trofoblástica adequada e para o remodelamento das artérias espiraladas; dado que falhas nesta etapa são a base etiológica de síndromes obstétricas graves, como a pré-eclâmpsia e a restrição de crescimento intrauterino. Portanto, a investigação dos mecanismos de toxicidade da BP-2 e da BP-3 utilizando uma abordagem multiparamétrica é fundamenta-se na essencialidade de elucidação da capacidade de comprometimento da placentação via esses compostos, não apenas pela letalidade, mas pela perda de função celular, fornecendo subsídios científicos relevantes para a avaliação de risco e a regulação do uso destas substâncias durante a gestação.

## 2.6 OBJETIVOS

### 2.6.1 Objetivo Geral

Avaliar e comparar os efeitos citotóxicos, metabólicos e funcionais da Benzofenona-2 e Benzofenona-3 sobre a linhagem de células trofoblásticas humanas *HTR-8/SVneo*, com o intuito de compreender o impacto destes filtros UV na fisiologia placentária inicial.

### 2.6.2 Objetivos Específicos

1. Determinar a citotoxicidade metabólica: Avaliar a viabilidade celular e calcular a Concentração Inibitória Média da BP-2 e BP-3 através do ensaio de MTT em diferentes tempos de exposição (24, 48 e 72 horas).
2. Avaliar a funcionalidade celular: Investigar o impacto das BPs na capacidade migratória dos trofoblastos, simulando o processo de invasão, através do ensaio de cicatrização de feridas.

3. Analisar a integridade nuclear e densidade celular: Quantificar a densidade de células aderidas, comparando o tratamento com BPs e o controle, e avaliar qualitativamente a morfologia nuclear com a sonda fluorescente Hoechst 33342.
4. Investigar mecanismos de morte e estresse oxidativo: Verificar a ocorrência de necrose lítica e geração de espécies reativas de oxigênio através das sondas Iodeto de Propídio e CellROX® Green, respectivamente, para apurar o perfil toxicológico dos compostos.

### 3 METODOLOGIA

A abordagem metodológica deste estudo foi delineada para investigar a toxicidade das BPs em células trofoblásticas. A metodologia visou incorporar técnicas de análise celular multiparamétrica para correlacionar viabilidade, morfologia nuclear, integridade de membrana e estado redox na mesma população celular.

#### 3.1 CULTURA E MANUTENÇÃO CELULAR

A linhagem celular de trofoblasto extraviloso humano *HTR-8/SVneo* foi utilizada como modelo experimental. As células foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Estela Bevilacqua do Laboratório de Pesquisa de Interações Materno-fetal e Placenta da Universidade de São Paulo. As células, em passagem 10, foram mantidas em condições de cultura estéreis e padronizadas para preservar as suas características fenotípicas e estabilidade genômica. O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), de modo a garantir o aporte de fatores de crescimento e hormônios essenciais. Para a prevenção de contaminação bacteriana, o meio foi fortificado com 100 µg/mL do antibiótico estreptomicina.

As culturas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O meio de cultura foi renovado a cada 48-72 horas, e as células foram submetidas a passagens (repiques) enzimáticas utilizando tripsina-EDTA a 0,25% quando atingiam aproximadamente 80-90% de confluência, evitando o crescimento excessivo que poderia induzir diferenciação ou estresse por contato.<sup>13</sup> Para todos os experimentos, utilizou-se células entre a 3ª e a 7ª passagem após o descongelamento

para minimizar a variabilidade experimental associada à deriva genética em cultura prolongada.

### 3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRATAMENTO

Os compostos teste, BP-2 (massa molar de aproximadamente 246,24 g/mol) e BP-3 (massa molar de aproximadamente 228,25 g/mol), foram adquiridos com elevado grau de pureza analítica (Sigma-Aldrich). Para o preparo das soluções estoque na concentração padrão de 10 mg/mL, dissolveu-se 10 mg de cada composto em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. As soluções estoque foram armazenadas ao abrigo da luz a 4°C, seguindo recomendações de estabilidade. No momento do uso, as soluções foram diluídas em série em meio de cultura para obter as concentrações finais de teste, assegurando que a concentração final de DMSO não excedesse 0,1% (v/v) nos poços experimentais para evitar toxicidade pelo veículo.<sup>29</sup>

### 3.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE METABÓLICA E DETERMINAÇÃO DO IC50 (ENSAIO MTT)

Para a quantificação da citotoxicidade e determinação da Concentração Inibitória Média (IC50), empregou-se o ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O princípio deste ensaio baseia-se na capacidade das células metabolicamente ativas e viáveis reduzirem o sal de tetrazólio amarelo em cristais de formazan de cor púrpura insolúveis em água. Esta reação ocorre principalmente nas mitocôndrias, mediada por enzimas desidrogenases dependentes de NAD(P)H, como a succinato desidrogenase.<sup>30</sup>

Para o plaqueamento, as células foram tripsinizadas e contadas para determinação da concentração celular. A suspensão foi ajustada para semear uma densidade de 5.000 células por poço em placas de 96 poços para o ensaio MTT. A partir das soluções estoque de BPs, realizou-se uma diluição seriada em meio de cultura para estabelecer a curva de dose-resposta. O tubo inicial foi preparado misturando-se 100 µL da solução estoque com 900 µL de meio, resultando na concentração máxima de 1.000 µg/mL (aproximadamente 4mM). Subsequentemente, realizaram-se diluições seriadas de razão 1:2 (500 µL da solução anterior em 500 µL de meio) até o oitavo tubo, obtendo-se concentrações finais que variam de 1.000 µg/mL a 7,812 µg/mL. Um controle negativo de veículo foi preparado

contendo a concentração final de 10% de DMSO, e para o controle positivo utilizou-se apenas meio de cultura. As células, previamente semeadas em placas de cultura de 96 poços, foram tratadas com 50 µL de cada diluição e incubadas por períodos de 24, 48 e 72 horas para avaliação da toxicidade aguda e cumulativa.

Após os períodos de incubação determinados (24h, 48h e 72h), adicionou-se 10 µL do reagente MTT a cada poço, procedendo-se a uma incubação adicional de 4 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi então descartado e adicionaram-se 50 µL de DMSO por poço para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa nos comprimentos de onda de 570 nm e 630 nm, permitindo o cálculo da porcentagem de viabilidade celular e a determinação do IC<sub>50</sub>, através do software estatístico padrão GraphPad Prism.

### 3.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR (WOUND HEALING ASSAY)

A capacidade funcional das células *HTR-8/SVneo* de migrar, simulando o processo de invasão trofoblástica, foi avaliada através do ensaio de cicatrização de feridas (“scratch assay”). As células foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 horas, de modo a formar uma monocamada celular coesa e uniforme. Utilizando-se uma ponteira de pipeta estéril de 200 µL, realizou-se uma incisão mecânica linear no centro de cada poço, removendo uma faixa de células e criando uma “ferida” livre de células com bordas definidas, seguindo indicações de protocolos experimentais analisados.<sup>31</sup>

Imediatamente após a realização da ferida, os poços foram lavados suavemente com PBS para remoção das células soltas e detritos celulares que pudessem interferir na análise. O meio de cultura foi então substituído por meio contendo as concentrações teste de 100 µM de BP-2 e BP-3, correspondentes à IC<sub>90</sub> aproximadamente, determinada pelo ensaio MTT. Para o controle utilizou-se apenas meio de cultura. Vale salientar que, em outros protocolos experimentais, conduziu-se o ensaio em condições de baixo soro (1% SFB) visando minimizar a contribuição da proliferação celular no fechamento da ferida e focar primordialmente na migração.<sup>32</sup> No entanto, tal protocolo não foi aplicado no presente estudo.

A documentação visual da ferida foi realizada através de um microscópio invertido com câmera. Imagens foram capturadas da ferida no tempo inicial (0h) e após 24 e 48 horas de incubação. A quantificação da migração foi realizada utilizando software de análise de imagem ImageJ, medindo a área livre de células nos diferentes pontos

temporais. Alternativamente, a taxa de migração pode ser expressa como a porcentagem de fechamento da ferida.<sup>33</sup> A porcentagem de fechamento aumentará à medida que as células migrarem ao longo do tempo:

$$\% \text{ Fechamento da Ferida} = \left[ \frac{A_{t=0} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0}} \right] \times 100\% \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

$A_{t=0h}$  é a área da ferida medida imediatamente após o risco (0h).

$A_{t=\Delta h}$  é a área da ferida medida 48h horas após o arranhão ser realizado.

### 3.5 ANÁLISE DE TRIAGEM MULTIPARAMÉTRICA

Para a avaliação dos efeitos citotóxicos e oxidativos, empregou-se uma abordagem de triagem multiparamétrica. As células foram semeadas em microplaca de 6 poços com uma lamínula circular por poço e, após a adesão, tratadas com 100  $\mu$ M de BP-2 e BP-3 por 24 horas. Esta concentração foi selecionada como uma dose de triagem representativa para avaliar danos subletais e funcionais. O meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com um coquetel de sondas fluorescentes específicas (Hoechst 33342, CellROX Green e Iodeto de Propídio) para a análise simultânea de diferentes parâmetros celulares.

#### 3.5.1 Marcação Nuclear com Hoechst 33342

O Hoechst 33342 foi utilizado como corante nuclear primário. Este composto bis-benzimida é permeável à membrana celular e liga-se com alta afinidade às regiões ricas em adenina-timina no sulco menor do DNA de fita dupla. Mediante excitação por luz ultravioleta, emite uma fluorescência azul intensa.<sup>34</sup> No presente estudo, utilizou-se Hoechst 33342 não apenas para identificação da localização nuclear, mas como uma ferramenta quantitativa para o ensaio de contagem de células e avaliação morfológica da cromatina. A análise de imagem quantifica o número de células remanescentes aderidas após o tratamento, oferecendo uma medida de citotoxicidade/deslocamento celular. A

intensidade e distribuição da fluorescência permite a distinção entre núcleos normais (cromatinas difusas) de núcleos em apoptose, que apresentam condensação cromatínica (picnose) ou fragmentação nuclear (cariorrexe), caracterizadas por um sinal de fluorescência mais intenso e pontual.<sup>35</sup>

### 3.5.2 Avaliação de Estresse Oxidativo Intracelular (CellROX Green)

O CellROX Green foi incorporado para a detecção específica e sensível de estresse oxidativo. Essa sonda fluorogênica de nova geração é permeável à célula e, no seu estado reduzido, exibe fluorescência mínima. No entanto, na presença de ROS no citoplasma – incluindo radical hidroxila e superóxido – a sonda é oxidada e liga-se ao DNA, emitindo uma fluorescência vermelha profunda estável e brilhante, com picos de excitação/emissão de aproximadamente 485/520 nm.<sup>36</sup> A intensidade do sinal fluorescente do CellROX é diretamente proporcional à carga de ROS intracelular acumulada, permitindo quantificar o grau de estresse oxidativo induzido pelas BPs em células individuais.<sup>8</sup>

### 3.5.3 Avaliação da Integridade de Membrana por Iodeto de Propídio (PI)

O Iodeto de Propídio foi utilizado para avaliar a integridade da membrana plasmática, um marcador canônico de morte celular necrótica ou apoptose tardia. O PI é uma molécula intercalante de DNA que é impermeável a membranas celulares intactas de células viáveis. Conseqüentemente, a sua internalização e ligação ao DNA (resultando em fluorescência vermelha com excitação de aproximadamente 535 nm) ocorrem apenas em células que perderam a integridade da barreira da membrana.<sup>34</sup> A combinação de PI com Hoechst permite diferenciar células vivas (Hoechst+/PI-), células em apoptose precoce (Hoechst brilhante/PI-) e células mortas/necróticas (Hoechst+/PI+).<sup>37</sup>

### 3.5.4 Protocolo de Coloração Multiplex e Aquisição de Imagens

Após o tratamento experimental, as células foram lavadas com PBS e incubadas com CellROX Green na concentração final de 5 µM, e 1 µL/mL de PI, em meio completo,

por 30 minutos a 37°C, protegidas da luz. Decorrido o período de incubação, realizou-se três lavagens com PBS, e fixou-se com formaldeído por 15 minutos a 4°C. Em seguida, lavou-se a placa uma vez com PBS. Armazenou-se a placa tratada com PBS a 4°C por 96 horas. Decorrido o período de repouso, incubou-se 2 µL/mL de Hoechst 33342 por 30 minutos, e preparou-se a lâmina para análise em microscopia de epifluorescência. A aquisição de imagens foi realizada imediatamente após a coloração com Hoechst, capturando-se múltiplos campos por tratamento para garantir representatividade estatística.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram compilados e expressos como média ± desvio padrão (DP) das replicatas experimentais. A normalidade da distribuição dos dados foi assumida para a aplicação dos testes paramétricos.

Para a avaliação da citotoxicidade (ensaio MTT), as curvas de dose-resposta foram ajustadas por regressão não-linear para o cálculo da IC50 e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), utilizando software estatístico GraphPad Prism.

Para os ensaios funcionais, especificamente a análise do *scratch assay* a comparação entre as médias dos grupos tratados com as BPs e o grupo controle foi realizada utilizando o teste *t* de Student para amostras independentes. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação centrou-se na determinação dos impactos das BPs na homeostase metabólica e na sobrevivência global das células trofoblásticas *HTR-8/SVneo*. Os dados gerados através do ensaio MTT, complementados pela contagem nuclear com Hoechst 33342, e avaliação da migração celular revelaram um padrão de toxicidade dependente da dose e da estrutura química dos compostos.

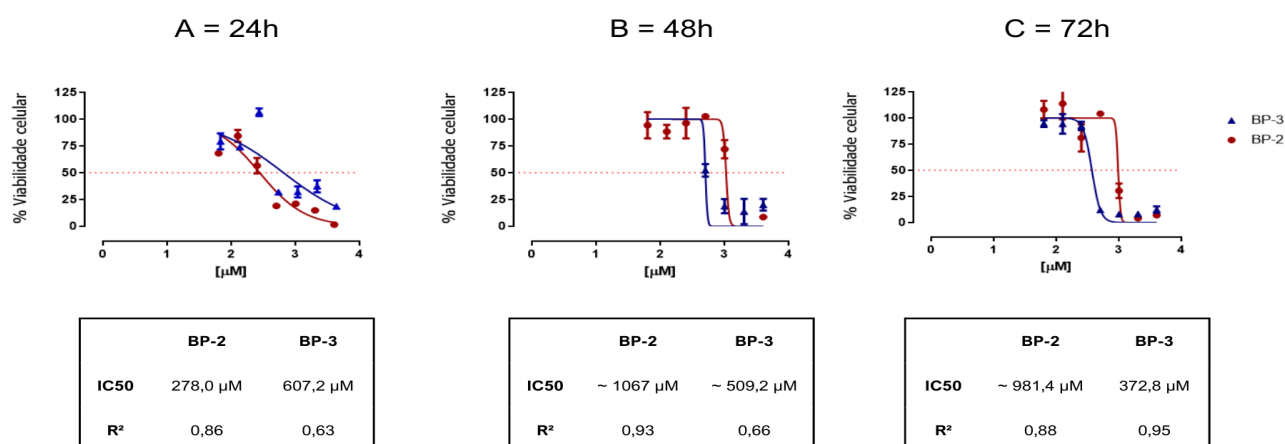
### 4.1 ANÁLISE CINÉTICA DA CITOTOXICIDADE E DETERMINAÇÃO DO IC50

A viabilidade celular e a potência citotóxica dos compostos foram avaliadas quantitativamente através do cálculo da Concentração Inibitória Média (IC<sub>50</sub>) nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A análise integrada das curvas de dose-resposta e dos valores de IC<sub>50</sub> revelou perfis toxicológicos distintos e dependentes do tempo para a BP-2 e a BP-3.

Nas primeiras 24 horas de exposição aos compostos, os dados apontam para uma toxicidade acentuada para a BP-2. A análise comparativa direta entre as BPs evidenciou uma distinção expressiva nos seus perfis toxicológicos. As curvas de dose-resposta obtidas pelo ensaio MTT demonstraram que a BP-2 exerce um efeito citotóxico significativamente mais potente do que a BP-3 em concentrações equimolares. Observou-se um declínio estatisticamente significativo na atividade mitocondrial das células expostas à BP-2 em concentrações mais baixas do que aquelas necessárias para observar efeitos similares com a BP-3.

Esta resposta pode ser visualizada na Figura 2, onde a curva da BP-2 (vermelha) apresenta um deslocamento para a esquerda (maior potência) em relação à BP-3 (azul), resultando no menor IC<sub>50</sub> registrado no estudo (278,0 µM vs 607,2 µM).

**Figura 2.** Curvas de dose-resposta da viabilidade celular de trofoblastos HTR-8/SVneo expostos à Benzofenona-2 (BP-2, vermelho) e Benzofenona-3 (BP-3, azul) por 24h (A), 48h (B) e 72h (C). O eixo Y representa a % de viabilidade celular e o eixo X representa o logaritmo da concentração [µM]. As linhas pontilhadas vermelhas indicam o limiar de 50% de viabilidade. Observe o deslocamento das curvas da BP-3 para a esquerda ao longo do tempo (aumento da toxicidade) e o deslocamento das curvas da BP-2 para a direita (redução da toxicidade aparente).



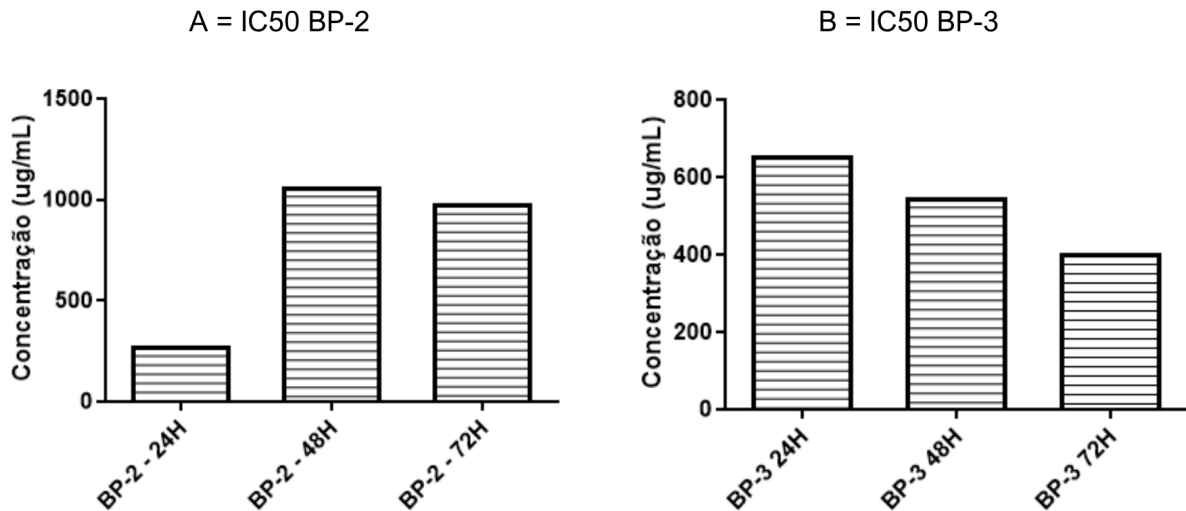
Fonte: o autor, 2025.

Esse fenômeno pode relacionar-se com as propriedades moleculares dos compostos, racionalizando-se pela análise da estrutura química esta hierarquia de toxicidade. A BP-2 possui uma estrutura polihidroxilada, contendo quatro grupos hidroxila (-OH) distribuídos nos dois anéis aromáticos, enquanto a BP-3 possui apenas um grupo hidroxila e um grupo metoxi (-OCH<sub>3</sub>). A presença de múltiplos grupos hidroxila, particularmente na configuração orto ou para, aumenta a reatividade química da molécula. Estudos toxicológicos sugerem que polifenóis e compostos polihidroxilados podem sofrer autooxidação ou metabolização enzimática gerando quinonas reativas, que são potentes eletrofílicos capazes de formar adutos com proteínas e DNA, além de participarem em ciclos redox que geram estresse oxidativo.<sup>7</sup>

A redução na conversão do MTT em formazan reflete primariamente o comprometimento da função mitocondrial. Dado que a placenta é um órgão energeticamente exigente, a inibição da respiração mitocondrial induzida pela BP-2 sugere um mecanismo de toxicidade que pode privar o trofoblasto da energia necessárias para funções vitais como o transporte de nutrientes e a síntese hormonal.

No entanto, a avaliação longitudinal (48 e 72h) revelou uma inversão neste padrão, conforme sumarizado pela figura 3. Enquanto a BP-2 apresentou um aumento nos valores de IC50 ao longo do tempo, – indicando uma possível adaptação celular ou instabilidade do composto – a BP-3 exibiu um perfil de toxicidade cumulativa.

**Figura 3.** Dinâmica temporal dos valores de IC50 (µg/mL) para BP-2 (A) e BP-3 (B). (A) A BP-2 apresenta alta toxicidade em 24h (barra baixa), seguida por um aumento expressivo do IC50 em 48 e 72h, indicando menor toxicidade a longo prazo. (B) A BP-3 demonstra um padrão inverso, com redução gradual e progressiva do IC50 ao longo do tempo (24h > 48h > 72h), evidenciando um efeito citotóxico dependente da acumulação temporal.



Fonte: o autor, 2025.

Segundo os dados, o IC50 da BP-3 caiu de 607,2  $\mu$ M (24h) para 372,8  $\mu$ M (72h), confirmando que a BP-3, embora menos potente que a BP-2 em termos de citotoxicidade imediata, reduz a viabilidade em concentrações mais elevadas e tempos prolongados. Essa análise indica que, apesar da sua menor reatividade intrínseca, a acumulação lipofílica intracelular pode eventualmente atingir limiares tóxicos.<sup>38</sup> Este comportamento sugere que a BP-3 representa um risco significativo em exposições crônicas, típicas do uso diário e frequente de produtos de cuidados pessoais.

## 4.2 IMPACTO FUNCIONAL NA MIGRAÇÃO

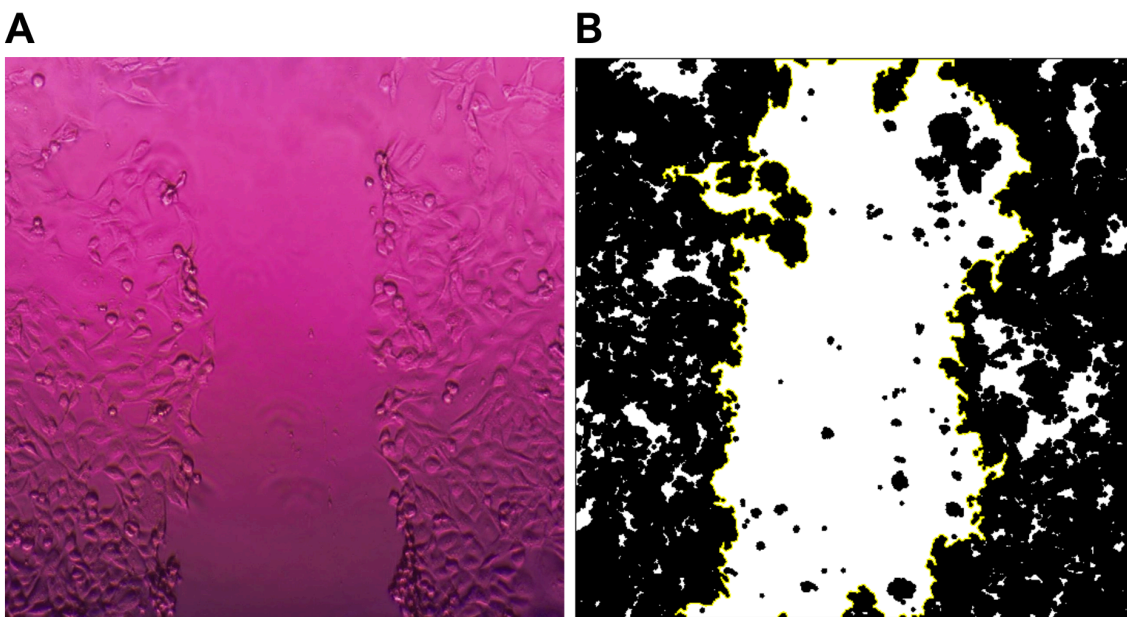
A integridade estrutural e a viabilidade do trofoblasto são condições necessárias, mas não suficientes, para uma placentação bem-sucedida. A função crítica do EVT é a sua capacidade de migrar e invadir a decídua materna para remodelar as artérias espiraladas.<sup>8</sup> O ensaio de cicatrização de feridas (*scratch assay*) foi conduzido para avaliar se as BPs interferem nesta função celular complexa, independente da sua toxicidade letal imediata.

### 4.2.1 Análise da Motilidade Celular

Para quantificar a migração, a área livre de células (“ferida”) foi mensurada

digitalmente nos tempos 0, 24 e 48 horas. A figura 4 ilustra o processo de análise de imagem empregado, onde a ferida (Painel A) é convertida em uma máscara binária (Painel B) para cálculo da área desnudada.

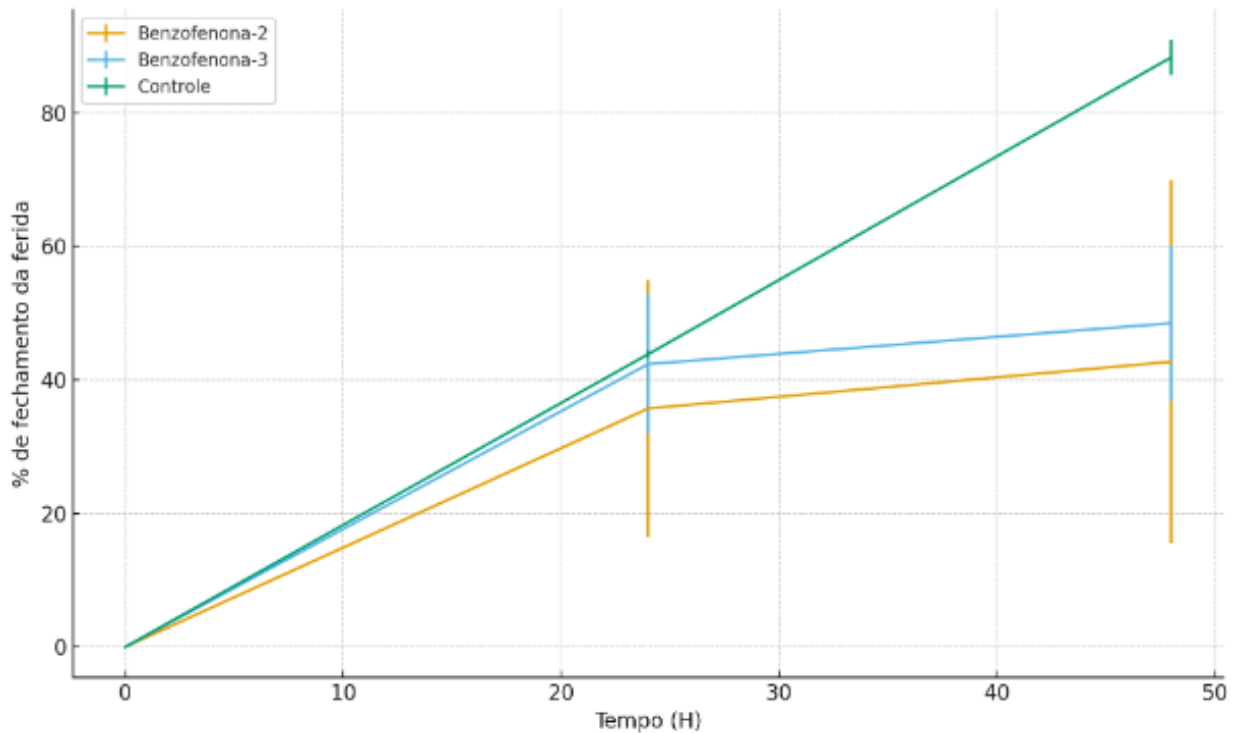
**Figura 4.** Representação metodológica da análise da área da ferida. (A) Fotomicrografia de células HTR-8/SVneo capturada no momento inicial (0h) sob tratamento com BP-2. (B) Processamento digital de imagem correspondente utilizando o software ImageJ, demonstrando a delimitação da área livre de células (máscara binária) utilizada para cálculos de migração.



Fonte: o autor, 2025.

A análise cinética do fechamento da ferida revelou comportamentos distintos entre os grupos experimentais. O grupo controle exibiu o maior nível de migração, atingindo um fechamento de aproximadamente 87% após 48 horas. Este perfil é consistente com o fenótipo altamente invasivo esperado para células EVT saudáveis, conforme demonstrado pela linha de tendência ascendente na figura 5.

**Figura 5.** Cinética do fechamento da ferida em células HTR-8/SVneo expostas às BPs. O gráfico representa a porcentagem média de fechamento da ferida ( $\pm$  erro padrão) ao longo de 48 horas. Nota-se a progressão linear vigorosa do grupo Controle (verde) em contraste com a inibição da migração observada nos grupos tratados com BP-3 (azul) e BP-2 (laranja).



Fonte: o autor, 2025.

Em contraste, a exposição à BP-3 resultou em inibição significativa da motilidade celular ( $p < 0,01$ ), estabilizando em uma taxa de fechamento próxima a 45-50%. A análise estatística apresentada na tabela 1 infere que apenas a BP-3 diferiu significativamente do controle, enquanto a BP-2, apesar da tendência de redução, não atingiu o limiar de significância estatística.

**Tabela 1.** Análise estatística comparativa do fechamento da ferida (48h).

Comparação	Valor p	Significância	Interpretação
Controle vs BP-3	$p < 0,01$	Significativo (**)	Diferença real: inibição da migração
Controle vs BP-2	$p > 0,05$	Não significativo	Sem diferença estatística comprovada

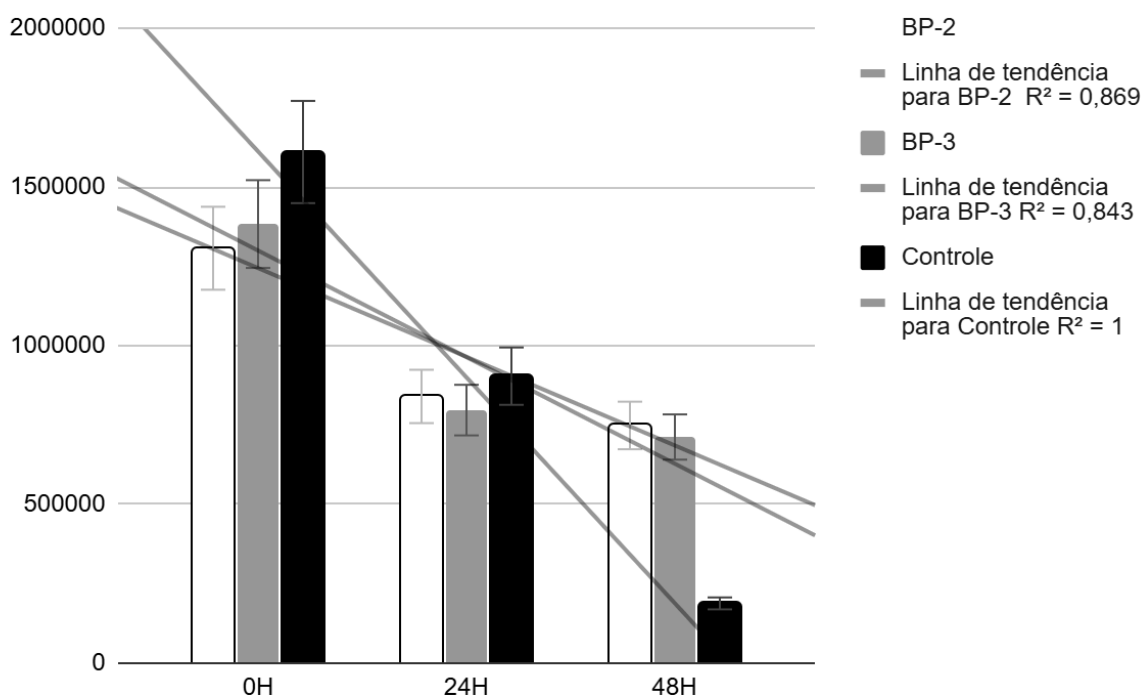
**Nota:** A significância foi determinada pelo teste t de Student não pareado/independente para amostras independentes no tempo de 48h. (\*\*) indica  $p < 0,01$ .

Fonte: o autor, 2025.

Embora não tenha atingido a significância estatística ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle, a BP-2 também demonstrou redução na migração (fechamento ~40~45%), apresentando valores absolutos de área aberta similares à BP-3 ao final de 48 horas, conforme detalhado na figura 6. Apesar da ausência de significância estatística estrita, o efeito biológico de “estagnação” da ferida causado pela BP-2 é visualmente evidente, e

sugere um efeito de classe, onde ambas as BPs prejudicam a capacidade de fechamento da monocamada.

**Figura 6.** Quantificação da área da ferida ao longo do tempo. As barras representam a área média da ferida nos tempos 0h, 24h e 48h para os grupos BP-2 (branco), BP-3 (cinza) e Controle (preto). As linhas de tendência ilustram a velocidade de redução da área, evidenciando que o controle apresenta a maior taxa de fechamento (maior inclinação negativa), enquanto os tratamentos mantêm áreas abertas maiores ao final do experimento.



Fonte: o autor, 2025.

#### 4.2.2 Interpretação: Paralisia Funcional vs. Citotoxicidade

O conjunto dos dados indica que a BP-3 exerce um duplo impacto sobre as células HTR-8/SVneo, promovendo redução da viabilidade e inibição da migração. Destaca-se ainda que a inibição da migração foi observada inclusive em concentrações ou tempos no qual a morte celular total não havia ocorrido, implicando um efeito funcional precoce. As células permanecem vivas e aderidas, mas tornam-se estáticas ou disfuncionais.

A quantificação da “área não coberta” (*uncovered area*) significativamente maior no

grupo BP-3 sugere uma paralisia parcial da maquinaria motora celular.<sup>28</sup> Este fenômeno pode estar associado à interferência nas vias de sinalização do citoesqueleto, como a desregulação de proteínas de adesão focal ou inibição de metaloproteínas (MMPs), cuja ativação é comprovadamente um mecanismo vital para a proliferação e invasão eficaz da linhagem *HTR-8/SVneo*.<sup>2</sup> A interrupção destas vias por xenobióticos resulta na paralisia da maquinaria motora celular observada neste estudo.

### 4.3 ANÁLISE MULTIPARAMÉTRICA E LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS

Para investigar os mecanismos de citotoxicidade, realizou-se uma triagem multiparamétrica em células *HTR-8/SVneo* tratadas com 100  $\mu$ M de BP-2 e BP-3 por 24 horas. O protocolo incluiu a marcação nuclear com Hoechst 33342, avaliação de integridade de membrana com Iodeto de Propídio (PI) e detecção de ROS com CellROX® Green. É importante notar que, devido a restrições logísticas experimentais, as placas foram fixadas e mantidas em PBS a 4°C por 96 horas antes da aquisição das imagens, um fator considerado na interpretação dos dados de fluorescência labéis.

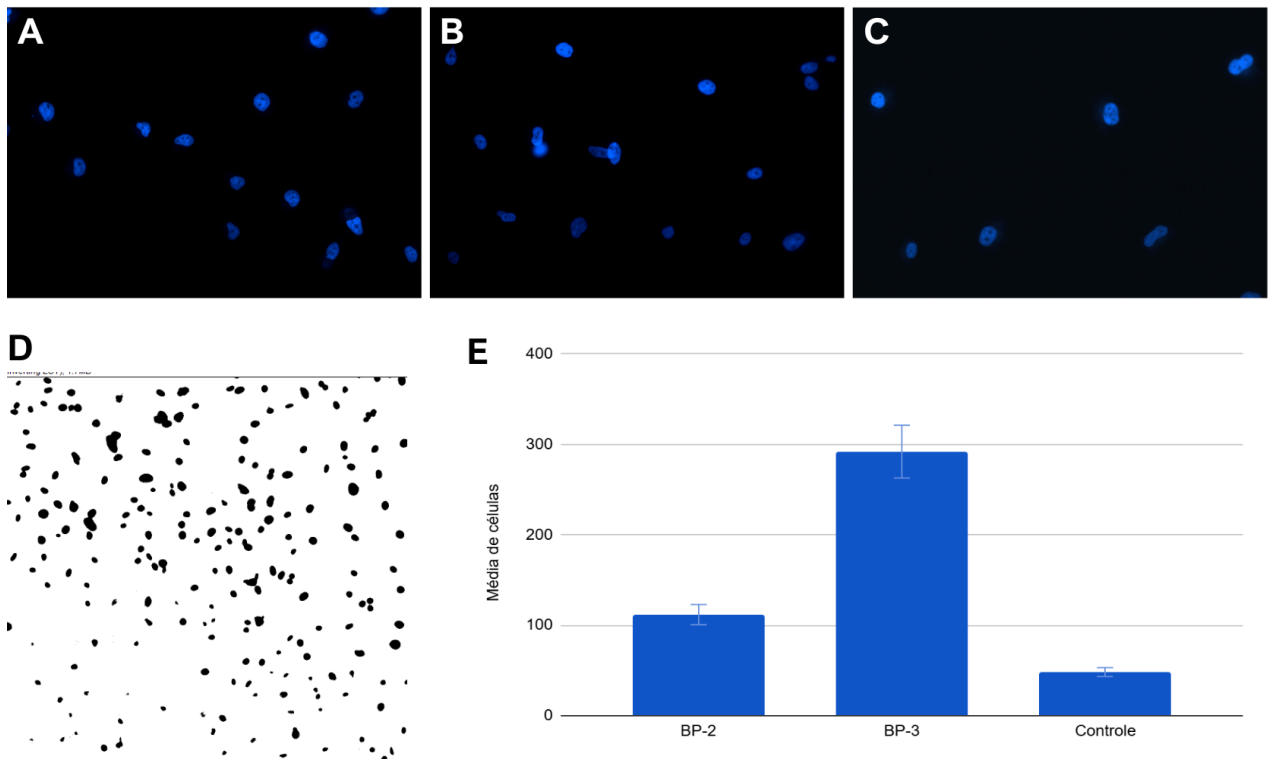
#### 4.3.1 Quantificação da Densidade Celular

A análise dos núcleos revelou um padrão inesperado de densidade celular nos grupos tratados. Não houve perda massiva de células e “campos vazios”, ao contrário, observou-se um fenômeno de retenção celular dependente do tratamento.

Conforme demonstrado na figura 7, o grupo controle apresentou a menor densidade celular média (~48 células/campo). Em contraste, os grupos expostos às BPs exibiram densidades significativamente maiores. O tratamento com BP-2 resultou em uma densidade intermediária (~112 células/campo), enquanto a BP-3 induziu um acúmulo celular acentuado, atingindo uma média de ~292 células/campo – um valor aproximadamente seis vezes superior ao do controle.

**Figura 7.** Análise quantitativa e qualitativa da densidade celular em células *HTR-8/SVneo* coradas com Hoechst 33342 (24h). (A-C) Micrografias de fluorescência representativas (ampliação objetiva 10x) com os núcleos marcados em azul. (A) Grupo BP-2. (B) Grupo BP-3. (C) Grupo Controle. (D) Exemplo de máscara binária de segmentação utilizada para

a contagem automatizada de núcleos via software ImageJ. (E) Gráfico de barras representando a média de células por campo ( $\pm$  desvio padrão). Nota-se o aumento expressivo da retenção celular no grupo BP-3 comparado ao controle.



Fonte: o autor, 2025.

#### 4.3.2 Avaliação Morfológica e Qualitativa

A Inspeção visual das microfotografias indica que o aumento da densidade celular está associado à presença de núcleos morfolologicamente íntegros, e não a artefatos de imagem. Não foi observado um aumento evidente de características típicas de apoptose tardia ou necrose, como picnose intensa ou cariorrexe, em nenhum dos grupos tratados. A Tabela 2 detalha as características observadas, destacando que, apesar da alta densidade nos grupos tratados, a arquitetura nuclear permaneceu preservada.

**Tabela 2.** Comparação Qualitativa Comparativa das Imagens Hoechst.

Parâmetro	Controle (Figura 6C)	BP-2 (Figura 6A)	BP-3 (Figura 6B)
Densidade	<b>Baixa.</b> Núcleos dispersos.	<b>Intermediária.</b> Maior que o controle.	<b>Alta.</b> Forte acúmulo celular no campo.

Morfologia	Núcleos bem definidos, tamanhos homogêneos.	Preservada, com poucos sinais de fragmentação.	Preservada, com poucos sinais de fragmentação.
Distribuição	Relativamente dispersa, poucos agrupamentos.	Leve tendência a agrupamentos.	Distribuição densa e relativamente homogênea.
Interpretação Visual	População celular típica de cultura com alta mobilidade/turnover.	A densidade visual é maior que a do controle, indicando ausência de perda celular massiva.	O maior número de núcleos entre as condições sugere forte retenção celular e inibição da dispersão.

Fonte: o autor, 2025.

#### 4.3.3 Avaliação de Estresse Oxidativo e Necrose: Considerações Técnicas

A análise com as sondas CellROX Green para estresse oxidativo, e PI para necrose não resultou em sinais fluorescentes detectáveis nos grupos tratados ou controle. Embora a ausência de sinal pudesse sugerir falta de toxicidade oxidativa ou lítica, o intervalo de 96 horas entre a fixação e a leitura impõe cautela na interpretação dos resultados.

O CellROX Green é retido após fixação com formaldeído, mas sua estabilidade a longo prazo em meio aquoso (PBS) é limitada, podendo ocorrer perda de sinal por difusão ou oxidação espontânea.<sup>36</sup> Similarmente, o PI, embora intercalante, pode ter sua fluorescência reduzida ou lixiviada durante o armazenamento prolongado sem meio de montagem antifade.<sup>39</sup> Portanto, não é possível excluir a ocorrência de estresse oxidativo transiente ou ruptura de membrana com base nestes dados específicos. Contudo, a ausência de *debris* celulares ou núcleos “fantasmas” na microscopia e análise via Hoechst reforça que, se houve morte necrótica, ela não foi o evento predominante responsável pela perda de função observada.

#### 4.4 DISCUSSÃO INTEGRADA: DESACOPLAMENTO METABÓLICO FUNCIONAL

Apesar das limitações na detecção de ROS, a integração dos dados pelo ensaio MTT, Hoechst e *Scratch Assay* permite delinear o mecanismo de ação das BPs avaliadas

neste estudo.

O cenário observado aponta para uma dicotomia entre citotoxicidade metabólica e paralisia funcional. Sendo o fenômeno mais intenso de desacoplamento induzido pela BP-3, sugerindo um estado de dormência ou senescência induzida por estresse, no qual a célula não apresenta funções não essenciais para a sua sobrevivência.<sup>26</sup> Quanto à paralisia migratória, a alta densidade celular nos campos tratados com BP-3, em contraste com a dispersão do controle, corrobora com os dados do ensaio de cicatrização, visto que a análise inferiu que as células perderam sua capacidade migratória e de dispersão.

Em contrapartida, a BP-2 exibiu um comportamento intermediário. Embora tenha causado um choque metabólico mais severo em 24h (menor IC50 no MTT), a retenção de células no campo (~112 células) foi menor que a da BP-3, sugerindo um componente de toxicidade letal mais pronunciado, levando à perda parcial de células ou a uma inibição menos eficiente da dispersão celular em comparação à BP-3. A falta de significância estatística na inibição da migração pela BP-2 reforça que seu impacto funcional é mais variável e menos específico que o da BP-3.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo visou elucidar os efeitos citotóxicos e funcionais de dois filtros ultravioleta amplamente disseminados, a Benzofenona-2 e a Benzofenona-3, sobre a fisiologia de células trofoblásticas de primeiro trimestre (*HTR-8/SVneo*). A integração de dados metabólicos, morfológicos e de motilidade permitiu traçar perfis toxicológicos distintos para cada composto, desafiando a interpretação direta de que a ausência de morte celular imediata equivale à segurança toxicológica.

Neste estudo demonstrou-se que a BP-2 exerce uma toxicidade metabólica severa. A sua estrutura polihidroxilada induziu um colapso quase total da atividade mitocondrial nas primeiras 24 horas de exposição, mesmo em concentrações inferiores às da BP-3. Contudo, esse efeito apresentou variação ao longo do tempo, sugerindo possíveis mecanismos de adaptação celular ou instabilidade química do composto.

Em contraposição, a BP-3 revelou um perfil de toxicidade leve e crônica, de particular relevância clínica. Embora menos potente em induzir falência metabólica imediata, a BP-3 demonstrou toxicidade cumulativa em exposições prolongadas (48 e 72h), e sua capacidade de induzir estado de quiescência metabólica e paralisia funcional

é particularmente preocupante. Como evidenciado pela alta densidade nuclear pela análise multiparamétrica, as células expostas à BP-3 permaneceram viáveis e fisicamente aderidas à placa, porém tornaram-se incapazes de migrar, resultando em uma falha significativa no fechamento da ferida *in vitro* conforme o ensaio *scratch assay*.

A análise multiparamétrica foi fundamental para refinar o mecanismo de ação, indicando que estes efeitos deletérios podem ocorrer na ausência de necrose lítica, ilustrado pelas membranas íntegras, ou na ausência de surtos oxidativos agudos detectáveis nas condições testadas. Os resultados suportam a hipótese de que as BPs atuam através de vias de sinalização que bloqueiam a motilidade celular e deprimem o metabolismo energético, mimetizando o fenótipo de trofoblastos disfuncionais observados na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e da restrição de crescimento intrauterino.

Em síntese, conclui-se que a exposição a estes contaminantes ambientais, especialmente a BP-3, possui o potencial de comprometer etapas críticas da placentação, como a invasão trofoblástica por perda de funcionalidade. Os dados apresentados reforçam a necessidade de estabelecer critérios mais restritivos para o uso de filtros UV orgânicos durante a gestação, e incentivam a adoção do princípio da precaução na formulação de produtos de cuidados pessoais. Recomenda-se que estudos futuros investiguem as vias moleculares específicas envolvidas na paralisia migratória e avaliem o impacto crônico em modelos de organóides placentários, visando aproximar ainda mais os resultados da complexidade do ambiente *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

GORE, A. C. et al. EDC-2: the endocrine society scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine Reviews*, v. 36, n. 6, p. E1–E150, 2015.

LIU, W.; WANG, R.; LIU, S.; YIN, X.; HUO, Y.; ZHANG, R.; LI, J. YKL-40 promotes proliferation and invasion of HTR-8/SVneo cells by activating Akt/MMP9 signalling in placenta accreta spectrum disorders. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 43, n. 1, 2023. DOI: 10.1080/01443615.2023.2211681.

KRAUSE, M.; KLIT, A.; JENSEN, M. B. et al. Sunscreens: are they beneficial for health? A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, v. 34, n. 3, p. 301–309, 2012.

ABUD, J. E.; PAGOTTO, R.; VALENTINA, G.; TEGLIA, C.; CULZONI, J.; BOLLATI-FOGOLÍN, M.; ZENCLUSSEN, M.; RODRIGUEZ, H. A. In vitro blastocyst implantation and trophoblast migration are disrupted by the UV filter benzophenone-3 (BP3). Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3210668/v1>. Acesso em: 5 dez. 2025.

VELA-SORIA, F.; JIMÉNEZ-DÍAZ, I.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, O.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J. L.; FERNÁNDEZ, M. F.; OLEA, N. Determination of benzophenones in human placental tissue samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 85, n. 4, p. 1848–1855, 2011. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.07.030.

ABUD, J. E.; PAGOTTO, R.; GALLIANI, V.; TEGLIA, C.; CULZONI, J.; BOLLATI-FOGOLÍN, M.; ZENCLUSSEN, M. L.; RODRÍGUEZ, H. A. In vitro blastocyst implantation and trophoblast migration are disrupted by the UV filter benzophenone-3 (BP3). *Environmental Pollution*, v. 349, p. 123840, 2024. DOI: 10.1016/j.envpol.2024.123840.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY (SCCS). Opinion on benzophenone-2 and benzophenone-5 (CAS No. 131-55-5 and 6628-37-1; EC No. 205-028-9 and 613-918-7). Public Health – European Commission. Disponível em: [https://health.ec.europa.eu/document/download/abb0eaac-a20b-43b1-8226-fb73d7167c6c\\_en?filename=sccs\\_o\\_301.pdf&prefLang=mt](https://health.ec.europa.eu/document/download/abb0eaac-a20b-43b1-8226-fb73d7167c6c_en?filename=sccs_o_301.pdf&prefLang=mt). Acesso em: 5 dez. 2025.

MUKHERJEE, I.; DHAR, R.; SINGH, S.; SHARMA, J. B.; NAG, T. C.; MRIDHA, A. R.; JAISWAL, P.; BISWAS, S.; KARMAKAR, S. Oxidative stress-induced impairment of trophoblast function causes preeclampsia through the unfolded protein response pathway. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 18415, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-97799-y.

ABOU-KHEIR, W.; BARRAK, J.; HADADEH, O.; DAOUD, G. HTR-8/SVneo cell line contains a mixed population of cells. *Placenta*, v. 50, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.12.007.

RED-HORSE, K.; ZHOU, Y.; GENBACEV, O. et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal–fetal interface. *Developmental Cell*, v. 8, n. 2, p. 181–193, 2004.

PROFITA, M.; FABBRI, E.; SPISNI, E.; VALBONESI, P. Comparing effects and action mechanisms of BPA and BPS on HTR-8/SVneo placental cells. *Biology of Reproduction*, v. 105, n. 5, p. 1355–1364, 2021. DOI: 10.1093/biolre/ioab139.

CELLOSAURUS. Cell line HTR-8/SVneo (CVCL\_7162). Disponível em: [https://www.cellosaurus.org/CVCL\\_7162](https://www.cellosaurus.org/CVCL_7162). Acesso em: 5 dez. 2025.

GRAHAM, C. H.; HAWLEY, T. S.; HAWLEY, R. G.; MACDOUGALL, J. R.; KERBEL, R. S.; KHOO, N.; LALA, P. K. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Experimental Cell Research*, v. 206, n. 2, p. 204–211, 1993.

HUANG, Q.; CHEN, H.; WANG, L.; JOHNSON, D. M.; LI, Y. Characteristics of human trophoblast cell line HTR-8/SVneo. *Placenta*, v. 33, n. 8, p. 682–687, 2012.

IARC. Benzophenone. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 101, 2012.

SFERRUZZI-PERRI, A. N.; HIGGINS, J. S.; VAUGHAN, O. R.; MURRAY, A. J.; FOWDEN,

A. L. Placental mitochondria adapt developmentally and in response to hypoxia to support fetal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 5, p. 1621–1626, 2019. DOI: 10.1073/pnas.1816056116.

HBM4EU. Benzophenones – substance report. Disponível em: [https://www.hbm4eu.eu/wp-content/uploads/2022/07/Benzophenones\\_Substance-report.pdf](https://www.hbm4eu.eu/wp-content/uploads/2022/07/Benzophenones_Substance-report.pdf). Acesso em: 5 dez. 2025.

KIM, S.; CHOI, K. Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review. *Environment International*, v. 70, p. 143–157, 2014. DOI: 10.1016/j.envint.2014.05.015.

NISHIHARA, T. et al. Estrogenic activities of benzophenone derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 19, n. 4, p. 1037–1043, 2000.

MOSE, T. et al. Placental passage of environmental chemicals. *Chemosphere*, v. 89, n. 8, p. 921-930, 2012.

KRAUSE, M.; KLIT, A.; JENSEN, M. B.; et al. Sunscreens: Are they beneficial for health? A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, v. 34, n. 3, p. 301–309, 2012.

ABUD, J. E.; PAGOTTO, R.; ZENCLUSSEN, M.; GALLIANI, V.; BOLLATI-FOGOLÍN, M.; RODRIGUEZ, H. A. The UV filter benzophenone 3 (BP3) alters the migration of the extravillous trophoblast cell line Swan 71 via androgen receptor pathway. 2021.

SCHLECHT, C.; KLAMMER, H.; JARRY, H.; WUTTKE, W. Effects of estradiol, benzophenone-2 and benzophenone-3 on the expression pattern of the estrogen receptors (ER) alpha and beta, the estrogen receptor-related receptor 1 (ERR1) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats. *Toxicology*, v. 205, p. 123–130, 2005. DOI: 10.1016/j.tox.2004.06.044.

SEIDLOVÁ-WUTTKE, D.; JARRY, H.; WUTTKE, W.; CHRISTOFFEL, J. Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A and dibutylphthalate in uterus, vagina and bone. *Toxicology*, v. 213, n. 1–2, p. 100–107, 2005.

WALKER, O. S.; RAGOS, R.; WONG, M. K.; ADAM, M.; CHEUNG, A.; RAHA, S. Reactive oxygen species from mitochondria impacts trophoblast fusion and the production of endocrine hormones by syncytiotrophoblasts. *PLoS One*, v. 15, n. 2, p. e0229332, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0229332.

CUQUERELLA, M. C.; LHIAUBET-VALLET, V.; CADET, J.; MIRANDA, M. A. Benzophenone photosensitized DNA damage. *Accounts of Chemical Research*, v. 45, n. 9, p. 1558–1570, 2012. DOI: 10.1021/ar300054e.

YANG, Y.; GAO, R.; ZHU, Z.; XIAO, W.; WANG, J.; ZHAO, W.; LI, Y. Benzophenone-3 exposure induced apoptosis via impairing mitochondrial function in human chondrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 287, p. 117286, 2024. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.117286.

WNUK, A.; RZEMIENIEC, J.; LASOŃ, W. et al. Benzophenone-3 impairs autophagy, alters epigenetic status, and disrupts retinoid X receptor signaling in apoptotic neuronal cells.

Molecular Neurobiology, v. 55, p. 5059–5074, 2018. DOI: 10.1007/s12035-017-0704-2.

ATCC. MTT cell proliferation assay. Disponível em: <https://www.atcc.org/-/media/product-assets/documents/instruction-sheets/multicomponent-products/mtt-cell-proliferation-assay.pdf?rev=b028c9a0390841afa2b4599e604e9839>. Acesso em: 5 dez. 2025.

WANG, Q.; FANG, Y.; LI, Y.; LIU, H.; ZHU, M.; HU, X.; ZHOU, J.; DENG, A.; SHEN, B.; CHEN, H. Pregnancy-Specific Beta-1-Glycoprotein 1 increases HTR-8/SVneo cell migration through the Orai1/Akt signaling pathway. *Biomolecules*, v. 14, n. 3, p. 293, 2024. DOI: 10.3390/biom14030293.

CHAUDHARY, P.; BABU, G. S.; SOBTI, R. C.; GUPTA, S. K. HGF regulate HTR-8/SVneo trophoblastic cells migration/invasion under hypoxic conditions through increased HIF-1 $\alpha$  expression via MAPK and PI3K pathways. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 13, n. 4, p. 503–521, 2019. DOI: 10.1007/s12079-019-00505-x.

GRADA, A.; OTERO-VINAS, M.; PRIETO-CASTRILLO, F.; OBAGI, Z.; FALANGA, V. Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 137, n. 2, p. e11–e16, 2017. DOI: 10.1016/j.jid.2016.11.020.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Hoechst 33342 protocol for imaging. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/hoechst-33342-imaging-protocol.html>. Acesso em: 5 dez. 2025.

CREATIVE BIOARRAY. Double staining apoptosis assay (Hoechst 33342/PI). Disponível em: <https://www.creative-bioarray.com/support/double-staining-apoptosis-assay-hoechst33342-pi.htm>. Acesso em: 5 dez. 2025.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. CellROX Green Flow Cytometry Assay Kit (Product C10492). Fisher Scientific. Disponível em: <https://www.fishersci.com/shop/products/cellrox-green-flow-cytometry-assay-kit/C10492>. Acesso em: 5 dez. 2025.

PEI, J.; PANINA, S. B.; KIRIENKO, N. V. Um ensaio automatizado de coloração nuclear diferencial para determinação precisa da citotoxicidade mitocana. *Journal of Visualized Experiments*, n. 159, p. e61295, 2020. DOI: 10.3791/61295.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY (SCCS). Opinion on benzophenone-3 (CAS No. 131-57-7; EC No. 205-031-5). Public Health – European Commission. Disponível em: [https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/sccs\\_o\\_247.pdf](https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/sccs_o_247.pdf). Acesso em: 5 dez. 2025.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Propidium iodide (PI) – Fluorophore information. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/pt/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/propidium-iodide.html>. Acesso em: 5 dez. 2025.