EFEITO DE DISSELENETO DE DIFENILA $(PhSe)_2$ NAS CÉLULAS PRÉ-TRATADAS COM MENADIONA

Qiuxin Lin Carretoni, Maricilia Silva Costa.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, linqx1019@gmail.com, mscosta@univap.br.

Resumo

O estudo analisou os efeitos combinados da menadiona e do disseleneto de difenila ($(PhSe)_2$) sobre células de *Candida albicans*, fungo patogênico associado a infecções em pacientes imunocomprometidos e conhecido por desenvolver resistência a antifúngicos convencionais. A menadiona, uma forma sintética da vitamina K, foi utilizada por sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e induzir estresse oxidativo. Os resultados mostraram que, em concentrações subletais, a menadiona aumentou a resistência celular, indicando uma resposta adaptativa ao estresse. Já o composto organosselênio $(PhSe)_2$ apresentou forte efeito inibitório sobre o crescimento fúngico, sem induzir essa adaptação. A combinação entre os compostos demonstrou efeito sinérgico, intensificando a inibição do crescimento de *C. albicans* e sugerindo uma abordagem promissora contra a resistência antifúngica. Estudos futuros devem investigar os mecanismos moleculares envolvidos e avaliar a segurança e eficácia dessa combinação em modelos in vivo.

Palavras-chave: *Candida albicans*, estresse oxidativo, compostos organocalcogêneo.

Área do Conhecimento: Biomedicina.

Introdução

A partir do final do século XX, as espécies de Candida assumiram o título de patógeno fúngico humano mais comum. Sabe-se que a patogenicidade do gênero Candida é regida pelas condições do hospedeiro, variando de infecções superficiais a sistêmicas e podem se apresentar com diferentes sinais clínicos. A candidíase pode, portanto, afetar a pele, as unhas, a boca, o esôfago e a mucosa vaginal e, nos casos mais graves, a corrente sanguínea, causando sepse, conhecida como Candidemia (BARCHIESI et al., 2016; (CALDERONE; CLANCY, 2011).

Sendo *C. albicans* a espécie mais frequentemente encontrada nas membranas mucosas humanas, é classificada como um patógeno oportunista devido à interrupção da flora normal. Isso pode ser causado pelo uso de antibióticos ou pelas alterações hormonais que acarretam infecções da mucosa no geral, provocando infecções superficiais da mucosa em hospedeiros saudáveis (CALDERONE; CLANCY, 2011).

C. albicans se torna um agente patogênico quando acomete pacientes imunossuprimidos, causando infecções fúngicas invasivas com uma taxa de mortalidade que pode chegar a 62,5% em pacientes transplantados, conforme dados da PATH Alliance®, que realizou uma vigilância prospectiva entre 2004 e 2008 em 25 centros médicos na América do Norte (AZIE et al., 2012). Pedroso e Krebs (2008) observaram, em estudo realizado na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, uma frequência global de candidíase sistêmica de 1,8%. Entre as espécies identificadas, *C. albicans* foi a mais frequente, correspondendo a 83,3% dos casos.

Várias características de *C. albicans* contribuem para sua alta prevalência em seres humanos, como a capacidade de transitar para a morfologia de hifa, que faz com que as células apresentem maior adesão à mucosa e, às vezes, contribuem para a invasão dos tecidos (DESAI, 2018; LOPES; LIONAKIS, 2022).

Além do fato de sua prevalência, foi observado um aumento na frequência de outras espécies de Candida, tais como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (ABI-SAID et al., 1997). Em seguida, acompanhou-se um aumento da frequência de infecções que se tornam resistentes à terapia antifúngica padrão, devido ao uso abundante e recorrente de antifúngicos derivados de azólicos, além da presença de espécies naturalmente resistentes ao fluconazol como *C. krusei* (MULU et al., 2013;

OROZCO et al., 1998). Além do aumento da resistência desses microrganismos aos antifúngicos, outro agravante é a toxicidade dessas drogas aos pacientes, como exemplo, a nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade (VAN DAELE et al., 2019).

Diante desse cenário, é importante a busca pelas possibilidades de tratamento de *C. albicans* com novos compostos antifúngicos, como os Compostos Organocalcogêneos (COs).

Os COs têm na sua composição elementos químicos calcogêneos, como o selênio (Se), telúrio (Te) e polônio (Po), que podem apresentar propriedades antioxidantes naturalmente (ROSSETI; ROCHA; COSTA, 2015; STEINBRENNER; SPECKMANN; KLOTZ, 2016). Compostos como $(PhSe)_2$ demostram diversas atividades antimicrobianas devido à sua propriedade de gerar estresse oxidativo, portanto são promissores como novas terapias antifúngicas (DA SILVA et al., 2021).

Alguns estudos demonstram a efetividade do $(PhSe)_2$ nos tratamentos de espécies de Candida. Segundo Da Silva et al. (2021), o $(PhSe)_2$ é capaz de diminuir significativamente a formação de biofilme de *C. albicans* e *C. krusei* e inibir os biofilmes formados, pela sua atuação nos fatores de virulência da *C. albicans* relacionados à adesão às superfícies. O $(PhSe)_2$ entra em contato com as células e estimula uma alta produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) gerando a morte celular (ROSSETI; ROCHA; COSTA, 2015). Um derivado de $(PhSe)_2$, o $(MeOPhSe)_2$, também demostrou potencial antifúngico contra *C. albicans* e *C. krusei* (DE AMORIM et al., 2018; DE SIQUEIRA et al., 2022). Porém, ainda são necessários mais estudos para compreender o mecanismo de ação de $(PhSe)_2$. Além disso, os COs não apresentaram citotoxicidade em células Hela, diferentemente de antifúngicos convencinais (DA SILVA et al., 2021; DE SIQUEIRA et al., 2022).

O Menadiona (2-Methylnaphthalene-1,4-dione) é um composto orgânico de cadeia aromática policíclica relacionada a vitamina K. Em altas concentrações é capaz de causar estresse oxidativo gerando EROs, que possuem a capacidade de causar lesões aos componentes celulares, como danos ao DNA, RNA e proteínas e, consequentemente, reduzem o crescimento de microrganismos (ABEGG et al., 2010; CRIDDLE et al., 2006; HOLLENSWORTH et al., 2000). Em baixas concentrações o Menadiona pode estimular a produção de proteínas antioxidantes tornando as células mais resistentes ao estresse oxidativo (JAMIESON; STEPHEN; TERRIÈRE, 1996). Essas características podem permitir o estudo da ação de alguns COs revelando se o mecanismo que leva à morte celular está associado ao estresse oxidativo ou não.

Metodologia

A cepa *Candida albicans* ATCC 10231 foi cultivada em ágar Sabouraud dextrose a 37 °C por 48 horas. Após o crescimento, a suspensão celular foi preparada em solução fisiológica estéril 0,9% e ajustada para 10^5 células/mL com auxílio da câmara de Neubauer. As soluções de menadiona e disseleneto de difenila ($(PhSe)_2$) foram preparadas em DMSO, mantendo a concentração final do solvente em 1% nos experimentos.

O estudo avaliou quatro condições experimentais. Na primeira, as células foram expostas diretamente à menadiona, em concentrações de 0,05 a 0,5 mM, por 24 horas. Na segunda, as células receberam pré-tratamento com menadiona por 90 minutos. Depois disso, a suspensão foi centrifugada e lavada duas vezes para remoção do composto, e as células foram incubadas em meio livre de menadiona por 24 horas.

Na terceira condição, as células pré-tratadas foram novamente expostas à menadiona, com o objetivo de avaliar a resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Na quarta condição, as células pré-tratadas com 0,1 ou 0,2 mM de menadiona foram expostas a concentrações crescentes de $(PhSe)_2$, de 1, 2, 5, 10 e 20 µM, por 24 horas, para avaliar o efeito combinado dos compostos e os experimentos desta condição foram repetidos em 8 vezes.

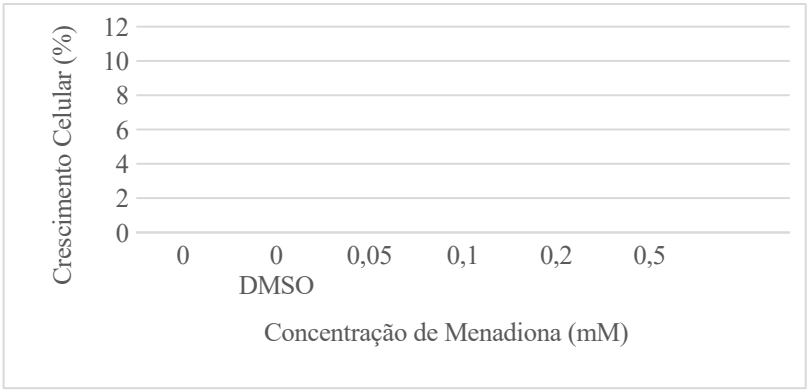
O crescimento celular foi avaliado pela leitura da densidade óptica a 570 nm em espectrofotômetro de microplacas.

Resultados

A menadiona apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *Candida albicans*, com resposta dependente da concentração. No contato direto por 24 horas, a maior inibição ocorreu na concentração de 0,5 mM, reduzindo o crescimento fúngico para 0,83% em relação ao controle como observado na

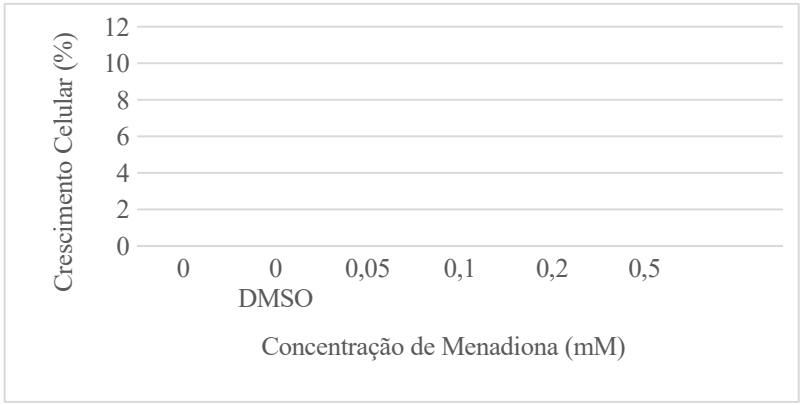
Figura 1. No pré-tratamento por 90 minutos, essa mesma concentração reduziu o crescimento para 28,05% (Figura 2).

Figura 1 - Efeito das diferentes concentrações de Menadiona no crescimento de *C. albicans* em contato direto.



Fonte: Autores, 2026.

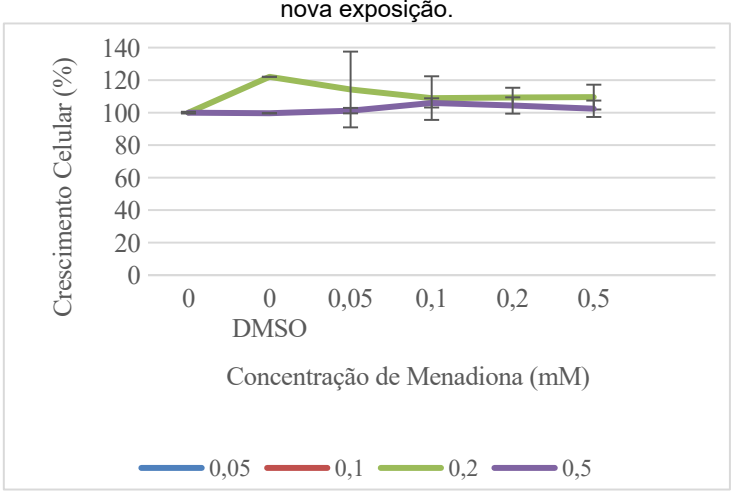
Figura 2 - Efeito das diferentes concentrações de Menadiona no crescimento de *C. albicans* pré-tratada.



Fonte: Autores, 2026.

Após o pré-tratamento com concentrações subletais de menadiona, as células apresentaram resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Quando foram reexpostas ao mesmo agente, mantiveram viabilidade entre 80% e 100%, indicando aumento da resistência celular após o estresse inicial.

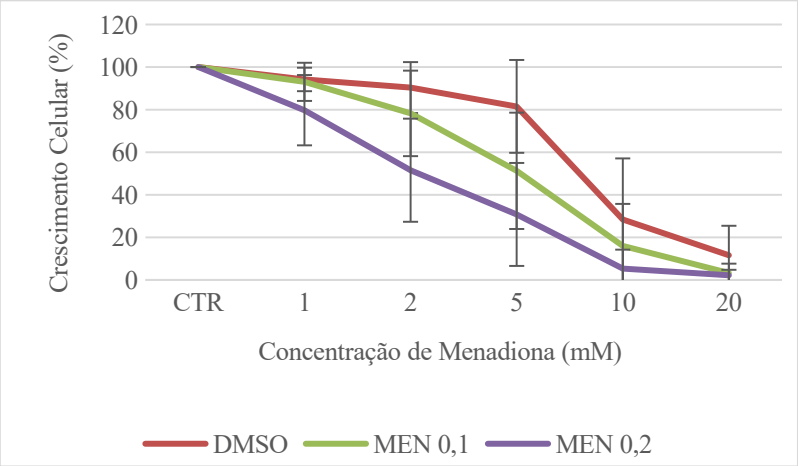
Figura 3 - Efeito das diferentes concentrações de Menadiona no crescimento de *C. albicans* pré-tratada e com a nova exposição.



Fonte: Autores, 2026.

O disseleneto de difenila ($(PhSe)_2$) apresentou forte efeito inibitório sobre as células de *C. albicans*, inclusive naquelas previamente adaptadas pela menadiona. As concentrações de 10 e 20 µM promoveram redução expressiva da proliferação celular (Figura 4).

Figura 4 - Efeito das diferentes concentrações de Menadiona no crescimento de *C. albicans* pré-tratada e com a exposição de $(PhSe)_2$.



Fonte: Autores, 2026.

A associação entre menadiona e $(PhSe)_2$ demonstrou efeito sinérgico, uma vez que a combinação dos compostos intensificou a inibição do crescimento fúngico. Esses resultados indicam que, embora a menadiona possa induzir mecanismos adaptativos em *C. albicans*, o $(PhSe)_2$ foi capaz de superar essa resistência e reduzir significativamente a viabilidade celular.

Discussão

As infecções fúngicas, particularmente aquelas causadas por *C. albicans*, representam um desafio significativo à saúde pública devido à crescente resistência aos tratamentos antifúngicos convencionais. O Menadiona tem sido estudada por suas propriedades como gerador de EROs, que podem aumentar o estresse oxidativo nas células fúngicas, levando à morte celular. No entanto, o uso isolado de Menadiona pode não ser suficientemente eficaz, especialmente contra cepas de *C. albicans* que desenvolveram mecanismos de resistência adaptativa. Por outro lado, o $(PhSe)_2$ é um composto organosselênio com potencial antifúngico, conhecido por aumentar a produção de EROs e a permeabilidade da membrana celular, intensificando o efeito terapêutico quando usado em combinação com outros antifúngicos. Estudos anteriores sugerem que $(PhSe)_2$ pode inibir o crescimento e a formação de biofilmes de *C. albicans*, características associadas à resistência e virulência do fungo (ROSSETI; ROCHA; COSTA, 2015).

O presente estudo investiga o efeito de $(PhSe)_2$ em células de *C. albicans* que foram pré-tratadas com Menadiona. A combinação desses dois compostos é explorada como uma estratégia para compreender a resistência antifúngica.

Neste estudo, o uso de Menadiona como um gerador de EROs é uma abordagem estabelecida, uma vez que o aumento do estresse oxidativo tem sido associado à inibição do crescimento de fungos patogênicos. Estudos anteriores, como os de Zaccaria et al. (2015) e Félix-Contreras et al. (2020), demonstraram o papel das EROs na modulação da patogenicidade e resistência fúngica, fornecendo uma base sólida para a escolha do Menadiona em presente experimento.

O protocolo experimental adotado, que envolve a incubação das células em placas de microtitulação com caldo Sabouraud, segue procedimentos padronizados utilizados em estudos microbiológicos para avaliar o crescimento microbiano. Stevenson et al. (2016) destaca a eficácia da DO como uma medida confiável de crescimento, com protocolos padronizados, a técnica permite resultados reproduzíveis e comparáveis entre estudos, tornando-se uma ferramenta essencial em pesquisa microbiológica.

A escolha de pré-tratar as células de *C. albicans* com Menadiona antes de submetê-las a uma nova exposição, baseando-nos na hipótese de que essa abordagem poderia esclarecer a capacidade

adaptativa do fungo. Jamieson et al. (1996) demonstraram que exposições prévias a concentrações subletais de oxidantes podem induzir uma resposta adaptativa, aumentando a resistência celular a desafios subsequentes. Em presente estudo, os dados confirmaram essa hipótese, mostrando que as células pré-tratadas com Menadiona exibiram uma resistência aumentada, corroborando com as descobertas de Jamieson et al. (1996).

No entanto, os resultados relativos ao pré-tratamento e exposição subsequente a $(PhSe)_2$ não seguiram o mesmo padrão. Apesar de $(PhSe)_2$ também atuar como um gerador de EROs, a resposta adaptativa não foi observada de maneira semelhante, mas um possível sinergismo. Essa discrepância pode ser atribuída a diferenças nos mecanismos de ação entre Menadiona e $(PhSe)_2$, bem como na capacidade de *C. albicans* de desenvolver resistência ao estresse oxidativo induzido por diferentes compostos.

Uma possível explicação para a falta de resposta adaptativa com $(PhSe)_2$ pode ser a diferença na intensidade ou no tipo de EROs geradas por este composto em comparação com o Menadiona. Enquanto o Menadiona tem sido amplamente estudada por seu papel na indução de estresse oxidativo moderado, que permite o desenvolvimento de respostas adaptativas, $(PhSe)_2$ pode gerar níveis de EROs que ultrapassam o limite de adaptação celular, levando a danos irreversíveis.

Os resultados do estudo ressaltam a complexidade das interações entre EROs e mecanismos de resistência fúngica, destacando a necessidade de entender essas diferenças para desenvolver tratamentos mais eficazes. A combinação de Menadiona e $(PhSe)_2$ pode oferecer uma estudo promissor para superar a resistência antifúngica em cepas resistentes de *C. albicans*. Futuros estudos podem focar na explicação dos mecanismos moleculares a essas respostas e na avaliação da eficácia in vivo dessas combinações terapêuticas.

Conclusão

Este estudo investigou o efeito combinado do Menadiona e do $(PhSe)_2$ em células de *C. albicans*, revelando interações importantes e eficácia antifúngica promissora. Os resultados mostraram que o Menadiona, ao causar estresse oxidativo, pode aumentar a resistência celular quando usada em concentrações subletais. Em contrapartida, o $(PhSe)_2$ apresentou um forte efeito inibitório sem provocar a mesma resposta adaptativa. A combinação desses compostos demonstrou um efeito sinérgico, aumentando a inibição do crescimento celular e sugerindo uma possibilidade para superar a resistência antifúngica. Pesquisas futuras podem focar em entender os mecanismos moleculares envolvidos e em testar essas combinações em estudos in vivo para avaliar sua segurança e eficácia clínica.

Referências

ABEGG, M. A. et al. Response to Oxidative Stress in Eight Pathogenic Yeast Species of the Genus Candida. **Mycopathologia**, v. 170, n. 1, p. 11–20, jul. 2010.

ABI-SAID, D. et al. The Epidemiology of Hematogenous Candidiasis Caused by Different Candida Species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 1122–1128, jun. 1997.

AZIE, N. et al. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 293–300, ago. 2012.

BARCHIESI, F. et al. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia in a tertiary referral center in Italy from 2010 to 2014. **Infection**, v. 44, n. 2, p. 205–213, abr. 2016 [5, 6].

CALDERONE, Richard A.; CLANCY, Cornelius J. (Ed.). **Candida and candidiasis**. American Society for Microbiology Press, 2011.

CRIDDLE, D. N. et al. Menadione-induced Reactive Oxygen Species Generation via Redox Cycling Promotes Apoptosis of Murine Pancreatic Acinar Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40485–40492, dez. 2006.

DA SILVA, B. M. et al. (PhSe)2 and (pCl-PhSe)2 organochalcogen compounds inhibit Candida albicans adhesion to human endocervical (HeLa) cells and show anti-biofilm activities. **Biofouling**, v. 37, n. 2, p. 235–245, 2021.

DE AMORIM, L. M. M. et al. The Organochalcogen Compound (MeOPhSe)2 Inhibits Both Formation and the Viability of the Biofilm Produced by Candida albicans. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 33, p. 3964–3971, 29 nov. 2018.

DE SIQUEIRA, V. M. et al. (MeOPhSe)2, a synthetic organic selenium compound, inhibits virulence factors of Candida krusei. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 73, 1 set. 2022.
DESAI, J. V. Candida albicans hyphae: From growth initiation to invasion. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, 1 mar. 2018.
FÉLIX-CONTRERAS, C. et al. Proteomic analysis of Sporothrix schenckii cell wall reveals proteins involved in oxidative stress response induced by menadione. **Microbial Pathogenesis**, v. 141, p. 103987, 1 abr. 2020.
HOLLENSWORTH, S. B. et al. Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 8, p. 1161–1174, 15 abr. 2000.
JAMIESON, D. J.; STEPHEN, D. W. S.; TERRIÈRE, E. C. Analysis of the adaptive oxidative stress response of Candida albicans. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, n. 1, p. 83–88, 1 abr. 1996.
LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of Candida albicans. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89–121, 2022.
MULU, A. et al. Frequent detection of 'azole' resistant Candida species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 82, 12 fev. 2013.
OROZCO, A. S. et al. Mechanism of Fluconazole Resistance in Candida krusei. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2645–2649, out. 1998.
Pedroso, C. P. A., & Krebs, V. L. J. (2008). Complicações da candidíase sistêmica em UTI neonatal. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 7(3), 280–288.
ROSSETI, I. B.; ROCHA, J. B. T.; COSTA, M. S. Diphenyl diselenide (PhSe)2 inhibits biofilm formation by Candida albicans. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 289–295, 1 jan. 2015.
STEINBRENNER, H.; SPECKMANN, B.; KLOTZ, L.-O. Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 113–119, 1 abr. 2016 [10, 22].
STEVENSON, K. et al. General calibration of microbial growth in microplate readers. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 38828, 13 dez. 2016.
VAN DAELE, R. et al. Antifungal drugs: What brings the future? **Medical Mycology**, v. 57, p. S328–S343, 1 jun. 2019.
ZACCARIA, M. et al. Menadione-Induced Oxidative Stress Re-Shapes the Oxylipin Profile of Aspergillus flavus and Its Lifestyle. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 4315–4329, out. 2015.

Agradecimentos

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudos, à Universidade do Vale do Paraíba e IP&D (Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento) pelo ambiente acadêmico e infraestrutura proporcionados, à minha orientadora Profa. Dra. Maricilia Silva Costa pela orientação e incentivo, e às minhas colegas do laboratório Giulia, Gabriela e Juliene pelas contribuições e por terem colaboração durante o desenvolvimento deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.