



## ASSESSMENT OF ANTIMYCOBACTERIAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF NEW NAPHTHOQUINONES IN SEARCHING FOR NEW DRUGS FOR ADJUVANT TREATMENT OF SEVERE PULMONARY TUBERCULOSIS

*Guilherme Augusto Machado Sales, Camila Couto do Espírito Santo, Sanderson Dias Calixto, Vinicius de Oliveira Mussi, Daniela de Luna Martins, Bruno Alves Pereira, Nayane Abreu do Amaral e Silva, Vitor Francisco Ferreira, Thatiana Lopes Biá Ventura Simão, Elena Lassounskaia*

Tuberculosis (TB) is the main cause of death from a single infectious agent. The increasing resistance of *M. tuberculosis* (Mtb) strains to available medications makes it necessary to develop new anti-TB drugs. In addition, the Mtb resistance leads to deleterious inflammatory processes in the lungs, increasing TB severity, that encourages the use of an adjunctive anti-inflammatory therapy. In previous studies, naphthoquinones demonstrated anthelmintic, antitumor and anti-inflammatory activities. In this work, we aimed to study a group of new naphthoquinones, for dual, anti-TB and anti-inflammatory, activities. We evaluated twenty-six naphthoquinones for antimycobacterial capacity against Mtb strains H37Rv (ATCC 25618) and M299 (hypervirulent isolate) grown in culture. The anti-inflammatory potential was evaluated in the cultures of macrophages stimulated by lipopolysaccharide (LPS) to produce inflammatory mediators, such as nitric oxide (NO), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ). Macrophages infected with Mtb H37Rv were used to assess the potential of the naphthoquinones to inhibit the intracellular growth of Mtb. Three samples (D1, D2 and D14) stood out for the antimycobacterial activity, showing MIC<sub>50</sub>  $27.2 \pm 1.0$ ;  $30.4 \pm 1.0$  and  $0.1 \pm 1.1$ , respectively, in the cultures of H37Rv strain and MIC<sub>50</sub>  $23.3 \pm 1.2$ ;  $18.5 \pm 1.3$  and  $0.3 \pm 1.0 \mu\text{M}$  in those of M299 strain. The D1 and D2 also reduced the intracellular growth of H37Rv bacteria in infected macrophages (MIC<sub>50</sub>  $13.2 \pm 1.1$  and  $4.8 \pm 1.2 \mu\text{M}$ , respectively). Samples D1, D2 and D14 were able to inhibit production of NO (IC<sub>50</sub>  $21.6 \pm 1.2$ ;  $10.1 \pm 1.0$  and  $34.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$ ), TNF- $\alpha$  (IC<sub>50</sub>  $100.3 \pm 1.2$ ;  $103.1 \pm 1.1$  and  $82.6 \pm 1.2 \mu\text{M}$ ) and IL-1 $\beta$  (IC<sub>50</sub>  $8.3 \pm 1.3$ ;  $31.3 \pm 1.2$  and  $60.4 \pm 1.0 \mu\text{M}$ ) in stimulated macrophages. Additionally, these samples presented low if any cellular toxicity (CC<sub>50</sub>  $80.1 \pm 1.8$ ;  $103.9 \pm 1.5$  and  $> 200 \mu\text{M}$ ). To study the mechanism of NO inhibition, we verified ability of the naphthoquinones to sequester the NO radical employing SNP test. The three most active samples showed low activity in this test (IC<sub>50</sub>  $193.9 \pm 1.3$ ;  $191.7 \pm 1.5$  and  $> 200 \mu\text{M}$ ), suggesting other mechanism of inhibition potential to sequester the NO radical. Ability of naphthoquinones to induce reduction of the expression or enzymatic activity of induced nitric oxide synthase (iNOS) is under current investigation. The obtained data demonstrate dual, anti-inflammatory and antimycobacterial activities, suggesting that these substances are promising candidates for the development of new drugs for treatment of severe pulmonary tuberculosis.

Instituição: UENF

Fomento da bolsa: UENF/FAPERJ



## **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICOBACTERIANAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS DE NOVAS NAFTOQUINONAS NA BUSCA DE NOVOS MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO ADJUVANTE DA TUBERCULOSE PULMONAR GRAVE**

*Guilherme Augusto Machado Sales, Camila Couto do Espírito Santo, Sanderson Dias Calixto, Vinicius de Oliveira Mussi, Daniela de Luna Martins, Bruno Alves Pereira, Nayane Abreu do Amaral e Silva, Vitor Francisco Ferreira, Thatiana Lopes Biá Ventura Simão, Elena Lassounskaia*

A tuberculose (TB) é a principal causa de morte por um único agente infeccioso. O aumento da resistência das cepas de *M. tuberculosis* (Mtb) aos medicamentos disponíveis torna necessário o desenvolvimento de novos fármacos anti-TB. Além disso, a resistência da Mtb leva a processos inflamatórios deletérios nos pulmões, aumentando a gravidade da TB, o que incentiva o uso de terapia anti-inflamatória adjuvante. Em estudos anteriores, as naftoquinonas demonstraram atividades anti-helmínticas, antitumoral e anti-inflamatória. Neste trabalho, objetivamos estudar um grupo de novas naftoquinonas para atividade dual, antimicobacteriana e anti-inflamatória. Avaliamos vinte e seis naftoquinonas quanto à capacidade antimicobacteriana contra as cepas Mtb H37Rv (ATCC 25618) e M299 (isolado hipervirulento) cultivadas em cultura. O potencial anti-inflamatório foi avaliado em culturas de macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) para a produção mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ). Macrófagos infectados com Mtb H37Rv foram usados para avaliar o potencial das naftoquinonas em inibir o crescimento intracelular da Mtb. Três amostras (D1, D2 e D14) se destacaram pela atividade antimicobacteriana, apresentando MIC<sub>50</sub> 27.2  $\pm$  1.0; 30.4  $\pm$  1.0 e 0.1  $\pm$  1.1, respectivamente nas culturas da cepa H37Rv e MIC<sub>50</sub> 23.3  $\pm$  1.2; 18.5  $\pm$  1.3 e 0.3  $\pm$  1.0  $\mu$ M na cepa M299. D1 e D2 também reduziram o crescimento intracelular da cepa H37Rv em macrófagos infectados (MIC<sub>50</sub> 13.2  $\pm$  1.1 e 4.8  $\pm$  1.2  $\mu$ M, respectivamente). As amostras D1, D2 e D14 foram capazes de inibir a produção de NO (IC<sub>50</sub> 21.6  $\pm$  1.2; 10.1  $\pm$  1.0 e 34.1  $\pm$  1.1  $\mu$ M), TNF- $\alpha$  (IC<sub>50</sub> 100.3  $\pm$  1.2; 103.1  $\pm$  1.1 e 82.6  $\pm$  1.2  $\mu$ M) e IL-1 $\beta$  (IC<sub>50</sub> 8.3  $\pm$  1.3; 31.3  $\pm$  1.2 e 60.4  $\pm$  1.0  $\mu$ M) em macrófagos estimulados. Além disso, essas amostras apresentaram toxicidade celular baixa ou nenhuma (CC<sub>50</sub> 80.1  $\pm$  1.8; 103.9  $\pm$  1.5 e > 200  $\mu$ M). Para estudar o mecanismo de inibição do NO, verificamos a capacidade das amostras de sequestrar o radical NO empregando o teste SNP. As três amostras mais ativas mostraram baixa atividade neste teste (IC<sub>50</sub> 193.9  $\pm$  1.3; 191.7  $\pm$  1.5 e >200  $\mu$ M), sugerindo outro mecanismo de inibição potencial para sequestrar o radical NO. A capacidade das naftoquinonas de induzir a redução da expressão ou atividade enzimática da óxido nítrico sintase (iNOS) está sob investigação atualmente. Os dados obtidos demonstram dupla atividade, antimicobacteriana e anti-inflamatória, sugerindo que essas substâncias são candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose pulmonar grave.