

## (12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual  
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional

WO 2011/140623 A1

PCT

(51) Classificação Internacional de Patentes :  
*A61K 36/07* (2006.01)      *A61P 33/02* (2006.01)

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Requerentes (para US únicamente) :  
**FERRAZ COELHO, Eduardo Antonio** [BR/BR]; Rua Ponte Nova, nº 636, apto 301, Bairro Colegio Batista, CEP: 31110-150, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).  
**CÉSAR BENTO RÉGIS, Wiliam** [BR/BR]; Rua Pastor Francisco Pessoa, nº 38., Bairro Barreiro, CEP: 30640-350, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).  
**GARCIA VALADARES, Diogo** [BR/BR]; Rua Irai, nº 214, apto 501 A, Bairro Cidade Jardim, CEP: 30380-725, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).  
**PEREIRA TAVARES, Carlos Alberto** [BR/BR]; Rua Rovigo, nº 501, Bairro Pampulha, CEP: 31340-500, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).  
**SALLES MOURA FERNANDES, Ana Paula** [BR/BR]; Rua Cônego Rocha Franco, nº 120, apto 1000, Bairro Gutierrez, CEP: 30430-000, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).  
**SILVANO DE OLIVEIRA, Jamil** [BR/BR]; Rua Óliver, nº 251, Bairro União, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).  
**MATOS SANTORO, Marcelo** [BR/BR]; Rua Centauro, nº 461, apto 101, Bairro Santa Lúcia, CEP: 30360-310, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).

(21) Número do Pedido Internacional :  
PCT/BR2011/000147

(22) Data do Depósito Internacional :  
11 de Maio de 2011 (11.05.2011)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :  
*PI1002067-5* 11 de Maio de 2010 (11.05.2010) BR  
*014110001570* 11 de Maio de 2011 (11.05.2011) BR

(71) Requerentes (para todos os Estados designados, exceto US) : **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG** [BR/BR]; Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2013, CEP:31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais (BR).  
**MINASFUNGI DE BRASIL** [BR/BR]; Travessa Dois Mil Cento e Onze, nº 36A, Bairro Ribeiro de Abreu, CEP 31872-403, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).

(Continua na página seguinte)

(54) Title : FORMULATION AGAINST LEISHMANIASIS AND USE THEREOF

(54) Título : FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA E SEU USO

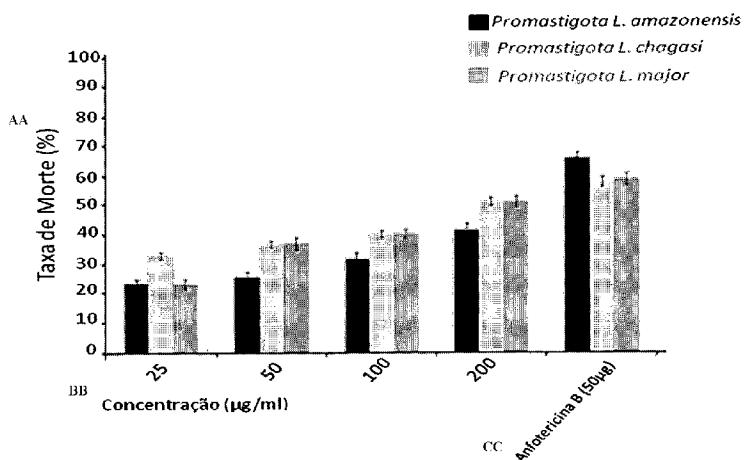


Figura 1

AA Mortality rate (%)  
BB Concentration (µg/ml)  
CC Amphotericin B (50µg)

(57) Abstract : The present invention relates to the development of pharmaceutical formulations obtained from an aqueous extract of the *Agaricus blazei* mushroom and purified fractions thereof for the treatment of leishmaniasis. In particular, the present invention describes formulations preferably for topical and oral use in the form of solid, semi-solid and liquid pharmaceutical formulations selected in the group comprising gels, creams, ointments, pastes, emulsions in general, solutions, pills and capsules for the treatment of canine and human cutaneous and visceral leishmaniasis.

(57) Resumo :

(Continua na página seguinte)



- (74) **Mandatário** : DE CASTRO LEITE GORI, Ana Luiza; Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2013, CEP:31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais (BR).
- (81) **Estados Designados** (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes*) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados Designados** (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicado:**

- com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))
- antes da expiração do prazo para modificar as reivindicações e a republicar na eventualidade de receção de tais modificações (Regra 48.2(h))

## FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA E SEU USO

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas obtidas a partir do extrato aquoso do cogumelo *Agaricus blazei* e suas frações purificadas para o tratamento das leishmanioses. Mais 5 particularmente, a presente invenção descreve formulações preferencialmente para uso tópico e oral, sob a forma de formulações farmacêuticas sólidas, semi-sólidas e líquidas selecionadas de um grupo compreendendo gel, creme, pomada, pastas, emulsões em geral, soluções, comprimidos e cápsulas para o tratamento das Leishmanioses Tegumentar e Visceral canina e humana.

10 O cogumelo *Agaricus blazei* (*A. blazei*) é um fungo aeróbio que tem o potencial de degradar matéria orgânica rica em celulose, hemicelulose e lignina para a obtenção de energia. Esse cogumelo foi reclassificado por Wasser (2002) para *Agaricus brasiliensis*, porém, a denominação de *Agaricus blazei* tem sido a mais usada na literatura científica devido aos aspectos 15 biotecnológicos e medicinais do cogumelo, assim como na maioria dos seus produtos comercializados [WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 60, p. 258-74, 2002); AMAZONAS, M.A.L.A. *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* ss. Heinem.): última visão sobre a polêmica questão da identidade 20 taxonômica de um dos cogumelos mais promissores no mercado mundial. In: Simpósio internacional sobre cogumelos no Brasil, Brasília, DF. p. 78-80, 2004].

O seu valor nutricional e medicinal, aliado a características peculiares como seu sabor, a fragrância de amêndoas e excelente textura, o tornam 25 particularmente adequado para inúmeras aplicações culinárias, sendo um dos cogumelos cultivados mais valorizados no mercado mundial (STIJVE, T., AMAZONAS, M.A.L., GILLER, V. Flavor and taste components of *Agaricus blazei* ss. Heinem: a new gourmet and medicinal mushroom. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, Stuttgart, v. 98, p. 448-453, 2002).

30 Dentre os vários benefícios do *A. blazei* para o organismo humano estão o controle da diabetes do tipo II, da hipertensão arterial e da osteoporose, a recaptação de cálcio por meio do ergosterol, o tratamento do câncer e da AIDS.

Algumas destas propriedades estão relacionadas às substâncias presentes no composto alimentar do *A. blazei*, tais como o beta-D-glucano, cerebrosídeos, esteróides, ergosterol e ácidos graxos (MIZUNO, M., MORIMOTO, M. MINATO, K., TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte 5 T-cell subsets in mice. Biosci. Biotechnol. Biochem., v. 62, p. 434-437, 1998). Sua atividade biológica mais destacada e estudada é a imunoestimulação o que confere proteção contra infecções e ajuda na eliminação de células malignas (URBEN, A.F. Caracterização morfológica e fisiológica de acessos de *Agaricus blazei* e *A. sylvaticus*. In: V Congresso latino americano de micologia, 10 Brasília, p. 203-205, 2005).

O principal mecanismo de ação de *A. blazei* parece estar relacionado com a atividade biológica de polissacáideos, principalmente, o chamado (1→6)-(1→3)-β-D-glucano, encontrado no corpo de frutificação. Em países como Japão, Rússia, China e Estados Unidos, diferentes polissacáideos com 15 atividades antitumorais foram extraídos do corpo de frutificação e micélio de várias espécies de cogumelos medicinais. A maioria destes polissacáideos não atua sobre as células tumorais diretamente, porém produz efeitos antitumorais indiretos devido à ativação de diferentes vias da resposta imunológica do hospedeiro. A ação biológica do consumo de cogumelos 20 observada sobre o sistema imune se deve, principalmente, ao aumento da estimulação e ativação de macrófagos, (WASSER, S.P. & WEIS, A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (review). Int. J. Med., v. 1, p. 31-62, 1999).

A atividade imunoestimulatória de *A. blazei* tem sido caracterizada por 25 diversos grupos de pesquisa (MIZUNO, T. & HAGIWARA, T. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. Agricult Biologic Chemist, Tokyo, v. 54, p. 2889-2896, 1990a; MIZUNO, T., INAGAKI, R., KANAO, R. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from 30 "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. Agric. Biol. Chem., 54, 2897-2905, 1990b; EBINA, T. & FUJIMIYA, Y. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor

system in mice. *Biotherapy*, v. 11, p. 259-65, 1998; KUO, Y.C., HUANG, Y.L., CHEN, C.C. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 140, p. 176-87, 2002). Estudos utilizando frações solúveis em água a 5 100°C indicaram sua ação inibitória sobre o crescimento de tumores sólidos e de células tumorais, além da redução de metástases As frações estudadas levaram especificamente a um aumento significativo na proliferação de linfócitos T e B *in vitro* e ao aumento da atividade das células NK (DONG Q, YAO J, YANG XT, FANG JN. Structural characterization of a water-soluble 10 beta-D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydr Res.*, v. 3, p.1417-21, 2002; FUJIMIYA Y; SUZUKI Y; OSHIMAN K.; Selective tumoricidal effect of soluble proteoglucan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother.*, v. 46, p. 147-59, 1998). Estudos *in vivo* 15 demonstraram a ação imunoestimulatória dessas frações sobre linfócitos T, indução do aumento da expressão de citocinas e interleucinas (tais como a IL-6 e IL-1 $\beta$ ), a diferenciação de células B, aumento da produção de anticorpos e da expressão dos receptores CR3 (Mac-1), B7-1 e CD25, considerados marcadores de superfície celular que reconhecem células tumorais e 20 patógenos (NAKAJIMA, A., ISHIDA, T., KOGA M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *Int Immunopharmacol.*, v. 2, p. 1205-11, 2002). Outros estudos demonstraram a inibição de células tumorais pelo *A. blazei* através da ativação imunológica, dependente da via alternativa do complemento, e formação de um complexo 25 opsonizante com C3bi no soro humano (SHIMIZU, S., KITADA, H., YOKOTA, H. Activation of the alternative complement pathway by *Agaricus blazei* murill. *Phytomedic.*, v. 9, p. 536-45, 2002).

Sorimachi e colaboradores (2001) observaram que componentes de *A. blazei* são capazes de ativar macrófagos, resultando em um aumento na 30 produção de citocinas tais como TNF- $\alpha$ , IL-8 e óxido nítrico (NO). Já um extrato aquoso de *A. blazei* aumentou a expressão de mRNA de IL-1 $\beta$  e IL-6, tanto em macrófagos peritoneais quanto nas células esplênicas de camundongos

estimuladas *in vitro* (SORIMACHI, K., AKIMOTO, K., IKEHARA, Y. Secretion of TNF- $\alpha$ , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* murrill fractions *in vitro*. *Cell Struct. Func.*, v. 26, p. 103-108, 2001; NAKAJIMA, A., ISHIDA, T., KOGA M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill 5 on antibody-producing cells in mice. *Int Immunopharmacol.*, v. 2, p. 1205-11, 2002). Diferentes frações extraídas do extrato aquoso de *A. blazei*, originário da cultura de micélio e do corpo de frutificação, induziram a secreção de citocinas, tais como IL-8 e TNF- $\alpha$ , pelos macrófagos da medula óssea de ratos e o aumento na secreção de NO *in vitro* (Sorimachi e col, 2001). A estimulação 10 das células NK, a geração de células citotóxicas seletivas e a indução de apoptose nas células tumorais *in vitro* pelo extrato de proteoglicanas extraídas do *A. blazei* também foram demonstradas (FUJIMIYA Y; SUZUKI Y; OSHIMAN K.; Selective tumoricidal effect of soluble proteoglucan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation 15 and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother.*, v. 46, p. 147-59, 1998). Além da sua atividade antitumoral, estudos têm demonstrado que polissacarídeos de cogumelos têm propriedades antimicrobianas, antivirais, hepatoprotetor, antifibrótico, hipoglicêmico e hipocolesterolêmico (SAKAGAMI, H., AOKI, T., SIMPSON, A. Induction of immunopotentiation activity by a protein-bound 20 polysaccharide, PSK (Review). *Anticancer Res.*, v. 11, p. 993-1000, 1991; SORIMACHI, K., NIWA, A., YAMAZAKI, S. Antiviral activity of water-solubilized lignin derivatives *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.*, v. 54, p. 1337-1339, 1990; OOI, V.E.C. Hepatoprotective effect of some mushrooms. *Phytother. Res.* West Sussex, v. 10, p. 536-538, 1996; PARK, E.J., KO, G., KIM, J. Antifibrotic effects 25 of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, glycyrrhizin, and pentoxifyline in rats with cirrhosis induced in biliary obstruction. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 20, p. 417-420, 1997; HIKINO, H. & MIZUNO, T. Hypoglycemic actions of some heteroglycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med.*, v. 55, p. 385, 1989; CHEUNG, P.C.K. The hypocholesterolemic effect of extracellular 30 polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. *Nutr. Res.*, v. 16, p. 1953-1957, 1996).

A presente invenção descreve o emprego do extrato aquoso de *A. blazei* e de suas frações protéicas e não-protéicas purificadas, a partir deste, para o tratamento tópico e oral das leishmanioses Tegumentar e Visceral canina e humana.

5 As leishmanioses são doenças causadas por protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*, que podem causar desde lesões cutâneas simples, de cura espontânea, até a forma visceral, fatal, quando não tratada (DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., v. 27, p. 305-318, 2004).

10 O parasita *Leishmania* apresenta duas formas morfológicas principais: a promastigota e amastigota. As formas promastigotas são formas alongadas, flageladas, móveis, com núcleo único e cinetoplasto, localizado entre a porção anterior e o núcleo, que se multiplicam no trato digestivo do inseto vetor. As formas amastigotas são formas arredondadas, com flagelo rudimentar, 15 cinetoplasto em forma de bastão, e que se multiplicam no interior das células do sistema fagocítico-monocitário no hospedeiro mamífero (Grimaldi, G.Jr. & Tesh, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Rev., v. 6, p. 230-250, 1993).

Diferentes espécies de mamíferos, dentre os quais roedores e canídeos, 20 são reservatórios naturais do parasita e servem como fonte de infecção para o vetor. O cão pode ser apontado como o principal reservatório doméstico para a leishmaniose visceral (LV). Raposas e lobos são reservatórios silvestres da doença, enquanto marsupiais e roedores podem ser reservatórios de espécies que causam a leishmaniose tegumentar (LT). Os vetores da doença são 25 flebotomíneos, fêmeas (Díptera: Psicodidae), pertencentes ao gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* em países do Velho Mundo (SACKS, D. & KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu. Rev. Microbiol., v. 55, p. 453-483, 2001).

A infecção pelo vetor ocorre no momento em que a fêmea se alimenta 30 de um hospedeiro infectado quando, juntamente com o sangue, macrófagos contendo formas amastigotas são ingeridos. Ocorre então a liberação das amastigotas no tubo digestivo do vetor que, rapidamente, passam por

alterações bioquímicas e morfológicas e evoluem para a forma promastigota procíclica e, então, à promastigota metacíclica. O hospedeiro mamífero é infectado quando é picado por um vetor contaminado; quando o mesmo injeta as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* sob a pele do hospedeiro.

- 5 Essas formas são opsonizadas por proteínas do sistema do complemento ou anticorpos e/ou fagocitadas por macrófagos, formando os fagolisossomos, onde se transformam em amastigotas. Após sucessivas replicações por divisão binária, o parasita pode causar a lise dos macrófagos e consequente liberação dos mesmos. As amastigotas podem ser fagocitadas por novos macrófagos,
- 10 finalizando o ciclo de infecção no hospedeiro mamífero, ou podem ser ingeridas por outro vetor, completando, assim, o ciclo biológico do parasita (Grimaldi, G.Jr. & Tesh, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Rev., v. 6, p. 230-250, 1993; Sacks, D. & Sher, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat. Immunol., v. 3, p. 1041-1047, 2002.)

Diversas espécies de *Leishmania* já foram descritas, podendo ser apontadas como causadoras de diferentes formas clínicas da doença. A LT caracteriza-se por uma diversidade de manifestações clínicas e de espécies causadoras da doença. No Brasil, ela pode ocorrer devido à infecção por 20 *Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. shawi*, *L. laionii* e *L. naiffi* podendo, clinicamente, apresentar-se de forma localizada ou disseminada. A forma cutânea da leishmaniose tegumentar caracteriza-se pela existência de uma lesão única com bordas elevadas, de fundo granuloso e indolor. Lesões vegetantes, verrucosas ou infiltrativas são menos frequentes 25 (MARZOCHI, M.C., MARZOCHI, K.B., CARVALHO, R.W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. Parasitol. Today, v. 10, p. 34-37, 1994; DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., v. 27, p. 305-318, 2004; Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American 30 cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. V. 99, p. 239-251, 2004). Existem ainda casos de leishmaniose mucocutânea, que ocorrem em diversos países e

são causados pelas espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. Nesta forma, as lesões apresentam caráter infiltrativo que podem ulcerar e sangrar. A forma cutâneo-difusa ocorre devido à infecção pela espécie *L. aethiopica*, existente na África ou pelas espécies *L. amazonensis* e 5 *L. mexicana* em países da América do Sul. É uma forma em que as lesões podem apresentar-se como placas, nódulos, às vezes vegetantes, mas que raramente ulceram. As lesões disseminam-se em regiões expostas do corpo e tal quadro pode estar associado à ineficiência ou ausência de uma resposta imune efetiva pelo hospedeiro (WEIGLE, K. & SARAVIA, N.G. Natural history, 10 clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. Clin. Dermatol., v. 14, p. 433-450, 1996.; Desjeux, 2004).

Dados da Organização Mundial de Saúde indicam haver incidência dessa doença em cerca de 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. A incidência anual estimada é de cerca de 1.0 a 1.5 milhões 15 de novos casos de LT e cerca de 500 mil casos de LV. Cerca de 350 milhões de pessoas estão em áreas de risco para infecção e estima-se o aumento do número de casos em todo o mundo nos próximos anos (SHAW, J. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. A mini-review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 102, p. 541-7, 2007).

20 Outro aspecto que tem apresentado importância clínica e epidemiológica é a co-infecção entre o vírus HIV e *Leishmania*. As leishmanioses podem modificar a progressão da doença causada pelo HIV e facilitar a imunossupressão causada pelo vírus levando à progressão da doença, em diversos países do mundo.

25 O tratamento do homem doente por leishmanioses deve ser realizado para se evitar a mortalidade causada pela LV e reduzir a morbidade provocada pelas lesões desfigurantes observadas nas formas mais severas de LT. Normalmente, o tratamento consiste na aplicação local ou sistêmica de compostos antimoniais pentavalentes, dos quais o estibogluconato de sódio 30 (Pentostam®, Glaxo Wellcome, Inglaterra) e o N-metil antimoniato de meglumina (Glucantime®, Rhône Poulenc Rorer, França) são os mais utilizados (CARVALHO, P.B.; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis. What

do we know about its chemotherapy? Braz. J. Pharmac. Sci., v. 36, p. 69-96, 2000. FRANKE, E.D.; WIGNALL, F.S.; CRUZ, M.E.; ROSALEZ, E.; TOVAR, A.A.; LUCAS, C.M.; LIANOS-CUENTAS, A.; BERMAN, J.D. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. Ann. Intern. Med., 5 v. 113, p. 934-940, 1990. HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. Lancet, v. 354, p. 1191-1199, 1999).

No Brasil, o Glucantime® tem sido utilizado como fármaco de escolha. Entretanto, tal fármaco pode interagir com sulfidrilas de proteínas celulares do hospedeiro causando perda de função e/ou formando complexos com 10 ribonucleosídeos, o que torna a ação do produto inespecífica em relação às células infectadas e àquelas não-infectadas. Fármacos de segunda linha, como a anfotericina B, têm sido recomendados nos casos de intolerância ou resistência ao tratamento convencional, devendo ser administrados exclusivamente em ambiente hospitalar (SUNDAR, S., SINGH, A., AGARWAL, 15 D., RAI, M., AGARWAL, N., CHAKRAVARTY, J. Safety and efficacy of high-dose infusions of a preformed amphotericin B fat emulsion for treatment of Indian visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 80, p. 700-3, 2009).

O tratamento humano com antimoniais pentavalentes possui diversas limitações que reduzem a adesão do paciente ao mesmo, dentre elas a longa duração do tratamento (20 a 40 dias, com aplicações diárias dos produtos), as 20 vias de aplicação dos fármacos (intramuscular ou endovenosa) e os efeitos colaterais graves provocados pelo uso dos fármacos. Altas doses diárias, necessárias no curso do tratamento, podem causar fadiga, artralgias, mialgias além de toxicidade renal (insuficiência renal crônica), hepática (cirroses) e 25 cardíaca (arritmias). Pode-se citar ainda a dificuldade de transporte dos pacientes, que normalmente residem em áreas rurais, até os centros mais especializados de saúde, além do custo elevado dos fármacos (CARVALHO, P.B.; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? Braz. J. Pharmac. Sci., v. 36, p. 69-96, 2000. GROGL, 30 M.; MARTIN, R.K.; ODUOLA, A.M.J.; MILHOUS, W.K.; KYLE, D.E. Characteristics of multidrug resistance in *Plasmodium* and *Leishmania*: detection of P-glycoprotein-like components. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 45, p.

98-111, 1991. TAVARES CA, FERNANDES AP, MELO MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn.* v. 3, p. 657-667, 2003). Tais aspectos dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento, sendo comum o abandono ou a interrupção do mesmo, o que leva ao aumento da resistência 5 do parasita aos fármacos utilizados.

Cunningham (2002) relatou que cerca de 10 a 25% dos pacientes com LV, tratados com antimoniais pentavalentes, apresentaram resistência ao tratamento ou casos de recidiva. Sundar (2001) também relatou que uma porcentagem significativa de pacientes com a doença visceral causada por *L. 10 donovani* apresentaram resistência ao tratamento com Pentostam®(CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.*, v. 72, p. 131-141, 2002. Para estes casos, a pentamidina e anfotericina B podem ser utilizadas, apesar da toxicidade elevada e do alto custo desses fármacos (Grimaldi & Tesh, 1993).

15 Os cães são importantes reservatórios no ciclo doméstico da LV e são considerados a principal fonte de infecção para os flebotomíneos devido à forte prevalência da infecção canina, quando comparada à infecção humana. Cães infectados, mesmo assintomáticos, apresentam grande quantidade de parasitos na pele o que favorece a infecção do inseto vetor, a partir deste 20 reservatório e, consequentemente, a transmissão ao homem. Cabe ressaltar que a infecção humana não tem impacto no ciclo biológico como importante fonte de infecção (Tesh, 1995 e WHO, 2003). Este fato, associado à letalidade da LV na ausência do tratamento, levou o Ministério da Saúde do Brasil a adotar a eliminação de cães quando soropositivos para antígenos de 25 *Leishmania*, como medida de controle da infecção. Entretanto, técnicas sorológicas, como RIFI e ELISA, usualmente utilizadas para diagnosticar a doença no cão, podem apresentar sensibilidade e especificidade variadas e, desta forma, serem subestimadas as taxas reais de infecção. Isso permite a manutenção de animais infectados, sendo este um dos motivos do insucesso 30 no controle da doença (Tesh, 1995).

Fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da LV canina como o alopurinol, os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B não são viáveis

como medida de controle da doença, pois têm preço elevado e, frequentemente, cães tratados e clinicamente curados sofrem recidivas, permanecendo como fontes de infecção para o vetor (Tesh, 1995). Além disso, o uso dessas drogas no tratamento em massa da LV canina traz outra 5 preocupação que é o possível aumento do risco de seleção de linhagens resistentes a tais fármacos que também são utilizados para tratar o homem (Reithinger *et al.*, 2002).

Pelo diversos fatos expostos, ressalta-se a necessidade de novas pesquisas voltadas para a descoberta de novas alternativas terapêuticas para o 10 tratamento do homem e de cães contra a doença.

Assim, a identificação de novos compostos/produtos/fármacos que sejam menos tóxicos aos pacientes, economicamente mais viáveis, fato que não é observado nos fármacos atualmente utilizados; e cuja via de administração seja melhorada a fim de provocar o menor desconforto possível aos pacientes, 15 torna-se bastante atrativo..Neste sentido, a utilização do fungo *Agaricus blazei*, na forma de seu extrato aquoso e/ou suas frações purificadas presentes em formulações farmacêuticas contendo tais produtos,propõe-se a minimizar e/ou solucionar tais problemas.

Quando se trabalha com o extrato aquoso, o objetivo é incorporá-lo à 20 uma formulação, para tal, o primeiro passo é colocá-lo em uma formulação compatível com seus constituintes, que mantenha sua estabilidade e auxilie sua ação farmacológica. Além disso, existem trabalhos na literatura relacionando a não-toxicidade do fungo quando utilizado em pacientes humanos pela via oral, não sendo constatado nenhum efeito colateral ou tóxico 25 nos indivíduos. Assim, a administração do extrato do fungo e de suas frações por via tópica (para LT) não pode ser considerada invasiva e, com certeza, será muito menos desconfortável ao paciente quando comparada às vias normalmente utilizadas para os antimoniais, no caso, a intramuscular e endovenosa. Além disso, formulações farmacêuticas na forma sólida e/ou 30 líquida também serão desenvolvidas para a administração oral no caso do tratamento da LV.

Além de todas estas vantagens, temos ainda o fato do fungo ser abundante em nossa flora e estar atualmente liberado pela ANVISA para comercialização na forma de nutracêutico.

### Breve Descrição da Figuras

5 **Figura 1:** Atividade leishmanicida do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* sobre formas promastigotas em fase estacionária de três espécies de *Leishmania*. Parasitas ( $4 \times 10^5$ ) foram incubados com concentrações variadas (25 a 200  $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato aquoso por 24 horas e a 25°C. A viabilidade dos parasitas foi determinada por ensaios usando o reagente MTT. As barras 10 representam a média e o desvio-padrão das 3 espécies.

15 **Figura 2:** Atividade leishmanicida do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* sobre formas *like*-amastigotas em fase estacionária de três diferentes espécies de *Leishmania*. Parasitas ( $4 \times 10^5$ ) foram incubados com concentrações variadas (25 a 200  $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato aquoso por 24 horas e a 25°C. Após, a viabilidade 20 dos parasitas foi determinada por ensaios usando o reagente MTT. As barras representam a média e o desvio-padrão das 3 espécies.

25 **Figura 3:** Inibição da infecção de macrófagos peritoneais por formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*. Os parasitas ( $4 \times 10^6$ ) foram tratados com 200  $\mu\text{g/mL}$  do extrato aquoso do fungo e incubados por 1 h a 25°C e, posteriormente, colocados para infectar 30 macrófagos (proporção de 10 *Leishmanias* para 1 macrófago) (B). Como controle, parasitas não-tratados foram infectados (A). Os dados são representativos de três experimentos com resultados similares.

30 **Figura 4:** Inibição da infecção de macrófagos peritoneais por formas *like*-amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*, após o tratamento dos parasitas com o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*. Os parasitas foram tratados com 200  $\mu\text{g/mL}$  do extrato do fungo e incubados com macrófagos peritoneais aderidos a lamínulas estéreis, na proporção de 10 *Leishmanias* para cada macrófago. Como controle, parasitas não-tratados foram utilizados na infecção das células macrofágicas. Os resultados são representativos de três experimentos com resultados similares..

**Figura 5:** Tratamento de macrófagos infectados. Macrófagos peritoneais foram infectados com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, *L. major* ou *L. chagasi*, na proporção de 10 parasitas para cada macrófago e tratados por 48 hs a 25°C com 200 µg/mL do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* (A). Como controle do experimento, células foram infectadas e não receberam tratamento (B).

**Figura 6:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% das frações do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*. As frações são indicadas como: **F1**: < 3.0 kDa; **F2**: entre 3.0 e 10.0 kDa; **F3**: entre 10 e 50 kDa; **F4**: entre 50 e 100 kDa e **F5**: acima de 100 kDa. As amostras foram diluídas em tampão de amostra em condições não-redutoras, homogeneizadas e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada por 4 h, a 80 Volts. O gel foi corado pela prata e fotografado. **PM** corresponde ao padrão de peso molecular (Pharmacia Biotech®).

**Figura 7:** Atividade leishmanicida das frações purificadas sobre formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*. O experimento foi realizado pelo protocolo de viabilidade celular empregando-se o reagente MTT e a concentração de 50 µg/mL do extrato aquoso do fungo e das frações purificadas foram utilizadas. Como controle, a anfotericina B na concentração de 50 µg/mL foi utilizada. As barras indicam a média e desvio-padrão dos grupos experimentais. O gráfico é representativo de três experimentos com resultados similares.

**Figura 8:** Atividade leishmanicida das frações F4 e F5 purificadas do fungo *A. blazei*. Macrófagos peritoneais foram infectados na proporção de 10 parasitas para 1 célula, por 4 h e a 25°C. Após, as culturas foram lavadas e mantidas por 24 h. Em seguida, as culturas de macrófagos infectados foram tratados por 48 h com as frações F4 ou F5. O experimento foi realizado em duplicata e 100 macrófagos por lâmina foram quantificados, sendo determinada a porcentagem de morte de parasitas no interior dos macrófagos.

**Figura 9:** Dosagem de óxido nítrico (NO) em macrófagos tratados com as frações F3, F4 e F5. Macrófagos peritoneais murinos ( $5 \times 10^5$ ) foram tratados com 50 µg/mL das frações F3, F4 ou F5 por 48 horas e 25°C. Em seguida, a

produção de NO foi determinada pela reação de Griess. Como controle, a concanavalina A (ConA) foi utilizada. As barras representam a média e o desvio-padrão de três experimentos com resultados similares.

**Figura 10:** Citotoxicidade das frações F4 e F5 purificadas do extrato aquoso do fungo *A. blazei* sobre macrófagos peritoneais murinos. Macrófagos foram tratados por 24 h e 25°C com as frações F4 e F5. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT.

**Figura 11:** Eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 10% das frações purificadas a partir da fração F5 por cromatografia de troca iônica. As amostras foram diluídas em tampão de amostra em condições não-redutoras, homogeneizadas e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 80 Volts, por 4 h. O gel foi corado pela prata e fotografado. PM corresponde ao padrão de peso molecular (Pharmacia Biotech®).

**Figura 12:** Atividade leishmanicida das frações purificadas a partir da fração F5 sobre formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*. O experimento foi realizado pelo protocolo de viabilidade celular empregando-se o reagente MTT e a concentração de 20 µg/mL das frações foi utilizada. Como controle, a anfotericina B foi utilizada na concentração de 50 µg/mL. As barras indicam a média e desvio-padrão dos grupos experimentais. O gráfico é representativo de três experimentos que apresentaram resultados similares.

**Figura 13:** Citotoxicidade das frações purificadas por troca iônica, a partir da fração F5, sobre macrófagos peritoneais murinos. Macrófagos foram tratados por 24 h e a 25°C com as novas frações purificadas (10 µg/mL). A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT.

**Figura 14:** Tamanho médio das lesões nas patas infectadas de camundongos BALB/c desafiados com *L. amazonensis* e tratados com o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*.

**Figura 15:** Tamanho médio das lesões nas patas infectadas de camundongos BALB/c desafiados com *L. amazonensis* e tratados com a fração F5 purificada do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*.

**Figura 16:** Carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e submetidos a diferentes tratamentos com o extrato aquoso de *Agaricus blazei*.

**Figura 17:** Carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L.*

5 *amazonensis* e submetidos a diferentes tratamentos com a fração F5 do extrato aquoso de *Agaricus blazei*.

### Descrição Detalhada da Tecnologia

A presente invenção caracteriza-se pelo uso do extrato aquoso de *Agaricus blazei* e de suas frações protéicas e não-protéicas derivadas, 10 combinados com excipientes farmaceuticamente aceitáveis no tratamento canino e humano das Leishmanioses Tegumentar e Visceral. Mais particularmente, a presente invenção descreve composições preferencialmente de uso tópico e oral, sob as formas farmacêuticas sólidas, semi-sólidas e líquidas selecionadas do grupo compreendendo gel, creme, pomada, pastas, 15 emulsões em geral e soluções, comprimidos e cápsulas.

Essas composições podem ser administradas pelas vias oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados; sendo preferencialmente administradas por via tópica.

20 A tecnologia aqui proposta poderá ser mais bem compreendida através dos seguintes exemplos, não-limitantes:

#### Exemplo 1 - Cultura dos Parasitas

As cepas IFLA/BR/1967/PH-8 de *L. amazonensis*, MHOM/BR/1970/BH46 de *L. chagasi* e MHOM/IL/1980/Friedlin de *L. major* 25 foram utilizadas. Os parasitas foram cultivados em meio de cultura de Schneider's completo, o qual é constituído pelo meio de Schneider's (Sigma) acrescido com 20% de soro fetal bovino (Sigma) inativado, 20 mM de L-glutamina, 50 µg/mL de gentamicina, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7.4. Os parasitas permaneceram em cultivo a 25°C, 30 sendo que repiques das culturas foram efetuados para a manutenção das

cepas e obtenção das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento.

**Exemplo 2 - Preparo do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei***

Para o preparo dos extratos nas formas aquosa do fungo *Agaricus blazei*, cerca de 1 grama do fungo é pesado e triturado em 1 mL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7.0. Após 1 h de incubação a 4°C, o extrato foi centrifugado a 9000 rpm (centrífuga SORVAL LC5C) por 1 h 30 minutos e o sobrenadante foi recuperado e sua concentração estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976)..

**10 Exemplo 2.1- Testes biológicos realizados com o extrato aquoso do fungo**

**Ensaio da atividade leishmanicida com o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei***

Foi testada a atividade leishmanicida do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* sobre formas promastigotas em fase estacionária e *like*-amastigotas de três diferentes espécies de *Leishmania*.

Em uma placa de cultura celular de 96 poços (Nunc, Nunclon®),  $4 \times 10^5$  formas promastigotas e *like*-amastigotas das espécies *Leishmania amazonensis*, *L. major* e *L. chagasi* foram incubadas com 25 a 200 µg/mL do extrato aquoso do fungo, em meio RPMI-PR para um volume final de 100 µL, durante 24 h e a 25°C. Então, 50 µL do reagente MTT (*Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide* 98%; na concentração estoque de 5 mg/mL) foi adicionado e a placa foi incubada por 4 horas e a 25°C. As células foram analisadas em um microscópio para a verificação da formação de cristais de formazan. Logo após, 60 µL de uma solução SDS 10%/HCL 0.1 M foram adicionados para a solubilização dos cristais de formazan e a placa foi incubada por 18 h. As leituras das absorbâncias foram então realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nanômetros (nm) (ver figura 1e 2; Tabela 1 e 2).

Por meio das leituras das absorbâncias coletadas nos experimentos, as Tabela 1 e 2 foram geradas para representar os percentuais da atividade leishmanicida do extrato aquoso contra as três espécies de *Leishmania* nas

duas formas testadas. O cálculo da porcentagem de morte dos parasitas foi baseado na fórmula abaixo, utilizando as leituras das absorbâncias:

$$\text{Taxa de morte} = \frac{(\text{D.O.}_{570\text{nm}} \text{ controle} - \text{D.O.}_{570\text{nm}} \text{ amostra}) \times 100}{\text{D.O.}_{570\text{nm}} \text{ controle}}$$

5

**Tabela 1:** Média da porcentagem de morte de parasitas utilizando o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* em diferentes concentrações sobre as formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*. Os dados são representativos de três experimentos com resultados similares.

Concentração (ug/mL)	% Morte <i>L. amazonensis</i>	% Morte <i>L. major</i>	% Morte <i>L. chagasi</i>
25	23,7	23,24	33,24
50	25,67	37,2	37
100	31,86	40,41	40,41
200	41,76	51,46	51,46

10

**Tabela 2:** Média da porcentagem de morte dos parasitas utilizando o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* em diferentes concentrações sobre as formas *like-amastigotas* de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*. Os dados são representativos de três experimentos com resultados similares.

Concentração (ug/mL)	% Morte <i>L. amazonensis</i>	% Morte <i>L. major</i>	% Morte <i>L. chagasi</i>
25	26,44	43,2	39,28
50	28,95	48,4	41
100	35	51,6	44
200	45	55,6	51,57

15

As concentrações efetivas para inviabilizar 50% de *Leishmanias* (CE<sub>50</sub>) foram determinadas com base nos resultados de atividade leishmanicida sobre

as formas promastigotas e *like*-amastigotas de *Leishmania* e são mostrados na tabela 3.

**Tabela 3:** Concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) do extrato aquoso de *A. blazei* sobre formas promastigotas e *like*-amastigotas de *Leishmania* sp.

Parasitas	Concentração efetiva ( $CE_{50}$ )
Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	136
<i>Like</i> -amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	124
Promastigotas de <i>L. chagasi</i>	105
<i>Like</i> -amastigotas de <i>L. chagasi</i>	99
Promastigotas de <i>L. major</i>	138
<i>Like</i> -amastigotas de <i>L. major</i>	89

5 **Eficácia do extrato do fungo em inibir a entrada de parasitas em macrófagos de mamíferos**

Para a verificação da eficácia do extrato do fungo em inibir a entrada de parasitas em macrófagos de mamíferos, formas promastigotas e *like*-amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* foram tratadas com o extrato aquoso do fungo e posteriormente incubadas com macrófagos peritoneais oriundos de camundongos BALB/c, na proporção de 10:1. Os parasitas ( $4 \times 10^6$ ) foram tratados com 200 µg/mL do extrato aquoso do fungo e incubados por 1 h a 25°C e, posteriormente, colocados para infectar macrófagos (proporção de 10 *Leishmanias* para 1 macrófago) (B). Como controle, parasitas não-tratados foram infectados (A). Os dados são representativos de três experimentos com resultados similares.

Foi feita a quantificação dos macrófagos infectados e determinado o número de parasitas por macrófago infectado, com uso de um microscópio composto. Os resultados são mostrados nas figuras 3 (promastigotas) e 4 (*like*-amastigotas).

Após, a porcentagem do número de macrófagos infectados por formas promastigotas e *like*-amastigotas e a relação entre o número de parasitas por

macrófago infectado foram determinados. Os dados são mostrados nas tabelas 4 e 5.

**Tabela 4:** Porcentagem do número de macrófagos infectados com formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* e a relação entre o número de parasitas por macrófago infectado após o tratamento com o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*.

	% Φ infectados	Nº parasitas/Φ
<i>L. amazonensis</i>	84	12
<i>L. amazonensis</i> + 200ug/mL Ab	42	5
<i>L. chagasi</i>	77	9,2
<i>L. chagasi</i> + 200ug Ab	62	4
<i>L. major</i>	64	5,4
<i>L. major</i> + 200ug de Ab	31	2,8

**Tabela 5:** Porcentagem do número de macrófagos infectados com formas *like-*amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* e a relação entre o número de parasitas por macrófago infectado após o tratamento com o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*.

	% Φ infectados	Nº parasitas/Φ
<i>L. amazonensis</i>	60	3,7
<i>L. amazonensis</i> + 200ug/mL Ab	35,8	1,9
<i>L. chagasi</i>	62	6
<i>L. chagasi</i> + 200ug Ab	37	3,3
<i>L. major</i>	65,6	6
<i>L. major</i> + 200ug de Ab	31	3,6

### Efeito do extrato em macrófagos infectados

Macrófagos peritoneais foram infectados com *Leishmania* e, posteriormente, tratados com o extrato aquoso do fungo para verificar a redução da infecção nas células parasitadas.

5 Macrófagos peritoneais, obtidos de camundongos BALB/c, foram infectados com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, *L. major* ou *L. chagasi*, na proporção de 10 parasitas para cada macrófago e tratados por 48 h e a 25°C com 200 µg/mL do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* (A). Como controle, células foram infectadas e  
10 não receberam o tratamento (B). Os resultados são mostrados na figura 5.

### Exemplo 2.1 - Obtenção de frações protéicas a partir do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*.

Para a preparação e extração das frações protéicas a partir do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei*, aproximadamente 28 gramas do cogumelo  
15 (sendo usado o corpo de frutificação), fresco e limpo, foram adicionados em 50 mL de água milli-Q acrescido com 50 µL de coquetel de inibidor de protease (SIGMA, código P8340). O material foimacerado em banho de gelo, com auxílio de um graal e pistilo. Posteriormente, o conteúdo permaneceu em repouso a 4°C por 1 h e foi filtrado em papel filtro para a retirada do material não-  
20 solubilizado.

O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado em uma coluna com Amicon de 100.000 Dáltons (Da) na velocidade de 6.000 rpm por 45 minutos e a 4°C. Após, o material retido no filtro foi retirado e o restante do mesmo foi transferido para um novo Amicon de 50.000 Da e centrifugado a 6.000 rpm por 30 minutos e a 4°C. O material retido foi recolhido e o restante foi passado para um novo tubo Amicon de 10.000 Da. As amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o material retido foi retirado, sendo o restante aplicado em Amicon de 3.000 Da. O mesmo procedimento de centrifugação foi repetido e o material retido na membrana para 3.000 Da foi retirado, sendo o restante do material liofilizado.  
30

Em seguida, as amostras foram quantificadas pelo método de Lowry e utilizadas nos próximos ensaios biológicos (Tabela 6).

**Tabela 6:** Obtenção das frações protéicas do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* por coluna de Amicon. As frações protéicas foram separadas por 5 gradiente de centrifugação e quantificadas pelo método de Lowry.

	Massa molecular (Dáltons)	Concentração final (mg/mL)
<b>F1</b>	Menor que 3.000	0.8
<b>F2</b>	Entre 3.000 e 10.000	2.3
<b>F3</b>	Entre 10.000 e 50.000	6.57
<b>F4</b>	Entre 50.000 e 100.000	2.5
<b>F5</b>	Acima de 100.000	44.0

#### **Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% das frações purificadas do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei***

Após a purificação em colunas de Amicon, as novas frações foram submetidas a uma eletroforese em gel SDS-PAGE a 10% para verificação de 10 seu perfil protéico, conforme demonstrado na figura 6, na qual 2 géis são mostrados.

#### **Exemplo 2.2- Atividade leishmanicida das novas frações purificadas sobre formas promastigotas em fase estacionária de crescimento**

As frações foram testadas quanto a sua atividade leishmanicida sobre 15 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* e os resultados estão representados na figura 7.

O experimento foi realizado pelo protocolo de viabilidade celular empregando-se o reagente MTT e a concentração de 50 µg/mL do extrato

aquoso do fungo e das frações purificadas foram utilizadas. Como controle, a anfotericina B na concentração de 50 µg/mL foi utilizada (figura 7).

Utilizando as leituras das absorbâncias coletadas no experimento anterior, uma tabela foi gerada para representar os percentuais da atividade leishmanicida do extrato aquoso do fungo e de suas frações protéicas purificadas sobre as formas promastigotas em fase estacionária de crescimento das três espécies de *Leishmania*. Os dados estão representados na tabela 7.

**Tabela 7:** Porcentagem de morte das formas promastigotas em fase estacionária de *Leishmania amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* utilizando o extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei* e suas frações purificadas. Anfotericina B foi usada como controle do experimento. Os resultados indicam a média ± desvio padrão dos grupos experimentais. Os dados mostrados são representativos de três experimentos com resultados similares.

	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. major</i>	<i>L. chagasi</i>
<b>Extrato aquoso</b>	20,08 ± 4,27	25,46 ± 3,20	18,98 ± 1,27
<b>F1</b>	28,41 ± 1,65	19,78 ± 2,20	27,35 ± 3,96
<b>F2</b>	19,66 ± 2,54	14,63 ± 0,86	8,37 ± 0,74
<b>F3</b>	32,27 ± 1,37	19,60 ± 3,00	12,36 ± 0,94
<b>F4</b>	69,41 ± 0,20	50,51 ± 1,83	75,60 ± 1,19
<b>F5</b>	53,9 ± 0,68	27,76 ± 3,34	49,32 ± 1,58
<b>Anfotericina B</b>	40,06 ± 1,17	42,51 ± 2,00	35,12 ± 2,61

#### Testes biológicos com as frações F4 e F5

Constatando-se que as frações F4 e F5 apresentaram os melhores resultados de morte sobre as diferentes espécies de *Leishmanias*, as mesmas foram selecionadas para a continuidade dos experimentos. Suas concentrações efetivas para inviabilizar 50% dos parasitas foram calculadas e são mostrados na tabela 8.

**Tabela 8:** Concentração efetiva ( $EC_{50}$ ) das frações F4 e F5 do extrato aquoso do fungo *A. blazei* sobre formas promastigotas de *Leishmania spp*

Promastigotas	$EC_{50}$ F4 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$EC_{50}$ F5 ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>L. amazonensis</i>	23,5 ( $\pm 1,5$ )	36,5 ( $\pm 3,3$ )
<i>L. chagasi</i>	25,1 ( $\pm 2,0$ )	38,7 ( $\pm 2,8$ )
<i>L. major</i>	35,8 ( $\pm 1,3$ )	64,7 ( $\pm 2,7$ )

Macrófagos peritoneais foram infectados com parasitas, na proporção de 10 parasitas para cada célula, e, posteriormente, tratados com as frações F4 e 5 F5. Os resultados são mostrados na figura 8. Com o intuito de investigar se o mecanismo de atividade leishmanicida dos macrófagos após a estimulação com as frações purificadas ocorria pela produção de óxido nítrico (NO), macrófagos infectados ou não foram estimulados com as frações F3, F4 e F5 e a produção de NO foi determinada pela reação de Griess. Os resultados são 10 mostrados na figura 9.

Ainda, a citotoxicidade das frações F4 e F5 em células de mamíferos foi analisada e os resultados são mostrados na figura 10. Para tal, macrófagos foram extraídos de camundongos BALB/c e tratados por 24 h a 25°C com as frações F4 e F5. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT.

15 **Exemplo 3 - Purificação da fração F5 obtida a partir do extrato aquoso do fungo *Agaricus blazei***

Após a definição da utilização das frações F4 e F5 para os experimentos citados acima, uma vez que as mesmas haviam apresentado os melhores índices de atividade leishmanicida e não apresentavam citotoxicidade 20 significante para macrófagos de mamíferos, resolvemos eleger a fração F5 para a continuidade dos experimentos pelo fato da mesma se apresentar um rendimento final maior após as purificações.

Desta forma, a purificação em sistema de FPLC da fração F5 foi realizada e novas frações mais puras foram obtidas. Para isso, um pool da 25 fração F5 foi eluído utilizando-se uma coluna MonoQ HR 5/5 de troca iônica

como fase fixa e solução de NaCl como fase móvel. As amostras foram submetidas ao tratamento contra um gradiente de concentração NaCl (0 a 1M), coletadas,dializadas e liofilizadas.

As mesmas foram quantificadas e submetidas a uma eletroforese de 5 proteínas em sistema SDS-PAGE a 10% (figura 11).

As novas frações obtidas a partir da F5 foram testadas quanto a sua atividade leishmanicida sobre formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* e os resultados estão representados na figura 12. Como controle, o fármaco anfotericina B foi utilizado na concentração de 50 µg/mL. O 10 experimento foi realizado pelo protocolo de viabilidade celular empregando-se o reagente MTT e a concentração de 20 µg/mL das frações foi utilizada.

Pode-se verificar uma elevada atividade leishmanicida em algumas das novas frações purificadas por troca iônica, tais como as frações F2, F3, F18, 15 F19 e F27. Tais frações, mesmo em uma concentração menor que a fração F5 anterior, mostraram maior atividade que a mesma. As frações purificadas por troca iônica foram também testadas quanto a toxicidade (Figura 13) e não apresentaram citotoxicidade significativa.

**Exemplo 4- Tratamento *in vivo* de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* e tratados com extrato aquoso e a fração F5 de 20 *Agaricus blazei***

O tratamento de camundongos infectados com *L. amazonensis* foi realizado utilizando para tal o extrato aquoso de *A. blazei* e a fração denominada F5.

Foram testados também 2 tipos de tratamentos: um tratamento 25 profilático (chamado de quimioprofilaxia) e o tratamento convencional. Como os ensaios *in vitro* demonstraram que o extrato aquoso conseguiu diminuir a penetração dos parasitas em macrófagos, um modelo experimental de quimioprofilaxia foi confeccionado para avaliarmos se seria possível, com um pré-tratamento com o extrato aquoso de *A. blazei* ou com a fração F5, reduzir 30 a infecção e impedir ou inibir o desenvolvimento da doença nos camundongos BALB/c.

Para o modelo de quimioprofilaxia, animais foram previamente tratados por 5 dias com o extrato aquoso ou a fração F5 e infectados com  $5 \times 10^5$  formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*, no coxim plantar direito. Após a infecção, os animais foram tratados por mais 20 dias, com dose 5 única de 2 mg por dia, do extrato aquoso ou da fração F5, via oral por meio de gavagem.

Para os modelos de tratamento convencional, os animais foram infectados com  $5 \times 10^5$  formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* no coxim plantar direito e, em seguida, foram tratados por 20 10 dias, com dose única de 2 mg por dia, do extrato aquoso ou da fração F5, via oral por meio de gavagem.

Como controle, foi usado o tratamento pelo mesmo período (20 dias) com 1 mg/Kg/dia do fármaco anfotericina B (deoxicolato) e, como controle da infecção, alguns animais foram infectados e receberam salina por 20 dias.

15 Após a infecção, medições semanais das patas dos animais infectados foram realizadas com o intuito de monitorar a evolução da doença (figura 13). O sacrifício dos animais foi realizado na 10<sup>a</sup> semana após a infecção, sendo que alguns órgãos tais como baço, lesão e linfonodo poplíteo, foram coletados e processados para as análises parasitológicas e imunológicas.

20 Na análise da figura 14, pode-se observar uma redução significativa no inchaço nas patas dos animais de ambos os tratamentos propostos (quimioprofilaxia e tratamento convencional) com o extrato aquoso do fungo, quando comparados com o inchaço das patas dos animais infectados e que receberam salina. Observa-se também que a redução do inchaço nas patas 25 dos animais tratados chegou a ser, em algumas medições, menor que a dos animais tratados com anfotericina B.

30 Pode-se observar na análise da figura 15 uma redução significativa no inchaço nas patas dos animais submetidos ao tratamento com a fração F5 quando comparados com o inchaço das patas dos animais que receberam salina (controle da infecção). Tal redução chegou a apresentar valores similares ao observado nas patas infectadas nos animais tratados com anfotericina B. O modelo de quimioprofilaxia não demonstrou redução visível

no inchaço das patas dos animais infectados, quando comparado ao controle de infecção. Entretanto, deve-se destacar que os animais que foram submetidos à quimioprofilaxia não apresentaram toxicidade orgânica, fato que foi verificado nos animais infectados e que foram tratados com anfotericina B, 5 especialmente, aumento significativo nestes animais de enzimas de inflamação hepática.

Na 10<sup>a</sup> semana de infecção, os animais foram sacrificados para as análises de quantificação de parasitas, conforme mostrado nas figuras 16 e 17.

Conforme pode ser observado na figura 15, o tratamento convencional e 10 a quimioprofilaxia com o extrato aquoso foram capazes de reduzir de maneira significativa o número de parasitas nos órgãos avaliados (baço, linfonodo poplíteo e pata infectada) dos animais infectados; sendo que tais reduções foram maiores em relação aos valores encontrados nos animais tratados com a anfotericina B.

15 Apesar do modelo de quimioprofilaxia ter apresentado bons resultados quando comparado com o controle de infecção (animais tratados com salina), os melhores resultados foram obtidos com o tratamento convencional, sendo que, neste caso, não foram detectados parasitas no baço destes animais e apenas um pequeno número de parasitas nos linfonodos drenantes e nas patas 20 infectadas, demonstrando a expressiva proteção oferecida pelo tratamento com o extrato aquoso de *A. blazei*.

Apesar do inchaço das patas dos animais infectados e submetidos à quimioprofilaxia com a fração F5 não ter apresentado valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle, observou-se uma redução significativa 25 no número de parasitas nos animais submetidos à quimioprofilaxia quando comparados ao controle de infecção (figura 16). Observou-se também uma redução significante no número de parasitas nos animais infectados e tratados com a fração F5, sendo que também não foi possível detectar parasitas no baço desses animais. Dessa forma, tanto a quimioprofilaxia quanto o 30 tratamento convencional com a fração F5 mostraram reduções significativas no número de parasitas nos diferentes órgãos avaliados, sendo que tais reduções

foram maiores até em relação aos valores observados nos animais tratados com a anfotericina B.

Desta forma e de maneira conclusiva, demonstramos que o extrato aquoso do fungo *A. blazei* e a fração denominada F5 apresentaram importante 5 atividade leishmanicida *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.

Cabe ressaltar que tais estudos foram realizados por duas vezes e os resultados foram similares. Atualmente, experimentos em camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi* estão em andamento utilizando o extrato aquoso e a fração F5 e os resultados mostram-se promissores, tanto na 10 quimioprofilaxia quanto no tratamento convencional dos animais infectados.

## REIVINDICAÇÕES

1. **FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA**, caracterizada por compreender o extrato aquoso do cogumelo *Agaricus blazei* e/ou suas frações purificadas 5 denomiandas F4 e F5, com correspondentes protéicos de 50 a 80 kDa, assim como componentes não-protéciso presentes em tais produtos, como taninos, saponinas e polissacarídeos, além de ao menos um excipiente farmacologicamente aceitável em formas farmacêuticas líquidas, semi-líquidas ou sólidas.
- 10 2. **FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser veiculada preferencialmente em formas farmacêuticas selecionadas do grupo compreendendo gel, creme, pomada, pastas, emulsões em geral, soluções, comprimidos e cápsulas.
- 15 3. **FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada por ser administrada pelas vias oral e/ou tópica.
4. **USO DA FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA**, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado por ser para preparação de medicamentos para prevenir a infecção ou tratar mamíferos infectados com *Leishmania*.
- 20 5. **USO DA FORMULAÇÃO LEISHMANICIDA**, de acordo com as reivindicações 1 a 4 caracterizado por ser aplicado na prevenção ou no tratamento clínico de cães e do homem contra as Leishmanioses.

## Figuras

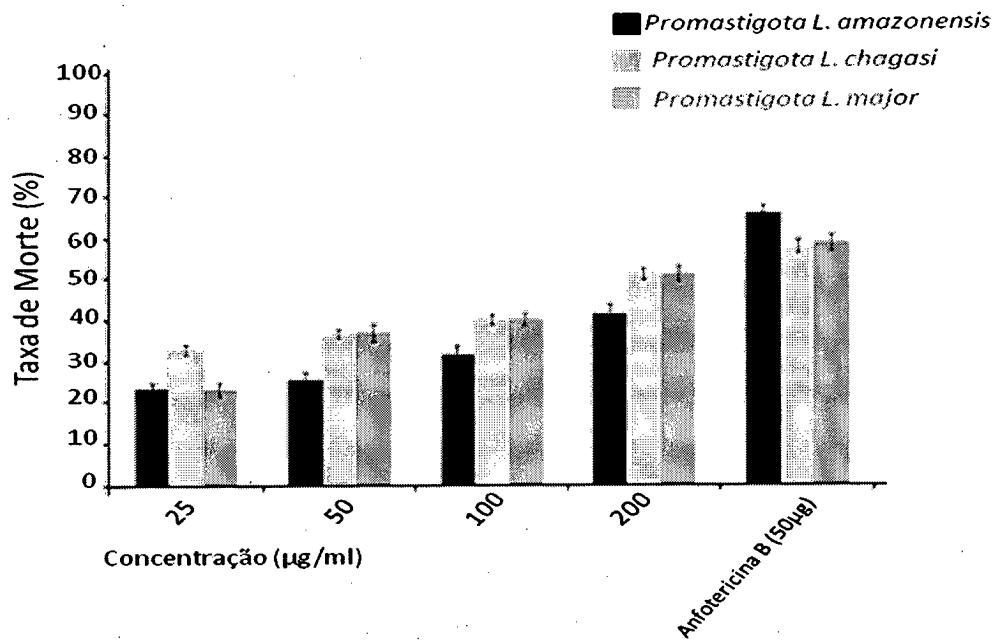


Figura 1

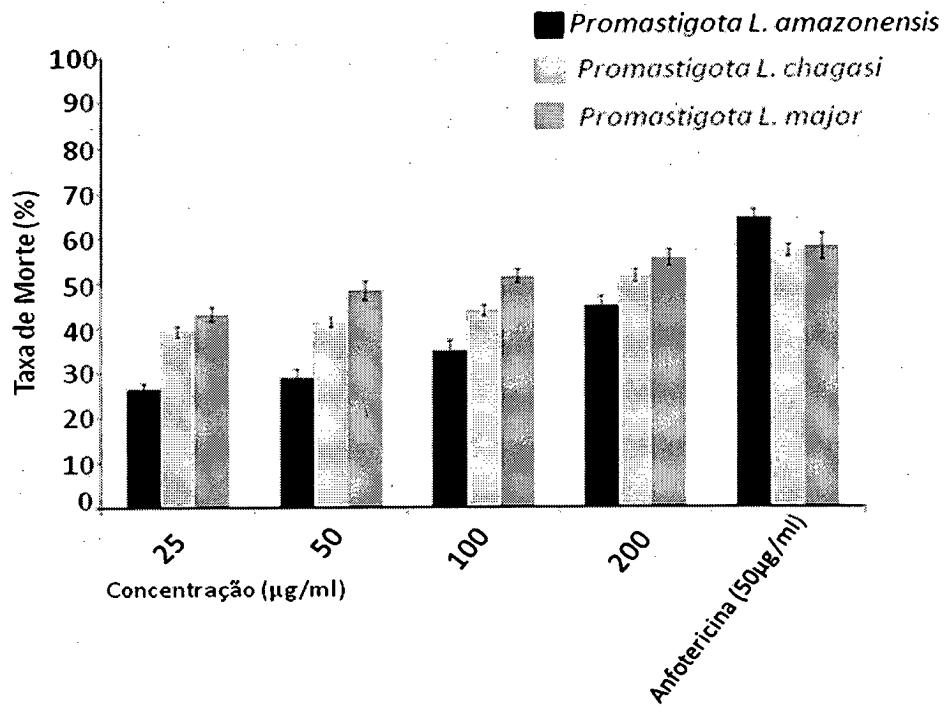


Figura 2

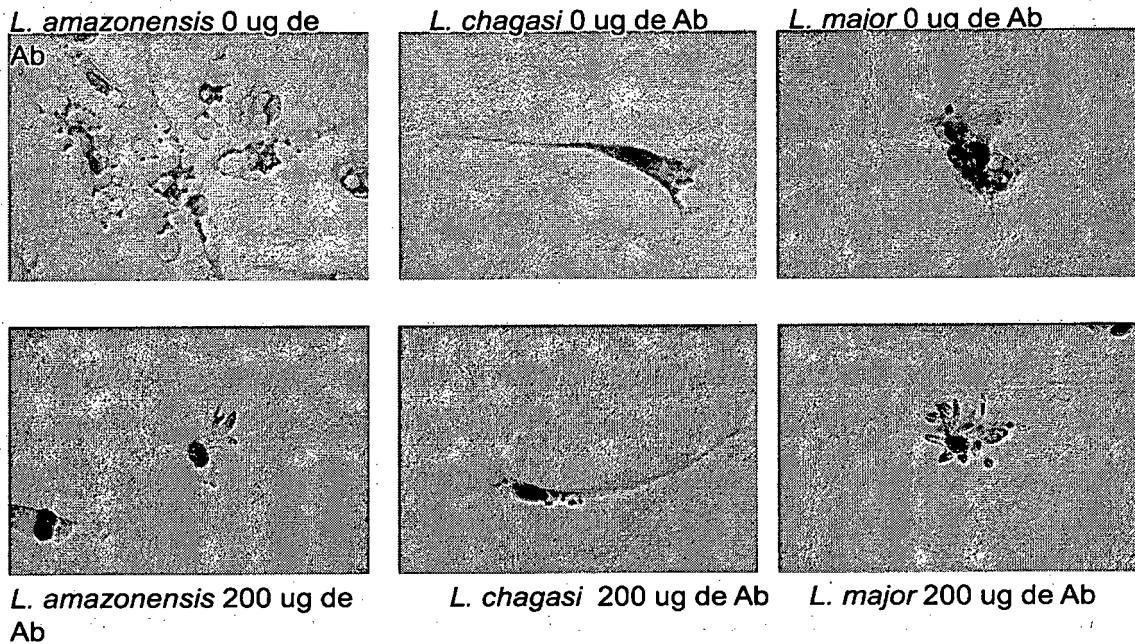


Figura 3

5

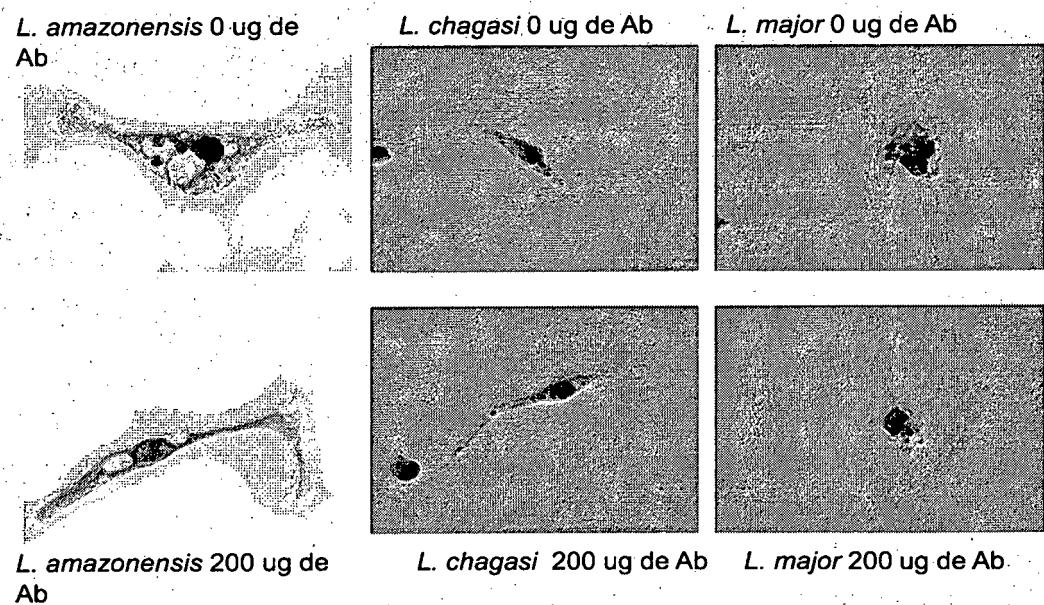


Figura 4

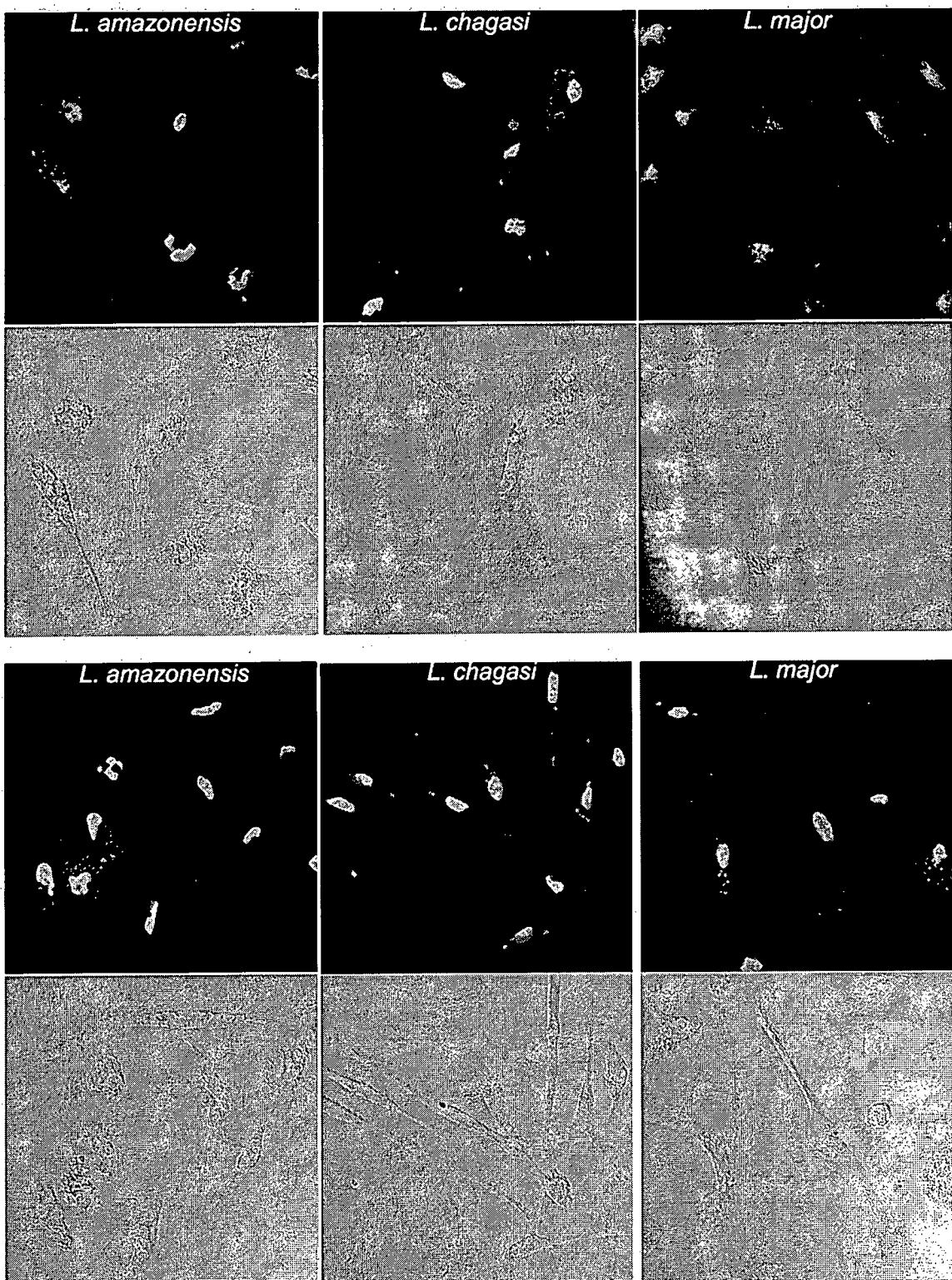
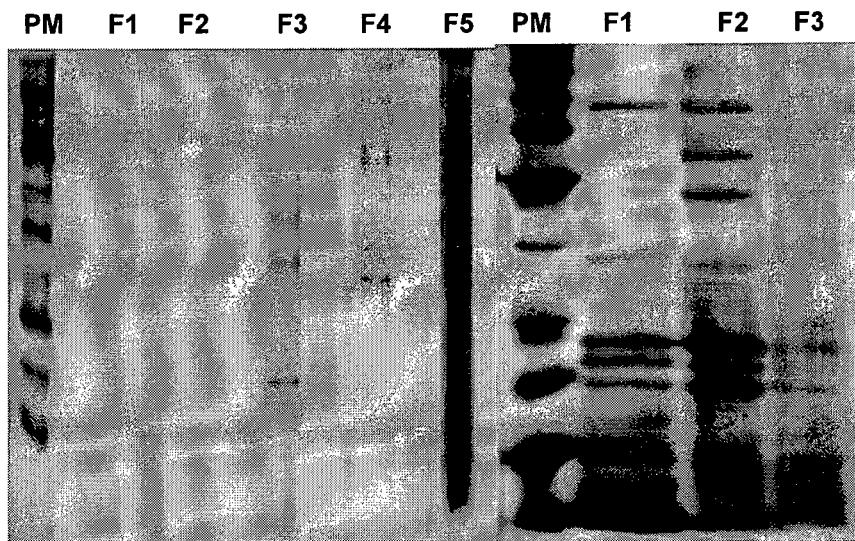


Figura 5



5

Figura 6

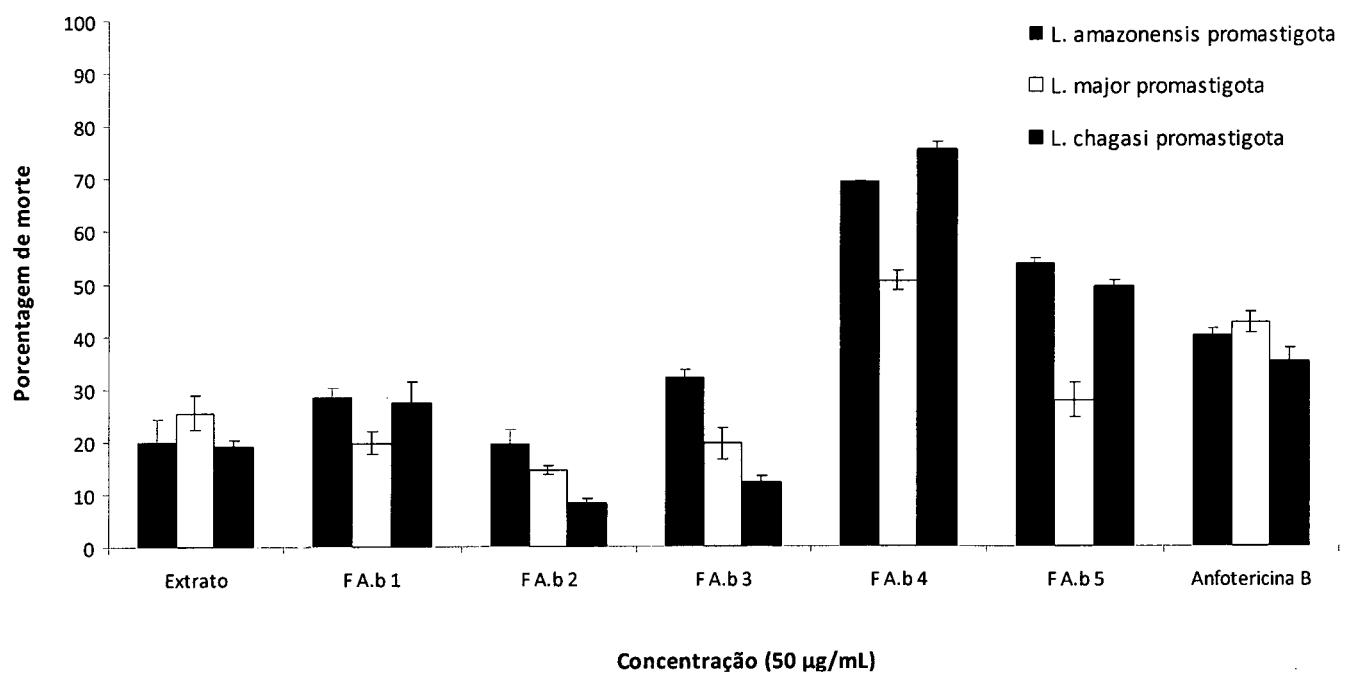


Figura 7

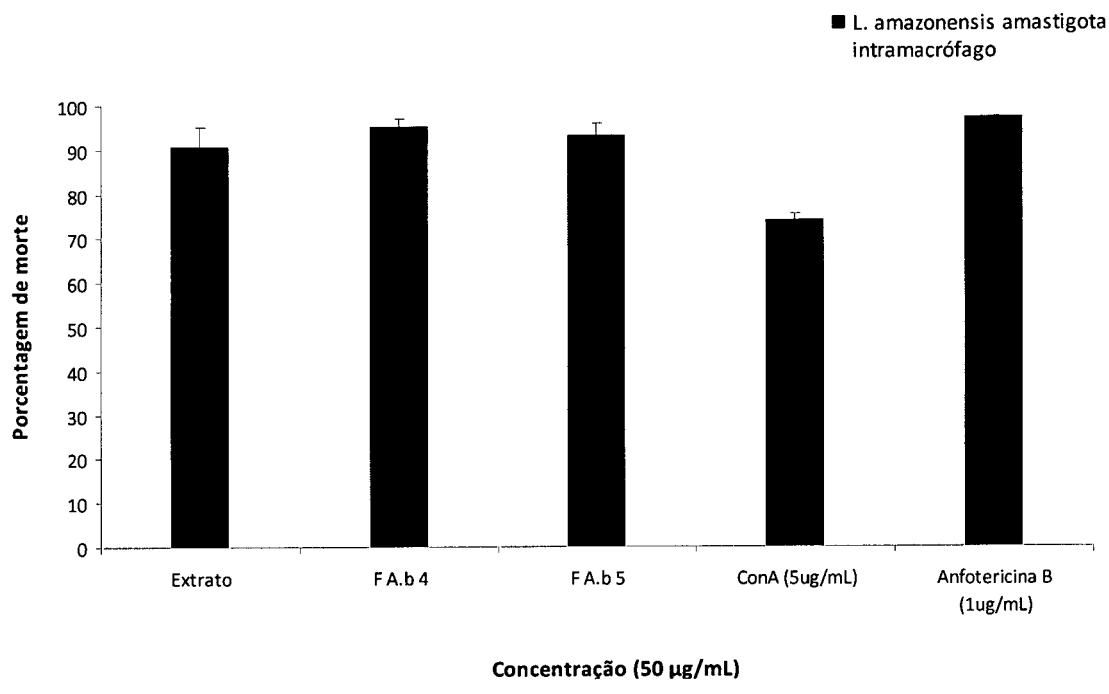


Figura 8

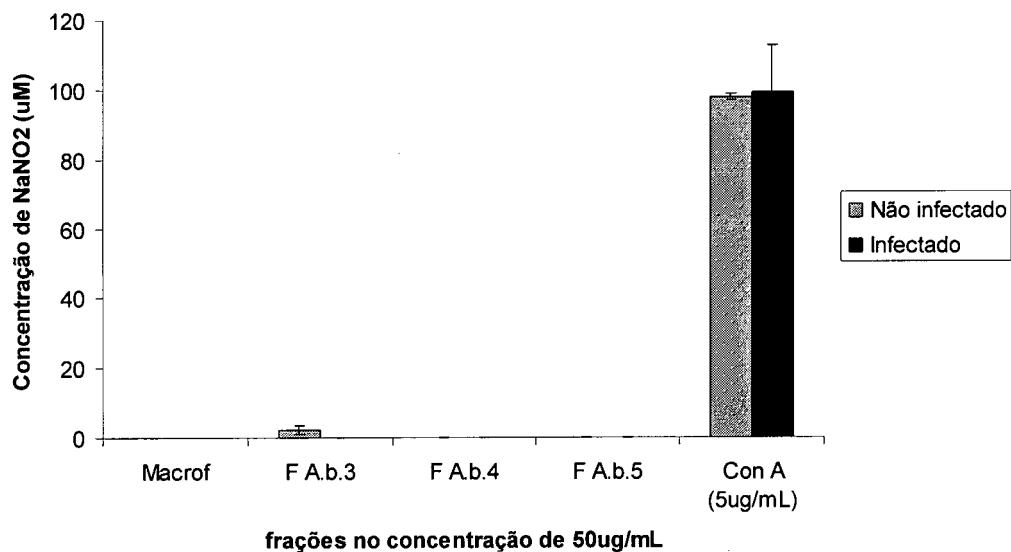


Figura 9

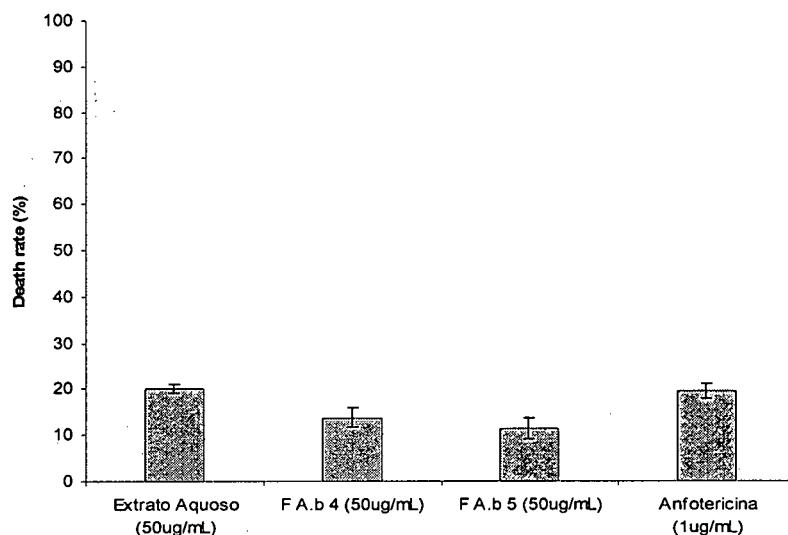


Figura 10

5

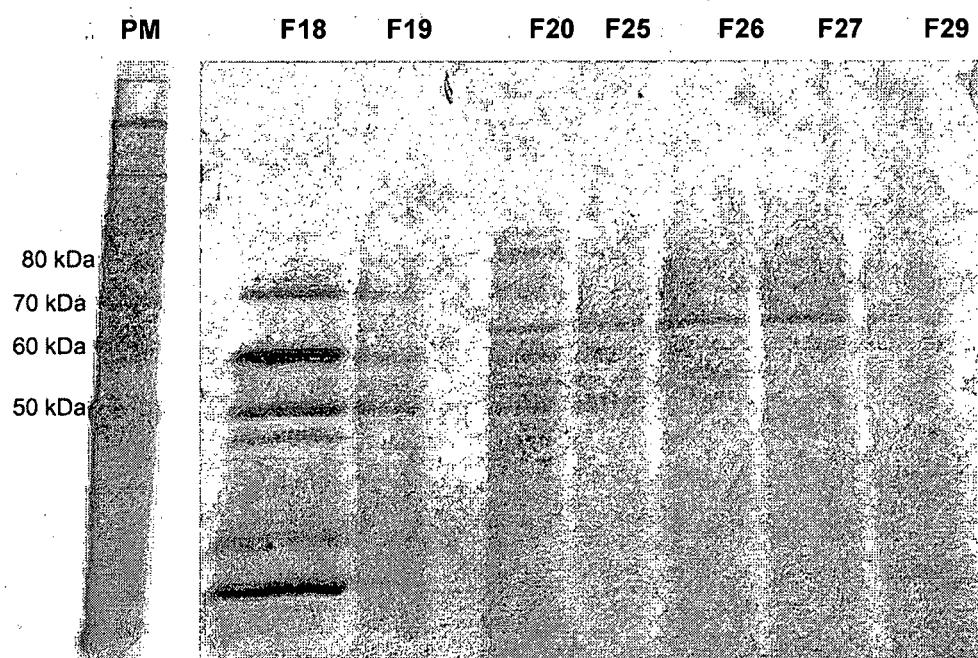


Figura 11

10

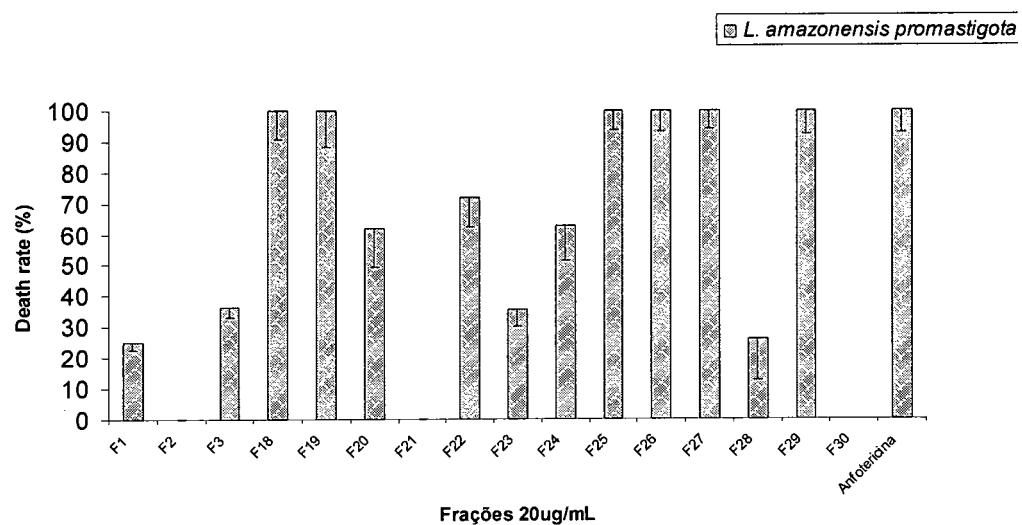


Figura 12

5

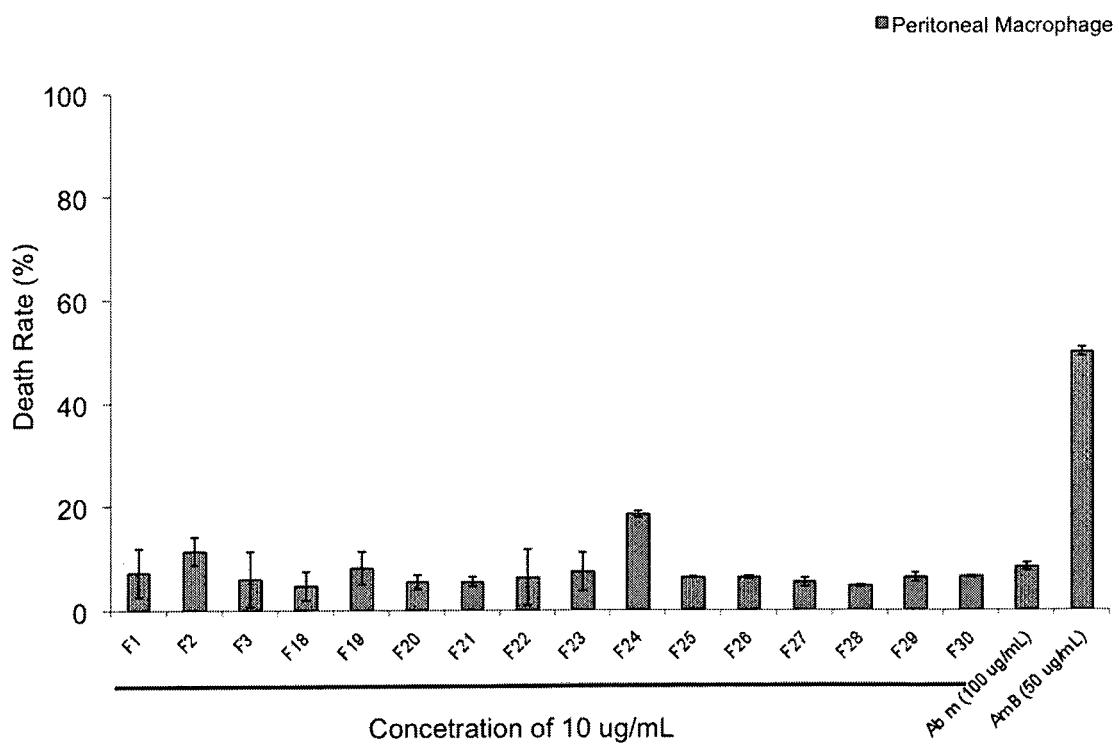


Figura 13

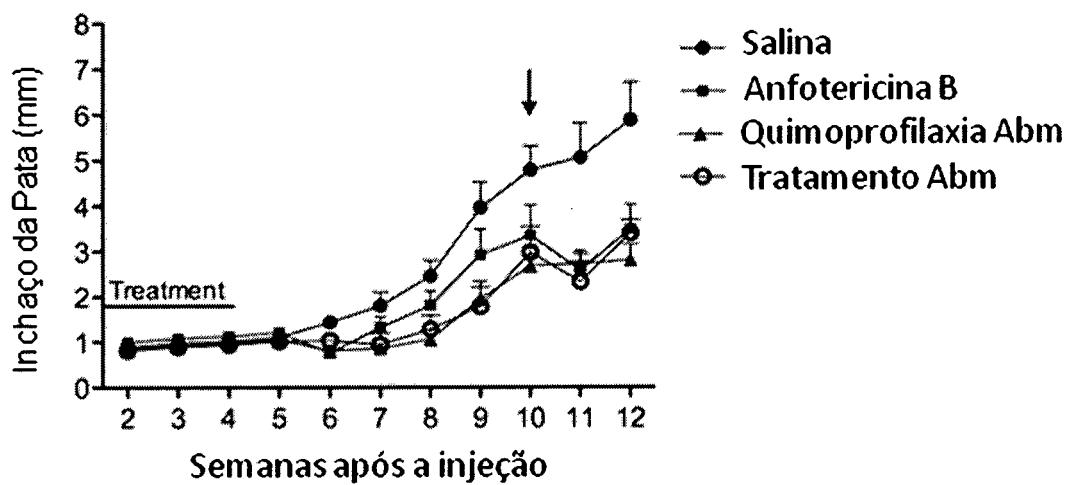


Figura 14

5

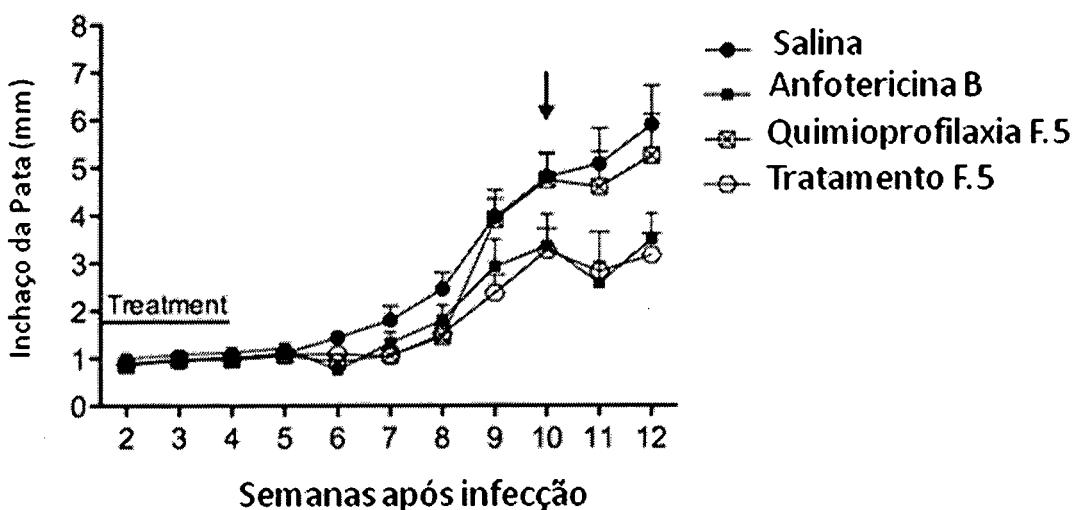


Figura 15

10

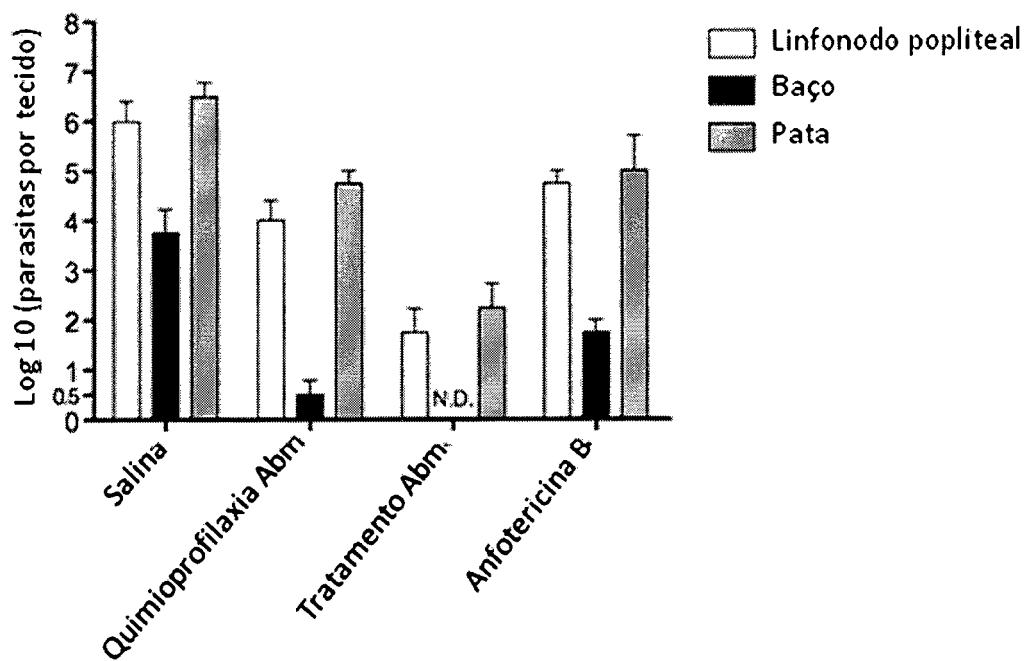


Figura 16

5

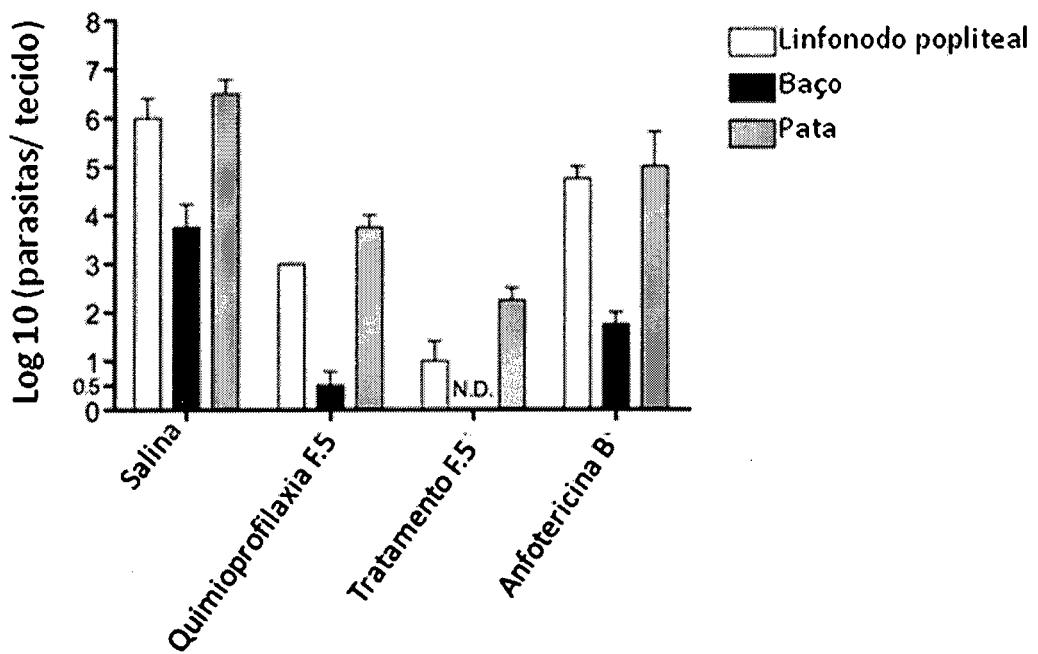


Figura 17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2011/000147

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**A61K36/07 (2006.01), A61P33/02 (2006.01)**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**A61K, A61P**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**EPODOC, MEDLINE, WPI DATA, BIOSIS Previews, Chemical Abstracts, PASCAL Database**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 9920258 A1 ( CRAVER WILLIAM E III [US]) 29 April 1999 (1999-04-29) See the whole document	1 a 4
Y	WO 2005065063 A2 (HETLAND GEIR [NO]) 21 July 2005 (2005-07-21) See the whole document	1 a 4
Y	WO 2008039169 A2 ( HIROMOTO BRYAN [US]) 03 April 2008 (2008-04-03) See the whole document	1 a 4
A	JP 1228480 A (NIPPON HYPOX LAB INC) 12 September 1989 (1989-09-12)	

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&amp;” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**11 July 2011**

Date of mailing of the international search report

**26 September 2011**

Name and mailing address of the ISA/

INSTITUTO NACIONAL DA  
PROPRIEDADE INDUSTRIALFacsimile No. Rua Mayrink Veiga nº 9, 18º andar  
cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Authorized officer

**Wellington Inácio de Almeida**

+55 21 3039-3493/3742

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2011/000147

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No. .
A	JP 11263732 A (ICHIMARU PHARCOS INC) 28 September 1999 (1999-09-28)	
A	JP 11279204 A (SUMITOMO FORESTRY) 12 october 1999 (1999-10-12)	
A	JP 2000032946 A (PAWAFURU KENKO SHOKUHIN KK) 02 February 2000 (2000-02-02)	
Y	ROSA, L.H. et al. 'Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and leishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil'. <i>Antonie van Leeuwenhoek</i> , 2009, vol. 95, página 227-237.  See the whole document	1 a 4
A	ROSA, L.H. & CAPELARI, M. 'Agaricales fungi from Atlantic rain forest fragments in Minas Gerais, Brazil' <i>Brazilian J. Microbiol.</i> 2009, vol. 40, <b>pages</b> 846-851.	
A	SILVA, F.S. et al. 'In vitro pharmacological screening of macrofungi extracts from the Brazilian northeastern region' <i>Pharmaceutical Biology</i> 2009, vol. 47, 5, <b>pages</b> 384-389	
A	BADALYAN, S.M. 'Antiprotozoal activity and mitogenic effect of mycelium of culinary-medicinal shiitake mushroom <i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Singer (Agaricomycetidae)'. <i>International Journal of Medicinal Mushroom</i> 2004, vol. 6, <b>pages</b> 131-138.	
A	INCHAUSTI, A. et al. 'Leishmanicidal and trypanocidal activity of extracts and secondary metabolites from Basidiomycetes'. <i>Phytotherapy Research</i> , 1997, vol. 11, <b>pages</b> 193-197	
A	YUEXIN, L. et al. 'Fractionation and characterization of water-soluble polysaccharides from culinary-medicinal mushroom, <i>Agaricus blazei</i> Murrill (Agaricomycetidae)'. <i>International Journal of Medicinal Mushrooms</i> , 2002, vol. 4, <b>pages</b> 313-319.	
P, X	VALADARES, D.G. et al. 'Leishmanicidal activity of the Agaricus blazei Murill in different Leishmania species' <i>Parasitology International</i> (in press). Available online 24 June 2011 doi:10.1016/j.parint.2011.06.001  See the whole document	1 a 4
P, X	VALADARES, DG. et al.'Leishmanicidal activity of <i>Agaricus blazei</i> fungus against different leishmania species'. Resumo PI026.. Imuno 2010 - XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology. Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brazil. 03 a 06 de novembro de 2010  See the whole document	1 a 4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2011/000147

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **5**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy: PCT Article 17(2)(a)(i), PCT Rules 39.1(iv), 67.1(iv). However, since said method involves the administration to a human or animal patient, of a formulation obtained from an extract, the latter was used as the basis for the search of prior art documents.**
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2011/000147

WO 9920258 A1	1999-04-29	AU 1105199 A CA 2308588 A1 EP 1024796 A1 US 5906825 A	1999-05-10 1999-04-29 2000-08-09 1999-05-25
WO 2005065063 A2	2005-07-21	CN 1953759 A EP 1708673 A2 JP 2007517867 A NO 20044581 D0 RU 2006129301 A US 2008233144 A1 WO 2005065063 A3	2007-04-25 2006-10-11 2007-07-05 2004-10-25 2008-02-20 2008-09-25 2005-11-17
WO 2008039169 A2	2008-04-03	CA 2618096 A1 CN 101389764 A EP 1931360 A2 JP 2009513579 A RU 2008108023 A US 2011136758 A1 WO 2008039169 A3 ZA 200801558 A	2007-02-01 2009-03-18 2008-06-18 2009-04-02 2009-09-10 2011-06-09 2008-11-13 2009-10-28
JP 1228480 A	1989-09-12	EP 0413053 A1	1991-02-20
JP 11263732 A	1999-09-28	<b>NONE</b>	
JP 11279204 A	1999-10-12	<b>NONE</b>	
JP 2000032946 A	2000-02-02	<b>NONE</b>	

## RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2011/000147

## A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

**A61K36/07 (2006.01), A61P33/02 (2006.01)**

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

## B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

**A61K, A61P**

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

**EPODOC, MEDLINE, WPI DATA, BIOSIS Previews, Chemical Abstracts, PASCAL Database**

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
Y	WO 9920258 A1 ( CRAVER WILLIAM E III [US]) 29 abril 1999 (1999-04-29) ver todo documento	1 a 4
Y	WO 2005065063 A2 (HETLAND GEIR [NO]) 21 julho 2005 (2005-07-21) ver todo documento	1 a 4
Y	WO 2008039169 A2 ( HIROMOTO BRYAN [US]) 03 abril 2008 (2008-04-03) ver todo documento	1 a 4
A	JP 1228480 A (NIPPON HYPOX LAB INC) 12 setembro 1989 (1989-09-12)	

 Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C Ver o anexo de famílias das patentes

\* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado comum outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&amp;" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

**11 julho 2011**

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

**260911**

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA  
PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Rua Mayrink Veiga nº 9, 18º andar  
cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ  
+55 21 3039-3663

Nº de fax:

Funcionário autorizado

**Wellington Inácio de Almeida**

Nº de telefone: +55 21 3039-3493/3742

## RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2011/000147

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
A	JP 11263732 A (ICHIMARU PHARCOS INC) 28 setembro 1999 (1999-09-28)	
A	JP 11279204 A (SUMITOMO FORESTRY) 12 outubro 1999 (1999-10-12)	
A	JP 2000032946 A (PAWAFURU KENKO SHOKUHIN KK) 02 fevereiro 2000 (2000-02-02)	
Y	ROSA, L.H. et al. 'Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and leishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil'. <i>Antonie van Leeuwenhoek</i> , 2009, vol. 95, página 227-237. ver todo documento	1 a 4
A	ROSA, L.H. & CAPELARI, M. 'Agaricales fungi from Atlantic rain forest fragments in Minas Gerais, Brazil' <i>Brazilian J. Microbiol.</i> 2009, vol. 40, páginas 846-851.	
A	SILVA, F.S. et al. 'In vitro pharmacological screening of macrofungi extracts from the Brazilian northeastern region' <i>Pharmaceutical Biology</i> 2009, vol. 47, 5, páginas 384-389	
A	BADALYAN, S.M. 'Antiprotozoal activity and mitogenic effect of mycelium of culinary-medicinal shiitake mushroom <i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Singer (Agaricomycetidae)'. <i>International Journal of Medicinal Mushroom</i> 2004, vol. 6, páginas 131-138.	
A	INCHAUSTI, A. et al. 'Leishmanicidal and trypanocidal activity of extracts and secondary metabolites from Basidiomycetes'. <i>Phytotherapy Research</i> , 1997, vol. 11, páginas 193-197	
A	YUEXIN, L. et al. 'Fractionation and characterization of water-soluble polysaccharides from culinary-medicinal mushroom, <i>Agaricus blazei</i> Murrill (Agaricomycetidae)'. <i>International Journal of Medicinal Mushrooms</i> , 2002, vol. 4, páginas 313-319.	
P, X	VALADARES, D.G. et al. 'Leishmanicidal activity of the <i>Agaricus blazei</i> Murill in different Leishmania species' <i>Parasitology International</i> (in press). Available online 24 June 2011 doi:10.1016/j.parint.2011.06.001 ver todo documento	1 a 4
P, X	VALADARES, DG. et al. 'Leishmanicidal activity of <i>Agaricus blazei</i> fungus against different leishmania species'. Resumo PI026., Imuno 2010 - XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology. Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brazil. 03 a 06 de novembro de 2010 ver todo documento	1 a 4

**RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL**

Depósito internacional N°

PCT/BR2011/000147

**Quadro II Observações quando certas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa (Continuação do ponto 2 da primeira página)**

Este relatório de pesquisa internacional não foi formulado em relação a certas reivindicações, sob Artigo 17.2.a), pelas seguintes razões:

1.  Reivindicações: 5

porque estas se referem a matéria na qual esta Autoridade não está obrigada a realizar a pesquisa, a saber:  
aos métodos de tratamento do corpo humano ou animal por cirurgia ou terapia: Art. 17 (2)(a)(i), Regras 39.1 (iv), 67.1 (iv) do PCT. No entanto, já que o referido método está baseado na administração a um paciente humano ou animal uma formulação obtida a partir de extrato, este foi utilizado para efetuar a busca de anterioridades.

2.  Reivindicações:

porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa significativa, especificamente:

3.  Reivindicações:

porque estas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com os parágrafos segundo e terceiro da Regra 6.4.a).

**Quadro III Observações por falta de unidade de invenção (Continuação do ponto 3 da primeira página)**

Esta Autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste depósito internacional, a saber:

1.  como todas as taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa cobre todas as reivindicações pesquisáveis.
2.  como a pesquisa em todas as reivindicações pesquisáveis pode ser feita sem esforço que justifique pagamento adicional, esta Autoridade não solicitou o pagamento de taxas adicionais.
3.  como somente algumas das taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa internacional cobre somente aquelas reivindicações cujas taxas foram pagas, especificamente as reivindicações:
4.  as taxas de pesquisas adicionais requeridas não foram pagas dentro do prazo pelo depositante. Consequentemente, este relatório de pesquisa internacional se limita à invenção mencionada primeiramente nas reivindicações, na qual é coberta pelas reivindicações:

**Observações da reclamação**

- as taxas adicionais para pesquisas foram acompanhadas pela reclamação do depositante e, se for o caso, pelo pagamento da taxa de reclamação.
- as taxas adicionais para pesquisa foram acompanhadas pela reclamação do depositante mas a taxa de reclamação não foi paga dentro do prazo especificado pela solicitação.
- o pagamento de pesquisas adicionais não acompanha nenhuma reclamação.

**RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL**

Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2011/000147

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 9920258 A1	1999-04-29	AU 1105199 A CA 2308588 A1 EP 1024796 A1 US 5906825 A	1999-05-10 1999-04-29 2000-08-09 1999-05-25
WO 2005065063 A2	2005-07-21	CN 1953759 A EP 1708673 A2 JP 2007517867 A NO 20044581 D0 RU 2006129301 A US 2008233144 A1 WO 2005065063 A3	2007-04-25 2006-10-11 2007-07-05 2004-10-25 2008-02-20 2008-09-25 2005-11-17
WO 2008039169 A2	2008-04-03	CA 2618096 A1 CN 101389764 A EP 1931360 A2 JP 2009513579 A RU 2008108023 A US 2011136758 A1 WO 2008039169 A3 ZA 200801558 A	2007-02-01 2009-03-18 2008-06-18 2009-04-02 2009-09-10 2011-06-09 2008-11-13 2009-10-28
JP 1228480 A	1989-09-12	EP 0413053 A1	1991-02-20
JP 11263732 A	1999-09-28	Nenhum	
JP 11279204 A	1999-10-12	Nenhum	
JP 2000032946 A	2000-02-02	Nenhum	



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) BR 10 2012 033587-5 A2



\* B R 1 0 2 0 1 2 0 3 3 5 8 7 A 2 \*

(51) Int.Cl.:  
A61K 36/07  
A61K 31/4706  
A61P 33/06

(22) Data de Depósito: 28/12/2012  
(43) Data da Publicação: 31/12/2013  
(RPI 2243)

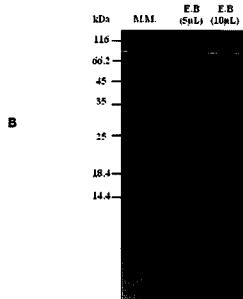
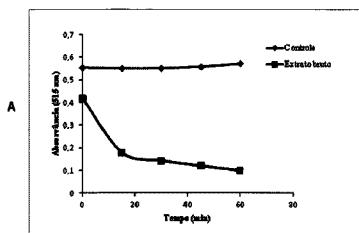
(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA  
ANTIMALÁRICA E USO

(30) Prioridade Unionista: 29/12/2011 BR PI 1107187-7

(73) Titular(es): Minasfungi do Brasil, Universidade Federal de  
Minas Gerais

(72) Inventor(es): Bruno Cabral de Lima Oliveira , Carlos Alberto  
Pereira Tavares, Cynthia Honorato Val, Elândia Aparecida dos Santos,  
Fabiana Simão Machado, Fátima Maria Caldeira Brant Costa, Jamil  
Silvano de Oliveira, Lívia Maria Esper, Marcelo Matos Santoro, William  
César Bento Régis

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMALÁRICA  
E USO A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de  
composições farmacêuticas, obtidas a partir do extrato aquoso e/ou  
liofilizado de Agaricus blazei e de suas frações, em associação ou não  
à cloroquina, para o tratamento da malária.



## “COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMALÁRICA E USO”

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de composições farmacêuticas, obtidas a partir do extrato aquoso e/ou liofilizado de *Agaricus blazei* e de suas frações, em associação ou não à cloroquina, para o tratamento da malária.

5 *Agaricus blazei* (*A. blazei*) é um fungo aeróbio que tem o potencial de degradar matéria orgânica rica em celulose, hemicelulose e lignina, para a obtenção de energia. Esse cogumelo foi reclassificado por Wasser para *Agaricus brasiliensis*; porém, a denominação de *Agaricus blazei* tem sido a 10 mais usada na literatura científica e na maioria dos seus produtos comercializados, devido aos aspectos biotecnológicos e medicinais do cogumelo [WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 60, p. 258-74, 2002]; AMAZONAS, M.A.L.A. *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* ss. 15 Heinem.): última visão sobre a polêmica questão da identidade taxonômica de um dos cogumelos mais promissores no mercado mundial. In: Simpósio internacional sobre cogumelos no Brasil, Brasília, DF. p. 78-80, 2004]. O seu valor nutricional e medicinal, aliado a características peculiares, como seu sabor, fragrância de amêndoas e excelente textura, o tornam particularmente 20 adequado a inúmeras aplicações culinárias, sendo um dos cogumelos cultivados mais valorizados no mercado mundial (STIJVE, T.; AMAZONAS, M.A.L.; GILLER, V. Flavor and taste components of *Agaricus blazei* ss. Heinem: a new gourmet and medicinal mushroom. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, Stuttgart, v. 98, p. 448-453, 2002).

25 Bernardshaw, Johnson e Hetland (2005) constataram efeitos do *Agaricus blazei* Murrill (AbM) sobre infecções induzidas por sepse, demonstrando aumento da sobrevida de camundongos tratados com um extrato de AbM. Além disso, Ellertsen e Hetland (2009) mostraram melhoria na hipersensibilidade do tipo I, através da diminuição da produção de IgE, após 30 uso de AbM e sensibilização pelo alérgeno ovalbumina. Inúmeros estudos têm relatado a ação imunomodulatória de AbM e/ou seus extratos. (BERNARDSHAW, S.; JOHNSON, E.; HETLAND, G. An extract of the

mushroom *Agaricus blazei* Murill administered orally protects against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. Scandinavian Journal of Immunology, v. 62, n. 4, p. 393–398, 2005; ELLERTSEN, L. K.; HETLAND, G. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill can protect 5 against allergy. Clinical and Molecular Allergy, v. 7, n. 6, 2009). De acordo com Lima et al. (2011), que trataram de uma revisão integrativa de vários estudos sobre a influência do AbM no sistema imune, cerca de 71,4% dos estudos analisados relatam uma atividade estimulatória, enquanto que efeitos inibitórios foram descritos em 7,1%. Já em 21,4% dos estudos, ambos efeitos, 10 estimulatório e inibitório, foram descritos. Em ensaio clínico conduzido em pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa, houve redução nos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, após 12 dias de consumo oral de um extrato de AbM, conhecido como AndoSan. Além disso, houve diminuição do marcador inflamatório calprotectina em fezes de pacientes com colite 15 ulcerativa, o que demonstra o efeito antiinflamatório do extrato (LIMA, C. U. et al. Does the *Agaricus blazei* Murill Mushroom Have Properties That Affect the Immune System? An Integrative Review. Journal of Medicinal Food, v. 14, p. 2-8, 2011; FØRLAND, D. T. et al. Effect of an extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on expression of cytokines and calprotectin in 20 patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Scandinavian Journal of Immunology, v. 73, n. 1, p. 66–75, 2011).

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de composições farmacêuticas, obtidas a partir do extrato de *Agaricus blazei* e de suas frações, em associação ou não à cloroquina, para o tratamento da Malária. A 25 malária é uma doença considerada grave problema de saúde pública no mundo e que, segundo a Organização Mundial de Saúde (2011), ocorre em cerca de 109 países, atingindo quase 50% da população, numa estimativa de 300 milhões de novos casos e 1 milhão de mortes por ano (BRASIL, 2011, Disponível em:  
[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1526](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526),  
acessado em 23 de agosto de 2011). Atinge as zonas tropicais, subtropicais e as zonas temperadas do planeta, acometendo, principalmente, crianças

menores de 5 anos, adultos jovens, gestantes e populações que se deslocam para áreas endêmicas (DI SANTI, S. M.; BOULOS, M. Protozoários – Malária. In: CIMERMAN, Benjamin; CIMERMAN, Sérgio. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 390 p.). No Brasil, o maior número de casos da doença incide na região Amazônica (99,9% dos casos), tendo condicionantes ambientais e socioculturais favorecendo o aumento da transmissão (BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010). Causada pela infecção por protozoários do gênero *Plasmodium* (DI SANTI e BOULOS, 2008) e transmitida ao homem por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* (BRASIL, 2010), apresenta como características clínicas: febre intermitente, cefaléia, calafrios, sudorese e anemia, podendo também ocorrer formas graves da doença (DI SANTI e BOULOS, 2008).

Dentre as espécies causadoras da doença, as infecções por *Plasmodium falciparum* podem resultar em uma forma complicada de malária – a malária grave (CLARK, I. et al. The pathophysiology of falciparum malaria. Pharmacology & therapeutics, v. 99, p. 221-260, 2003). A malária grave atinge diversos órgãos e pode ocasionar a malária cerebral (MC), entre outras manifestações clínicas (DE SOUZA, J.B.; RILEY, E.M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. Microbes and Infection, v. 4, p. 291-300, 2002). A malária cerebral afeta cerca de 1% dos infectados (HUNT, N. H. et al. Immunopathogenesis of cerebral malaria. International Journal for Parasitology, v. 36, p. 569-582, 2006), sendo responsável por uma mortalidade anual de dois milhões de pessoas, em sua maioria crianças africanas (RENTA, L. et al. Pathogenic T cells in cerebral malaria. International Journal for Parasitology, v. 36, p. 547-554, 2006). Mesmo não ocorrendo mortalidade, uma alta porcentagem de sobreviventes desenvolve complicações neurológicas permanentes, tais como fala desordenada,

distúrbios motores e de comportamento, déficits de memória e cegueira cortical (DE SOUZA e RILEY, 2002; KIHARA, M. et al. Impaired everyday memory associated with encephalopathy of severe malaria: the role of seizures and hippocampal damage. *Malaria Journal*, v. 8, n. 273, p.1-8, 2009).

5 O número de casos de malária grave vem crescendo, e uma das causas para isto é a provável resistência do parasita às drogas antimaláricas comumente usadas (DE SOUZA e RILEY, 2002). A cloroquina é uma destas drogas, cuja eficácia tem diminuído com o surgimento e a propagação da resistência do *P. falciparum*. O principal determinante desta resistência são as 10 mutações no parasita, que resultam em uma acentuada redução na acumulação da cloroquina (SUMMERS, R. L.; MARTIN, R. E. Functional characteristics of the malaria parasite's 'chloroquine resistance transporter': Implications for chemotherapy. *Virulence*, v. 1, n. 4, p. 304-308, 2010).

15 Antes do surgimento da resistência do *P. falciparum* à cloroquina, esta droga era utilizada para as quatro espécies de plasmódios que parasitam o homem. Com a resistência do parasita a essa droga, o tratamento desta doença se tornou um desafio para as autoridades de saúde responsáveis pelo controle da malária (BRAGA, É. M.; FONTES, C. J. F. Plasmodium – Malária. In: NEVES, David Pereira. *Parasitologia Humana*. 10º Ed. São Paulo: 20 Atheneu, 2002).

25 Outros quimioterápicos mais eficazes, que não apresentam resistência desenvolvida pelo parasita, são de alto custo e contrastam com o cenário de aparecimento e desenvolvimento da doença, que acomete áreas pobres ou em desenvolvimento. Dentre as drogas utilizadas na malária grave, se destacam os derivados de artemisininas como primeira opção de tratamento. As drogas desse grupo atuam como rápidos e potentes esquizonticidas sanguíneos, provocando a eliminação dos sintomas e do parasito em menos tempo que outras drogas convencionalmente utilizadas. No entanto, quando em uso isolado, os derivados da artemisinina resultam em alta taxa de 30 recrudescência (BRAGA e FONTES, 2002; DI SANTI e BOULOS, 2008; WAKNINE-GRINBERG et al. Artemisone effective against murine cerebral malaria. *Malaria Journal*, v. 9, n. 227, 2010). Caso não haja terapia de

combinação, após um período de controle da doença, ocorre desenvolvimento de alta parasitemia e morte por anemia malária grave (WAKNINE-GRINBERG et al., 2010).

Em conjunto, os dados citados acima claramente mostram que, devido à alta prevalência da malária no Brasil e no mundo, a resistência ou recrudescência desenvolvida pelo parasita a antimaláricos e o alto custo dos quimioterápicos eficazes levam à urgente necessidade do desenvolvimento de pesquisas de substâncias e métodos que visem melhorar as terapias para esta doença, principalmente no sentido de facilitar a recuperação e/ou manutenção da saúde do paciente, sem causar efeitos colaterais, sendo isso um dos grandes objetivos atuais.

Os efeitos imunoestimulatórios de AbM são demonstrados tanto em vários estudos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Hetland et al. (2011) propõem uma ação, tanto no sistema imune inato quanto no adaptativo. Esta ação se dá através da estimulação de células apresentadoras de抗ígenos (APCs), da via alternativa do sistema complemento e de células T helper, na subpopulação efetora Th1, ativando células B, linfócitos CD8+ citotóxicos e células NK, e reduzindo a diferenciação das células Th0 em células Th2 (HETLAND, G. et al. The Mushroom *Agaricus blazei* Murill Elicits Medicinal Effects on Tumor, Infection, Allergy, and Inflammation through Its Modulation of Innate Immunity and Amelioration of Th1/Th2 Imbalance and Inflammation. Advances in Pharmacological Sciences, v. 2011, p. 1-10, 2011).

Assim, pode-se inferir que o emprego do *Agaricus blazei* Murril ou de suas frações como um quimioterápico e/ou adjuvante no tratamento de malária experimental é bastante promissor e justifica o uso deste cogumelo na modulação de uma resposta imune efetiva do hospedeiro frente a infecção por *Plasmodium* e o desenvolvimento da MC.

Encontram-se, no estado da técnica, documentos de patente que descrevem diferentes usos de frações e extrato de *Agaricus blazei*. Porém, nenhum documento trata de sua utilização no tratamento de malária.

Por exemplo, o documento WO2011140623 descreve o desenvolvimento de formulações farmacêuticas obtidas do extrato aquoso do

fungo *Agaricus blazei* e frações derivadas do mesmo, para o tratamento da leishmaniose. Já o documento TW200836757 descreve uma composição para cuidados do fígado, que compreende extrato de *Agaricus blazei*.

### Descrição das Figuras

5 **Figura 1.** Caracterização do extrato bruto de *Agaricus blazei* (Ab). (A) Medida da atividade antioxidante do extrato bruto a partir da absorbância do radical livre DPPH; (B) Análise em SDS-Page a 12% de poliacrilamida do extrato bruto de Ab. M.M: marcadores de massa molecular, E.B: extrato bruto de Ab.

10 **Figura 2.** Tratamento com o extrato aquoso na dose de 10 mg/kg em camundongos infectados com a cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). (A) A parasitemia e a (B) sobrevivência foram monitorados periodicamente. (C) O peso corporal foi monitorado diariamente. (N= 5 camundongos/grupo). (D) Os sinais clínicos da doença foram avaliados periodicamente a partir do teste RMCBS (*Rapid Murine Coma Behavior Scale*). (E) Hematócrito foi avaliado no 15 5º dia após a infecção.

20 **Figura 3.** Tratamento com o extrato aquoso na dose de 100mg/kg em camundongos infectados com a cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). (A) A parasitemia e a (B) sobrevivência foram monitorados periodicamente. (C) O peso corporal foi monitorado diariamente. (N= 5 camundongos/grupo). (D) Hematócrito foi avaliado no 5º dia após a infecção.

25 **Figura 4.** Tratamento com o extrato liofilizado em camundongos infectados com a cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). (A) A parasitemia e a (B) sobrevivência foram monitorados periodicamente. (C) O peso corporal foi monitorado diariamente. (N= 5 camundongos/grupo). (D) Hematócrito foi avaliado no 5º dia após a infecção. A

**Figura 5.** Tratamento com extrato aquoso de *Agaricus blazei* na imunomodulação da infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. (A) A parasitemia foi monitorada no 4º e 5º dia após a infecção. Níveis

esplênicos de IL-12 (B), IFN- $\gamma$  (C), TNF- $\alpha$  (D) e IL-1 $\beta$  (E) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média  $\pm$  DP. (N= 5 camundongos/grupo).

**Figura 6.** Tratamento com extrato aquoso de *Agaricus blazei* influenciou o perfil de citocinas na infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. Níveis esplênicos de IL-6 (A), IL-17(B), IL-10 (C) e TGF- $\beta$  (D) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média  $\pm$  DP. (N= 5 camundongos/grupo).

**Figura 7.** Tratamento com extrato aquoso de *Agaricus blazei* influenciou o perfil de citocinas pró-inflamatórias do cérebro durante a infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. Níveis cerebrais de IL-12 (A), IFN- $\gamma$  (B), TNF- $\alpha$  (C), IL-1 $\beta$  (D), IL-6 (E) e IL-17 (D) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média  $\pm$  DP. (N= 5 camundongos/grupo).

**Figura 8.** Efeito do extrato aquoso de *Agaricus blazei* sobre as citocinas anti-inflamatórias do cérebro durante a infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. Níveis cerebrais de IL-10 (A) e TGF- $\beta$  (B) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média  $\pm$  DP. (N= 5 camundongos/grupo).

**Figura 9.** Fotomicroscopia de cortes cerebrais de camundongos C57BL/6 infectados com PbA e tratados com extrato aquoso de *Agaricus blazei*. Análises histológica de cortes cerebrais corados com hematoxilina e eosina de camundongos não infectados (A), infectados por PbA (B), tratados com Cloroquina (C) e tratados com 100 mg/kg do extrato aquoso de *Agaricus blazei* (E) no 5º dia após a infecção. Aumento original: A-B-C-D: 20x.

**Figura 10.** Tratamento com doses diferentes de extrato liofilizado de *Agaricus blazei* na imunomodulação da infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. (A) A parasitemia foi monitorada no 4º e 5º dia após a infecção. Níveis esplênicos de IL-12 (B), IFN- $\gamma$  (C), TNF- $\alpha$  (D) e IL-1 $\beta$  (E) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média  $\pm$  DP. (N= 5

camundongos/grupo).

**Figura 11.** Tratamento com extrato liofilizado de *Agaricus blazei* influenciou o perfil de citocinas na infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. Níveis esplênicos de IL-6 (A), IL-17(B), IL-10 (C) e TGF- $\beta$  (D) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média  $\pm$  DP. (N= 5 camundongos/grupo).

**Figura 12.** Tratamento com extrato liofilizado de *Agaricus blazei* influenciou o perfil de citocinas pró-inflamatórias do cérebro durante a infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. Níveis cerebrais de IL-12 (A), IFN- $\gamma$  (B), TNF- $\alpha$  (C), IL-1 $\beta$  (D), IL-6 (E) e IL-17 (D) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média  $\pm$  DP. (N= 5 camundongos/grupo).

**Figura 13.** Efeito do extrato liofilizado de *Agaricus blazei* sobre as citocinas anti-inflamatórias do cérebro durante a infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. Níveis cerebrais de IL-10 (A) e TGF- $\beta$  (B) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média  $\pm$  DP. (N= 5 camundongos/grupo).

**Figura 14.** Fotomicroscopia de cortes cerebrais de camundongos C57BL/6 infectados com PbA e tratados com extrato liofilizado de *Agaricus blazei*. Análises histológica de cortes cerebrais corados com H&E de camundongos não infectados (A), infectados por PbA (B), tratados com Cloroquina (C) e tratados com 800 e 1600 mg/kg do extrato liofilizado de *Agaricus blazei* (D e E) no 5º dia após a infecção. Aumento original: A-B-C-D-E: 20x.

**Figura 15.** Caracterização das frações do extrato de *Agaricus blazei*. (A) Medida da atividade antioxidante das frações a partir da absorbância do radical livre DPPH; (B) Análise em SDS-Page a 12% de poliacrilamida das frações obtidas da purificação do extrato bruto de AbM. Canaleta 1: marcadores de massa molecular; Canaleta 2: Fração A (5 $\mu$ L); Canaleta 3: Fração A (10 $\mu$ L); Canaleta 4: Fração B (5 $\mu$ L); Canaleta 5: Fração B (10 $\mu$ L); Canaleta 6: marcadores de massa molecular; Canaleta 7: Fração C (5 $\mu$ L).

**Figura 16.** Tratamento com fração A de *Agaricus blazei*. (A) A parasitemia e a (B) sobrevivência foram monitorados periodicamente. (C) O peso corporal foi monitorado diariamente. (N= 5 camundongos/grupo); (D) Os sinais clínicos da doença foram avaliados periodicamente a partir do teste RMCBS (Rapid Murine Coma Behavior Scale); (E) Hematócrito foi avaliado no 5º dia após a infecção.

**Figura 17.** Tratamento com fração B de *Agaricus blazei*. Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL de fração B de *Agaricus blazei* nas doses de 10, 80 e 800 mg/kg administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). (A) A parasitemia e a (B) sobrevivência foram monitorados periodicamente. (C) O peso corporal foi monitorado diariamente. (N= 5 camundongos/grupo). (D) Os sinais clínicos da doença foram avaliados periodicamente a partir do teste RMCBS (Rapid Murine Coma Behavior Scale). (E) Hematócrito foi avaliado no 5º dia após a infecção.

**Figura 18.** Tratamento com fração C de *Agaricus blazei*. (A) A parasitemia e a (B) sobrevivência foram monitorados periodicamente. (C) O peso corporal foi medido diariamente. (N= 5 camundongos/grupo). (D) Hematócrito foi avaliado no 5º dia após a infecção.

**Figura 19.** Tratamento com doses diferentes de fração C de *Agaricus blazei* na imunomodulação da infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. (A) A parasitemia foi monitorada no 4º e 5º dia após a infecção. Níveis esplênicos de IL-12 (B), IFN-γ (C), IL-1β (D) e TNF-α (E) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média ± DP. (N= 5 camundongos/grupo).

**Figura 20.** Tratamento com fração C de *Agaricus blazei* influenciou o perfil de citocinas na infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. Níveis esplênicos de IL-6 (A), IL-17(B), IL-10 (C) e TGF-β (D) foram medidos

no 5º dia após a infecção e expressos pela média ± DP. (N= 5 camundongos/grupo).

**Figura 21.** Avaliação do tratamento com fração C de *Agaricus blazei* no perfil de citocinas pró-inflamatórias do cérebro durante a infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA.

**Figura 22.** Efeito da fração C de *Agaricus blazei* sobre as citocinas anti-inflamatórias do cérebro durante a infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA.

**Figura 23.** Fotomicroscopia de cortes cerebrais de camundongos C57BL/6 infectados com PbA e tratados com fração C de *Agaricus blazei*. Análises histológica de cortes cerebrais corados com H&E de camundongos não infectados (A), infectados por PbA (B), tratados com Cloroquina (C) e tratados com 100 e 800 mg/kg de fração C de *Agaricus blazei* (D e E) no 5º dia após a infecção. Aumento original: A-B-C-D-E: 20x.

## 15 Descrição Detalhada da Tecnologia

A presente invenção caracteriza-se pelo uso do extrato aquoso ou liofilizado de *Agaricus blazei* e suas frações derivadas, em associação ou não com outros antimaláricos como a cloroquina combinados com excipientes farmaceuticamente aceitáveis, no tratamento da malária. Tais composições farmacêuticas podem ser administradas por via oral, intravenosa e/ou intraperitoneal, sob as formas farmacêuticas sólidas, semissólidas e líquidas, selecionadas do grupo compreendendo emulsões em geral, soluções, comprimidos e cápsulas.

A tecnologia aqui proposta poderá ser melhor compreendida através dos seguintes exemplos, não limitantes:

**Exemplo 1. Preparação do extrato aquoso e liofilizado e frações do fungo *Agaricus blazei*, sua caracterização química parcial e avaliação do potencial antioxidante**

O extrato aquoso contendo 1,5 % (p/v) do fungo *Agaricus blazei* foi preparado com 1 hora de incubação a 80°C, seguida de centrifugação a 9000 rpm (centrífuga SORVAL LC5C) por 1 h 30 minutos. Após as etapas acima, foi realizada a eletroforese para visualização dos componentes presentes no extrato bruto (**Figura 1B**) sendo que uma parte do extrato foi liofilizada para melhorar o potencial biotecnológico de estocagem e manipulação da formulação. A avaliação foi feita separadamente para o extrato aquoso e o liofilizado. Em sequência a centrifugação do extrato, o sobrenadante foi concentrado em uma coluna Amicon® de 3.000 Dáltons (Da), na velocidade de 6.000 rpm, por 45 minutos, a 4°C. Após esta concentração, o material que passou pelo filtro foi recolhido e estocado sendo denominado de fração C (<3kD) e o material que ficou retido no filtro após três repetições do processo (diluído em 3x seu volume em água e nova aplicação) foi transferido para um novo Amicon® de 10.000 Da e centrifugado a 6.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Após esta concentração, o material foi diluído novamente em 3x seu volume em água e reconcentrado no mesmo filtro de 10.000 Da. O material retido no filtro de 10.000 Da foi recolhido e denominado Fração A (>10kD). O material filtrado (que passou pelo filtro de 10.000 Da e que não tinha mais moléculas menores que 3.000 Da foi denominado Fração B (entre 3 e 10 kD). As amostras das frações foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (**Figura 15B**).

Em seguida, o extrato e as frações foram avaliados visando a determinação da concentração de seus principais compostos constituintes com potencial correlação com as principais atividades biológicas do cogumelo:

**25 Determinação da concentração de carboidrato pelo método do fenol-ácido sulfúrico.**

As amostras do extrato bruto foram diluídas (50x) e fracionadas em 200 µL. Para determinação da concentração de carboidrato, nas amostras foram adicionados 200 µL de solução de fenol (5%) e 1 mL de ácido sulfúrico. A homogeneização foi feita em agitador vórtex e, após 15 minutos, a absorbância foi medida a 480 nm, usando um espectrofotômetro UV-VIS.

Como branco utilizou-se uma solução de água, reagente de fenol (5%) e ácido sulfúrico. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de glicose, para comparação. Todos os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso em mg de glicose por mL das frações das amostras.

- 5 Posteriormente foi calculado o percentual de carboidrato dentro do peso total da amostra (**Tabela 1**).

**Tabela 1. Composição química parcial do extrato bruto de *Agaricus blazei***

Compostos Fenólicos		Carboidratos	Proteínas
Totais	Flavonóides		
4,20	1,76	60,29	33,76

\*1 mg/mL de solução de extrato aquoso

- 10 **Determinação da concentração de proteínas pelo método de Lowry.**

As amostras do extrato bruto (aquoso e liofilizado) tiveram suas concentrações proteicas avaliadas a partir de uma alíquota de 30 µL de cada amostra, adicionando-se 170 µL de água e 2,1 mL de solução de biureto. Após 10 minutos no escuro, adicionou-se 200 µL de solução de Folin (1:2). A homogeneização foi feita em agitador vórtex, deixando-se em repouso no escuro durante uma hora. A absorbância foi medida a 750 nm em espectrofotômetro UV-VIS. Como branco utilizou-se água, solução de biureto e solução de Folin-Ciocalteau. Foi construída uma curva de calibração com soluções de albumina bovina (BSA) para comparação. Todos os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso em mg de BSA por mL das frações das amostras. Posteriormente foi calculado o percentual dentro do peso total da amostra (**Tabela 2**).

**Tabela 2. Dosagem de proteínas do extrato bruto de *Agaricus blazei***

Amostras	Quantidade ( $\mu$ L)	Concentração (mg/mL)
Extrato Aquoso	10	5,6
Extrato Liofilizado	5	11,7

\*Dosagem de proteína realizada pelo método de Lowry com curva de BSA

#### **Determinação da concentração de compostos fenólicos.**

A determinação de compostos fenólicos foi feita com alíquota de 80  $\mu$ L de cada amostra do extrato bruto que foi diluído (50x) e fracionado em 200  $\mu$ L.

- 5 Para a determinação, adicionou-se 320  $\mu$ L de metanol, 250  $\mu$ L de reagente Folin-Ciocalteau, 3 mL de água e 1 mL de carbonato de sódio 15% (p/v). A homogeneização foi feita em agitador vórtex e a amostra ficou em repouso, durante uma hora, no escuro. A leitura da absorbância foi feita a 750 nm em espectrofotômetro UV-VIS e os testes feitos em triplicata. Como branco utilizou-se o metanol (320 $\mu$ L), reagente Folin-Ciocalteau (250 $\mu$ L), 3 mL de água e carbonato de sódio 15% (p/v). Os dados obtidos foram comparados com a curva de calibração obtida com solução de ácido gálico 0,5 mg/mL e os resultados expressos em mg de ácido gálico por mL das frações das amostras. Posteriormente, foi calculado o percentual dentro do peso total da amostra (**Tabela 1**).
- 10
- 15

#### **Determinação da concentração de flavonóides.**

- A uma alíquota de 200  $\mu$ L das amostras do extrato bruto, da Fração A (>10 kD), Fração B (entre 3 e 10 kD) e Fração C (<3 kD), diluídos em 50x seu volume em água e fracionados em 200  $\mu$ L, foram adicionados 800  $\mu$ L de água, 20 150  $\mu$ L de carbonato de sódio a 10,6%, 300  $\mu$ L de cloreto de alumínio a 2% em metanol, 1 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L e 1 mL de água. A solução ficou em repouso por 5 minutos e a leitura da absorbância feita a 410 nm em espectrofotômetro UV-VIS. Como branco utilizou-se água, etanol, carbonato de sódio 10,6%, cloreto de alumínio 2% e hidróxido de sódio. Foi construída

uma curva de calibração com solução de quercetina para comparação. Os resultados foram expressos em mg de quercetina por mL das frações das amostras. Posteriormente, foi calculado o percentual dentro do peso total da amostra.

5 A Tabela 3 mostra as concentrações de carboidratos, proteínas, flavonóides e compostos fenólicos das frações de AbM e quanto ao teor de flavonoides do extrato bruto está relatado na Tabela 1.

**Tabela 3. Composição química parcial das frações do extrato de AbM\***

<b>Frações</b>	<b>Compostos Fenólicos (%)</b>		<b>Carboidratos (%)</b>	<b>Proteínas (%)</b>
	<b>Totais</b>	<b>Flavonóides</b>		
<b>Fração A (&gt;10kDa)</b>	2,12	2,12	73,37	22,39
<b>Fração B (3-10 kDa)</b>	4,73	1,79	55,37	38,11
<b>Fração C (&lt;3 kDa)</b>	4,96	0,81	56,86	37,37

\*(1 mg/mL de solução de fração de AbM)

10 O potencial antioxidante do cogumelo *Agaricus blazei* e suas frações, que pode vir a ser importante na resposta ao estresse oxidativo causado pela malária, foi medido a partir da absorbância do radical livre DPPH onde, simplificadamente, a queda da absorção demonstra o maior potencial antioxidante da amostra (Figura 1A e 15A, respectivamente). A atividade antioxidante foi determinada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), proposto por Brand-Williams et al., 1995, em que ocorre a captura do DPPH por antioxidantes produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. A uma alíquota de 5 µL de amostra é adicionada 195 µL de solução de DPPH (60µM). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Varioskan

da marca Thermo Scientific até sua estabilização. A atividade antioxidante máxima foi calculada convertendo-se a absorbância em porcentagem de atividade antioxidante ( $AA_{máxima}$ ) por meio da fórmula:  $AA_{máxima} (\%) = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\}$ . Foi feito um controle negativo com 5  $\mu\text{L}$  de solução metanólica:aquosa e 195  $\mu\text{L}$  de DPPH.

### **Exemplo 2. Estudo da parasitemia e infecção dos animais**

A infecção por *P. berghei* ANKA induz malária grave em camundongos, mimetizando várias características observadas em humanos infectados por *P. falciparum*, principalmente os sintomas da MC (malária cerebral).

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas, com idade de seis a oito semanas, obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG). Os camundongos foram infectados com a cepa *Plasmodium berghei* ANKA-GFP, clone cl15cy1 a qual expressa a proteína GFP (Green Fluorescent Protein) constitutivamente durante todo o ciclo de vida. A rota de infecção foi intra-peritoneal (I.P.), com inóculo padronizado de  $10^5$  hemácias parasitadas/camundongo, em solução tampão fosfato estéril (PBS, 200  $\mu\text{L}$ ), para garantir um grau de infecção uniforme nos diferentes grupos conforme Grau et al., 1986 (GRAU, G.E. et al. L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. The Journal of Immunology, v. 137, p. 2348-2354, 1986). Os eritrócitos parasitados (EP), usados para infectar os camundongos dos grupos experimentais, foram obtidos através de uma passagem *in vivo* em camundongos C57BL/6 naïve, até alcançarem um percentual de hemácias parasitadas entre 5 a 8%. A parasitemia foi observada através de análise da expressão de GFP por citometria de fluxo.

#### **Determinação da parasitemia.**

Para a determinação da evolução da parasitemia, foi coletada, a partir do 3º dia pós infecção (dpi) até a morte dos animais, uma gota de sangue (cerca de 3  $\mu\text{L}$ ) em 2 mL de PBS estéril, para análise por citometria de fluxo (FACScan – BECTON DICKINSON, USA). Os dados foram analisados no

programa FACS Diva. Eritrócitos não infectados de C57BL/6 foram usados como parâmetro para identificar as propriedades específicas de tamanho versus granulosidade (FSC/SSC). Os eritrócitos parasitados foram identificados através do aumento da fluorescência verde e, expressos em 5 percentual de eritrócitos parasitados. Um total de 100.000 leituras foram realizadas para cada amostra.

**Exemplo 3. Avaliação do peso e da sobrevida dos animais infectados.**

As variações de peso e a sobrevida dos animais foram monitoradas diariamente ao longo da infecção. Os animais foram mantidos com água e 10 ração *ad libitum*.

**Medida dos hematócritos.**

O volume globular das hemácias foi determinado por coleta de sangue da cauda de camundongos através de um tubo capilar (preenche-se o tubo com sangue até  $\frac{3}{4}$  da sua altura). O tubo foi centrifugado a 10.000 rpm, por 10 15 minutos, em uma centrífuga para hematócrito. O sangue é separado em duas camadas (plasma e eritrócitos). Mediu-se, então, o comprimento da camada de eritrócitos, correspondendo ao percentual de volume ocupado pelos eritrócitos naquela amostra de sangue (adaptado de BAKIR, H. Y.; TOMIYAMA, C.; ABO, T. Cytokine profile of murine malaria: stage-related 20 production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Biomedical Research, v. 32, p. 203-208, 2011).

**Exemplo 4. Análises de parâmetros cognitivos e comportamentais.**

Os parâmetros cognitivos e comportamentais foram avaliados por meio do conjunto de testes chamado Escala de Comportamento e Rápido Coma 25 Murino (sigla – RMCBS – do inglês Rapid Murine Coma and Behavior Scale) (CARROLL, R. W. et al. A Rapid Murine Coma and Behavior Scale for Quantitative Assessment of Murine Cerebral Malaria. PLoS ONE, v. 5, p. 1-12, 2010). Antes dos testes, os animais foram conduzidos e mantidos no local do experimento, para minimizar os efeitos da transferência sobre o resultado

dos testes (TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006). Os aparelhos foram devidamente limpos após a avaliação de cada animal, para evitar a influência de odores durante o  
5 teste.

**Bateria de testes RMCBS (Rapid Murine Coma and Behavior Scale).**

A bateria de teste RMCBS foi desenvolvida para avaliar MC manifestada em camundongos C57BL/6 infectados com *Plamodium berghei* ANKA (PbA), e foi utilizado nesse estudo para avaliar alterações comportamentais neurológicas durante o curso da infecção. Esse teste permite ao operador acompanhar a evolução clínica da síndrome. O RMCBS consiste em 10 parâmetros e, para cada um, atribui-se uma pontuação de 0 a 2, sendo 0 relacionado a pouca função e 2 a uma maior função desempenhada pelo animal. Um animal pode acumular até 20 pontos. Os  
10 parâmetros avaliados são similares aos encontrados na bateria de testes SHIRPA, utilizando, contudo, somente aqueles que refletem, em tempo real, a função do sistema nervoso central, além daqueles que podem ser avaliados dentro de segundos (LACKNER, P. et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 32,  
15 20 p.177–188, 2006).

A bateria de testes RMCBS foi realizada com animais controle (infectados sem tratamento, com n=5); animais recebendo tratamento com extrato aquoso e liofilizado de AbM (n=5); e animais recebendo tratamento com as frações de AbM (A,B e C) (n=5); a partir do 3º dpi até o 7º dpi e depois  
25 repetido no 14º dpi. Durante os primeiros 90 segundos da avaliação, o camundongo foi colocado no canto superior esquerdo de uma caixa de observação, com o piso dividido em quadrados, e seu comportamento foi observado em relação à higiene, marcha, posição corporal, comportamento exploratório e equilíbrio. Nos 90 segundos subsequentes, o camundongo foi  
30 avaliado em seus reflexos, força dos membros e ações de autopreservação.

A parasitemia sanguínea foi associada aos resultados do teste. Esse teste permite a avaliação de um grande número de camundongos em um único experimento, proporcionando um nível de rendimento e potência necessários para determinar a eficácia de medicamentos em ensaios de terapias adjuvantes (CARROLL et al., 2010).

**Exemplo 5. Descrição dos efeitos do *Agaricus blazei* sobre diferentes parâmetros de avaliação da infecção por malária.**

Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL do extrato de *Agaricus blazei* na dose de 10 mg/kg administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados com PbA por via intraperitoneal. A porcentagem de parasitemia, a perda de peso, o teste RMCBS e a porcentagem de hematócrito foram expressos pela média ± DP. A análise de variância Two-way com teste Bonferroni\* de múltiplas comparações foi utilizada para avaliar a parasitemia, a perda de peso e o teste RMCBS entre os grupos de camundongos tratados e não tratados. A curva de sobrevivência foi avaliada pelo teste de Logrank\*\* e o percentual de hematócrito foi avaliado pela análise de variância One-way com pós-teste Bonferroni\*\*\*. O nível de significância utilizado foi, respectivamente, \* $p=0,05$ ; \*\* $p< 0,01$ ; \*\*\* $p< 0,001$ . Tal análise estatística é repetida para os demais tratamentos quando pertinente seu uso. Assim, foi evidenciado que o tratamento com o extrato aquoso em baixa dose resulta em não proteção de camundongos à infecção com a cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Como pode ser confirmado na **Figura 2** em que a **Figura 2A** é observada a parasitemia e a **Figura 2B** a sobrevivência com monitorização periódica. Na **Figura 2C** o peso corporal foi monitorado diariamente e na **Figura 2D** foram avaliados os sinais clínicos da doença periodicamente a partir do teste RMCBS (*Rapid Murine Coma Behavior Scale*). Na **Figura 2E** o hematócrito foi avaliado no 5º dia após a infecção.

Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL do extrato de *Agaricus blazei* na dose de 100 mg/kg administrado por gavagem

três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados com PbA por via intraperitoneal. Após a análise estatística dos parâmetros parasitemia, perda de peso, teste RMCBS e porcentagem de hematócrito pode-se concluir que o tratamento com o extrato aquoso em maior concentração resultou na resistência de camundongos à infecção com a cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Esse resultado pode ser observado na **Figura 3** onde na **Figura 3A** é observado a parasitemia, na **Figura 3B** a sobrevivência, na **Figura 3C** o peso corporal monitorado diariamente e na **Figura 3D** o hematócrito avaliado no 5º dia após a infecção.

Para avaliar o tratamento com o extrato liofilizado, fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL de extrato liofilizado de *Agaricus blazei* nas doses de 80 e 800 mg/kg administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) por via intraperitoneal. Após a análise estatística dos parâmetros parasitemia, perda de peso, teste RMCBS e porcentagem de hematócrito pode-se concluir que o tratamento com o extrato liofilizado resultou em proteção contra o desenvolvimento de malária cerebral experimental. Esse resultado pode ser observado na **Figura 4** onde na **Figura 4A** é avaliada a parasitemia, na **Figura 4B** a sobrevivência, na **Figura 4C** o peso corporal monitorado diariamente e na **Figura 4D** o hematócrito avaliado no 5º dia após a infecção.

Para avaliar o efeito do extrato aquoso de *Agaricus blazei* na imunomodulação da infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA, fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL do extrato de aquoso de *Agaricus blazei* ou cloroquina nas doses de 100 e 30 mg/kg, respectivamente, administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA por via intraperitoneal. Na **Figura 5A** a parasitemia foi monitorada no 4º e 5º dia após a infecção. Os níveis esplênicos de IL-12 (**Figura 5B**), IFN-γ (**Figura 5C**), TNF-α (**Figura 5D**)

e IL-1 $\beta$  (**Figura 5E**). A análise de variância Two-way com pós-teste Bonferroni\* de múltiplas comparações foi utilizado para comparar a parasitemia de animais infectados e animais tratados. A análise de variância One-way com pós-teste Bonferroni\*\* e Teste T\*\*\* com correção de Welch e de F-Test foram utilizados para medir a produção de citocinas entre os grupos de camundongos tratados e não tratados. O nível de significância utilizado foi, respectivamente, \* $p=0,05$ ; \*\* $p< 0,01$ ; \*\*\* $p< 0,001$ .

O tratamento com extrato aquoso de *Agaricus blazei* influenciou o perfil de citocinas na infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA como pode ser observado na **Figura 6**, onde fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250  $\mu$ L do extrato de aquoso de *Agaricus blazei* ou cloroquina nas doses de 100 e 30 mg/kg, respectivamente, administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA em via intraperitoneal. Níveis esplênicos de IL-6 (**Figura 6A**), IL-17(**Figura 6B**), IL-10 (**Figura 6C**) e TGF- $\beta$  (**Figura 6D**). Foi feita a análise estatística da produção de citocinas como nos tratamentos anteriores.

Observou-se também que o tratamento com extrato aquoso de *Agaricus blazei* influenciou o perfil de citocinas pró-inflamatórias do cérebro durante a infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA como pode ser observado na **Figura 7** onde fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250  $\mu$ L do extrato de aquoso de *Agaricus blazei* ou cloroquina nas doses de 100 e 30 mg/kg, respectivamente, administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA em via intraperitoneal. Níveis cerebrais de IL-12 (**Figura 7A**), IFN- $\gamma$  (**Figura 7B**), TNF- $\alpha$  (**Figura 7C**), IL-1 $\beta$  (**Figura 7D**), IL-6 (**Figura 7E**) e IL-17 (**Figura 7F**). Foi feita a análise estatística da produção de citocinas como nos tratamentos anteriores.

Foi observado efeito do extrato aquoso de *Agaricus blazei* sobre as citocinas anti-inflamatórias do cérebro durante a infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA como pode ser observado na **Figura 8** onde

fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL do extrato aquoso de *Agaricus blazei* ou cloroquina nas doses de 100 e 30 mg/kg, respectivamente, administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA em via intraperitoneal. Níveis cerebrais de IL-10 (**Figura 8A**) e TGF-β (**Figura 8B**). Foi feita a análise estatística da produção de citocinas como nos tratamentos anteriores.

A fotomicroscopia de cortes cerebrais de camundongos C57BL/6 infectados com PbA e tratados com extrato aquoso de *Agaricus blazei* mostrou o efeito protetor do *Agaricus blazei* como pode ser observado na **Figura 9** onde estão mostradas as análises histológicas de cortes cerebrais corados com hematoxilina e eosina de camundongos não infectados (**Figura 9A**), infectados por PbA (**Figura 9B**), tratados com cloroquina (**Figura 9C**) e tratados com 100 mg/kg do extrato aquoso de *Agaricus blazei* (**Figura 9E**) no 5º dia após a infecção. Côrtex cerebral com aspecto histológico normal, contendo neurônios sadios pode ser visto na **Figura 9A**. O côrtex cerebral com área de necrose (seta), intenso foco hemorrágico e neurônios hiperchromáticos e condensados ao redor (asteriscos) na **Figura 9B**. Um vaso apresentando acúmulo moderado de hemácias, hemorragia moderada (seta) pode ser observado na **Figura 9C** e o parênquima cerebral com aspecto histológico normal na **Figura 9D**.

Foi observado o efeito de doses diferentes de extrato liofilizado de *Agaricus blazei* na imunomodulação da infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA (**Figura 10**). Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL do extrato liofilizado de *Agaricus blazei* (800 ou 1600 mg/kg) ou cloroquina (30 mg/kg), administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA por via intraperitoneal. Na **Figura 10A** é observada a parasitemia monitorada no 4º e 5º dia após a infecção e os níveis esplênicos de IL-12 na **Figura 10B**, IFN-γ na **Figura 10C**, TNF-α na **Figura 10D** e IL-1β na **Figura 10E**. A análise de variância Two-way com pós-teste Bonferroni\* de múltiplas comparações foi

utilizado para comparar a parasitemia de animais infectados e animais tratados. A análise de variância One-way com pós-teste Bonferroni\*\* e Teste T\*\*\* com correção de Welch e de F-Test foram utilizados para medir a produção de citocinas entre os grupos de camundongos tratados e não tratados. O nível de significância utilizado foi, respectivamente, \* $p=0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

O tratamento com extrato liofilizado de *Agaricus blazei* influenciou o perfil de citocinas na infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA em um experimento onde fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL do extrato liofilizado de *Agaricus blazei* (800 ou 1600 mg/kg) ou cloroquina (30 mg/kg), administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi) (**Figura 11**). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA por via intraperitoneal. Níveis esplênicos de IL-6 (**Figura 11A**), IL-17(**Figura 11B**), IL-10 (**Figura 11C**) e TGF-β (**Figura 11D**). Foi feita a análise estatística da produção de citocinas como nos tratamentos anteriores.

Na **Figura 12** podemos observar que o tratamento com extrato liofilizado de *Agaricus blazei* influenciou o perfil de citocinas pró-inflamatórias do cérebro durante a infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA quando fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL do extrato liofilizado de *Agaricus blazei* (800 ou 1600 mg/kg) ou cloroquina (30 mg/kg), administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA por via intraperitoneal. Níveis cerebrais de IL-12 (**Figura 12A**), IFN-γ (**Figura 12B**), TNF-α (**Figura 12C**), IL-1β (**Figura 12D**), IL-6 (**Figura 12E**) e IL-17 (**Figura 12F**). Foi feita a análise estatística da produção de citocinas como nos tratamentos anteriores.

Na **Figura 13** podemos observar o efeito do extrato liofilizado de *Agaricus blazei* sobre as citocinas anti-inflamatórias do cérebro durante a infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA quando fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL do extrato liofilizado de *Agaricus blazei* (800 ou 1600 mg/kg) ou cloroquina (30 mg/kg), administrado

por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA por via intraperitoneal. Níveis cerebrais de IL-10 (**Figura 13A**) e TGF-β (**Figura 13B**). Foi feita a análise estatística da produção de citocinas como nos tratamentos anteriores.

Na **Figura 14** as análises histológicas de cortes cerebrais corados com hematoxilina e eosina de camundongos não infectados (**Figura 14A**), infectados por PbA (**Figura 14B**), tratados com cloroquina (**Figura 14C**) e tratados com 800 e 1600 mg/kg do extrato liofilizado de *Agaricus blazei* (**Figura 14D e 14E**) no 5º dia após a infecção demonstram o efeito protetor do *Agaricus blazei*. O córtex cerebral com aspecto histológico normal contendo neurônios sadios é visualizado na **Figura 14A**. Pode-se observar o córtex cerebral com área de necrose (seta), intenso foco hemorrágico e neurônios hiperchromáticos e condensados ao redor (asteriscos) na **Figura 14B**. Observa-se, ainda, vaso apresentando acúmulo moderado de hemácias, hemorragia moderada (seta) na **Figura 14C** e neurônios com aspecto normal na região cortical do encéfalo (**Figuras 14D e 14E**). As figuras foram aumentadas do tamanho original em 20 vezes.

O tratamento com fração A de *Agaricus blazei* não protegeu contra o desenvolvimento da malária cerebral experimental (**Figura 16**). Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL de fração A de *Agaricus blazei* na dose de 10 mg/kg administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). A porcentagem de parasitemia, a perda de peso, o teste RMCBS e a porcentagem de hematócrito foram expressos pela média ± DP. A análise de variância Two-way com teste Bonferroni\* de múltiplas comparações foi utilizada para avaliar a parasitemia, a perda de peso e o teste RMCBS entre os grupos de camundongos tratados e não tratados. A curva de sobrevivência foi avaliada pelo teste de Logrank\*\* e o percentual de hematócrito foi avaliado pela análise de variância One-way com pós-teste Bonferroni\*\*\*. O nível de significância utilizado foi, respectivamente, \* $p=0,05$ ; \*\* $p< 0,01$ ; \*\*\* $p< 0,001$ . Tal análise estatística é repetida para os demais tratamentos quando pertinente

seu uso.

O tratamento com fração B de *Agaricus blazei* não impediu a suscetibilidade dos camundongos à infecção provocada por *Plasmodium berghei* ANKA (**Figura 17**). Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas 5 com 250 µL de fração B de *Agaricus blazei* nas doses de 10, 80 e 800 mg/kg administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com 10<sup>5</sup> eritrócitos infectados por PbA em via intraperitoneal. Os resultados podem ser observados na **Figura 17** onde na **Figura 17A** é avaliada a parasitemia, na 10 **Figura 17B** a sobrevivência, na **Figura 17C** o peso corporal monitorado diariamente e na **Figura 17D** o hematócrito avaliado no 5º dia após a infecção. A análise de variância Two-way com teste Bonferroni\* de múltiplas comparações foi utilizada para avaliar a parasitemia, a perda de peso e o teste RMCBS entre os grupos de camundongos tratados e não tratados. A curva de 15 sobrevivência foi avaliada pelo teste de Logrank\*\* e o percentual de hematócrito foi avaliado pela análise de variância One-way com pós-teste Bonferroni\*\*\*. O nível de significância utilizado foi, respectivamente, \*p=0,05; \*\*p< 0,01; \*\*\*p< 0,001.

O tratamento com fração C de *Agaricus blazei* resultou na resistência 20 de camundongos à infecção com a cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) e impediu o desenvolvimento de malária cerebral experimental (**Figura 18**). Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL de fração C de *Agaricus blazei* na dose de 100 mg/kg administrado por gavagem três dias 25 antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com 10<sup>5</sup> eritrócitos infectados com PbA por via intraperitoneal. Após a análise estatística dos parâmetros parasitemia, perda de peso, teste RMCBS e porcentagem de hematócrito os resultados podem ser observados na **Figura 18A** a parasitemia e na **Figura 18B** a sobrevivência foram monitorados periodicamente. A **Figura 18C** é visualizado o peso 30 corporal e na **Figura 18D** o hematócrito foi avaliado no 5º dia após a infecção.

A **Figura 19** mostra o tratamento com doses diferentes de fração C de *Agaricus blazei* na imunomodulação da infecção malárica provocada por

*Plasmodium berghei* ANKA. Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL de fração C de *Agaricus blazei* (100 ou 800 mg/kg) ou Cloroquina (30 mg/kg), administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA em via intraperitoneal. A parasitemia (**Figura 19A**) foi monitorada no 4º e 5º dia após a infecção. Níveis esplênicos de IL-12 (**Figura 19B**), IFN-γ (**Figura 19C**), IL-1β (**Figura 19D**) e TNF-α (**Figura 19E**) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média ± DP. Foi feita a análise estatística da produção de citocinas como nos tratamentos anteriores.

A **Figura 20** mostra que o tratamento com fração C de *Agaricus blazei* influenciou o perfil de citocinas na infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL de fração C de *Agaricus blazei* (100 ou 800 mg/kg) ou Cloroquina (30 mg/kg), administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA em via intraperitoneal. Níveis esplênicos de IL-6 (**Figura 20A**), IL-17(**Figura 20B**), IL-10 (**Figura 20C**) e TGF-β (**Figura 20D**) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média ± DP. Foi feita a análise estatística da produção de citocinas como nos tratamentos anteriores.

Na **Figura 21** fica evidente que o tratamento com fração C de *Agaricus blazei* influenciou o perfil de citocinas pró-inflamatórias do cérebro durante a infecção malária provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL de fração C de *Agaricus blazei* (100 ou 800 mg/kg) ou Cloroquina (30 mg/kg), administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA em via intraperitoneal. Níveis cerebrais de IL-12 (**Figura 21A**), IFN-γ (**Figura 21B**), IL-1β (**Figura 21C**), TNF-α (**Figura 21D**), IL-6 (**Figura 21E**) e IL-17 (**Figura 21D**) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela

média ± DP. Foi feita a análise estatística da produção de citocinas como nos tratamentos anteriores.

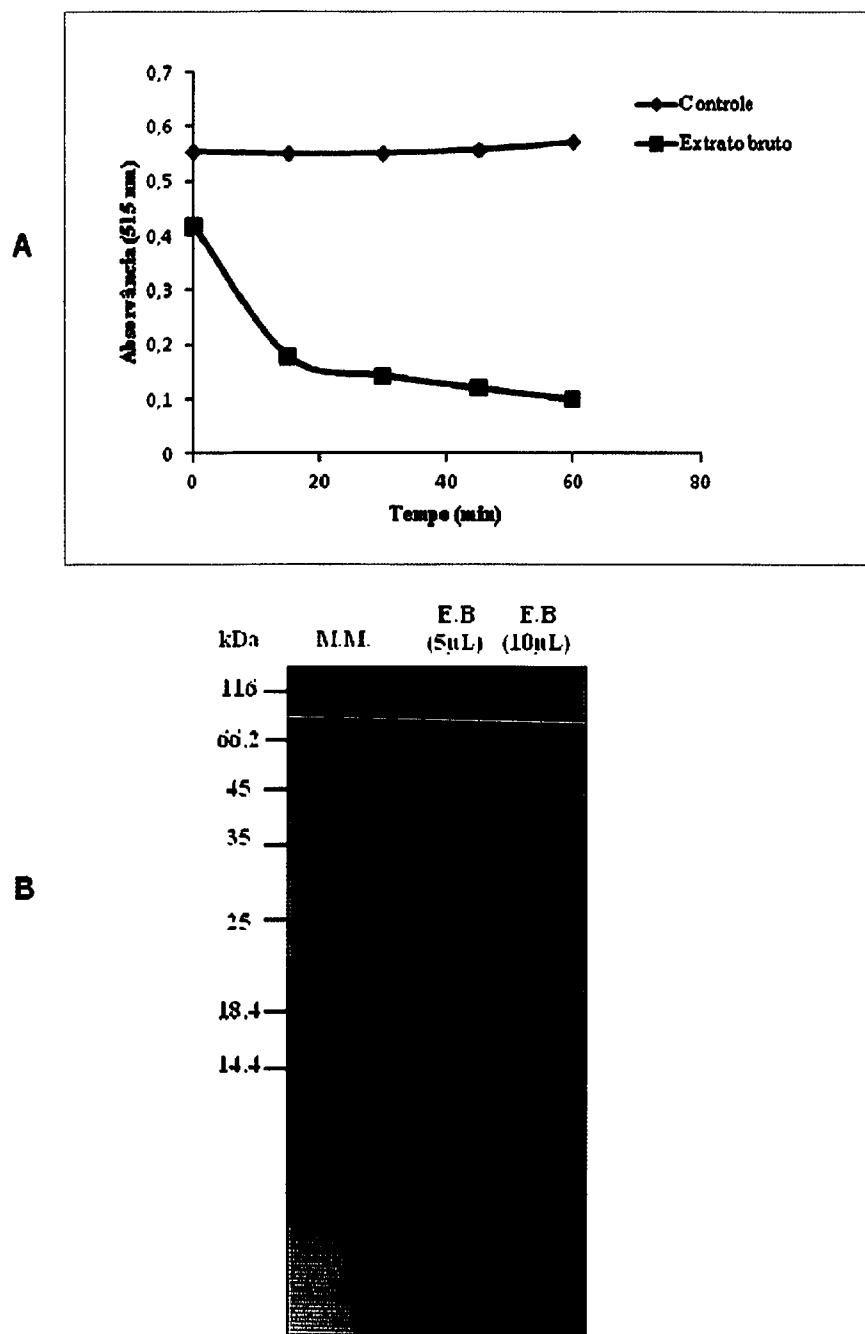
Na **Figura 22** fica evidente o efeito da fração C de *Agaricus blazei* sobre as citocinas anti-inflamatórias do cérebro durante a infecção malárica provocada por *Plasmodium berghei* ANKA. Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram tratadas com 250 µL do extrato liofilizado de *Agaricus blazei* (100 ou 800 mg/kg) ou Cloroquina (30 mg/kg), administrado por gavagem três dias antes da infecção e consecutivamente até o 7º dia após a infecção (dpi). Os animais foram infectados com  $10^5$  eritrócitos infectados por PbA em via intraperitoneal. Níveis cerebrais de IL-10 (A) e TGF-β (B) foram medidos no 5º dia após a infecção e expressos pela média ± DP. Foi feita a análise estatística da produção de citocinas como nos tratamentos anteriores.

A **Figura 23** mostra as análises histológicas de cortes cerebrais corados com H&E de camundongos não infectados (**Figura 23 A**), infectados por PbA (**Figura 23 B**), tratados com Cloroquina (**Figura 23 C**) e tratados com 100 e 800 mg/kg de fração C de *Agaricus blazei* (**Figura 23 D e E**) no 5º dia após a infecção. Pode-se evidenciar: córtex cerebral com aspecto histológico normal, contendo neurônios sadios (A), córtex cerebral com área de necrose (seta), intenso foco hemorrágico e neurônios hipercromáticos e condensados ao redor (asteriscos) (B), típicos da infecção; vaso apresentando acúmulo moderado de hemácias; hemorragia moderada (seta) (C); neurônios com aspecto normal na região cortical do encéfalo (D e E) que demonstram a proteção da fração C contra danos cerebrais típicos da malária grave.

O número de casos de malária grave vem crescendo e, uma das causas para isto, é a provável resistência do parasita às drogas antimaláricas comumente usadas (DE SOUZA e RILEY, 2002). O extrato de AbM e uma de suas frações isoladas mostraram-se capazes de reduzir a parasitemia *in vivo* e atenuar parte dos sintomas da doença sendo capazes ainda de evitar o desenvolvimento da malária cerebral, uma das formas graves da doença. Desta forma, o uso das composições farmacêuticas descritas na presente invenção mostrou-se extremamente relevante no tratamento da malária.

## REIVINDICAÇÕES

1. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMALÁRICA**, caracterizada por compreender extrato aquoso e/ou lyophilizado de *Agaricus blazei* ou frações derivadas deste, associados ou não à cloroquina, e pelo menos um excipiente farmacêutica e farmacologicamente aceitável.
2. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMALÁRICA**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela fração ser preferencialmente a fração "C", que compreende compostos menores de 3 kDa.
3. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMALÁRICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada pela fração "C" apresentar 4,96% de compostos fenólicos, 56,86 % de carboidratos, 37,37 % de proteínas e 0,81% de flavonóides em 1 mg/mL de solução.
4. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMALÁRICA**, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizada pela fração "C" ter sido obtida da filtração do extrato aquoso de *Agaricus blazei* em um filtro seletivo para 3.000 Da.
5. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMALÁRICA**, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizada por ser veiculada preferencialmente em formas farmacêuticas selecionadas do grupo compreendendo emulsões, soluções, comprimidos e/ou cápsulas.
6. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMALÁRICA**, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizada por ser administrada pelas vias oral, intravenosa e/ou intraperitoneal.
7. **USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMALÁRICA**, de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado por ser para a preparação de medicamentos para prevenir a infecção ou tratar mamíferos já infectados por malária.

**Figuras****Figura 1**

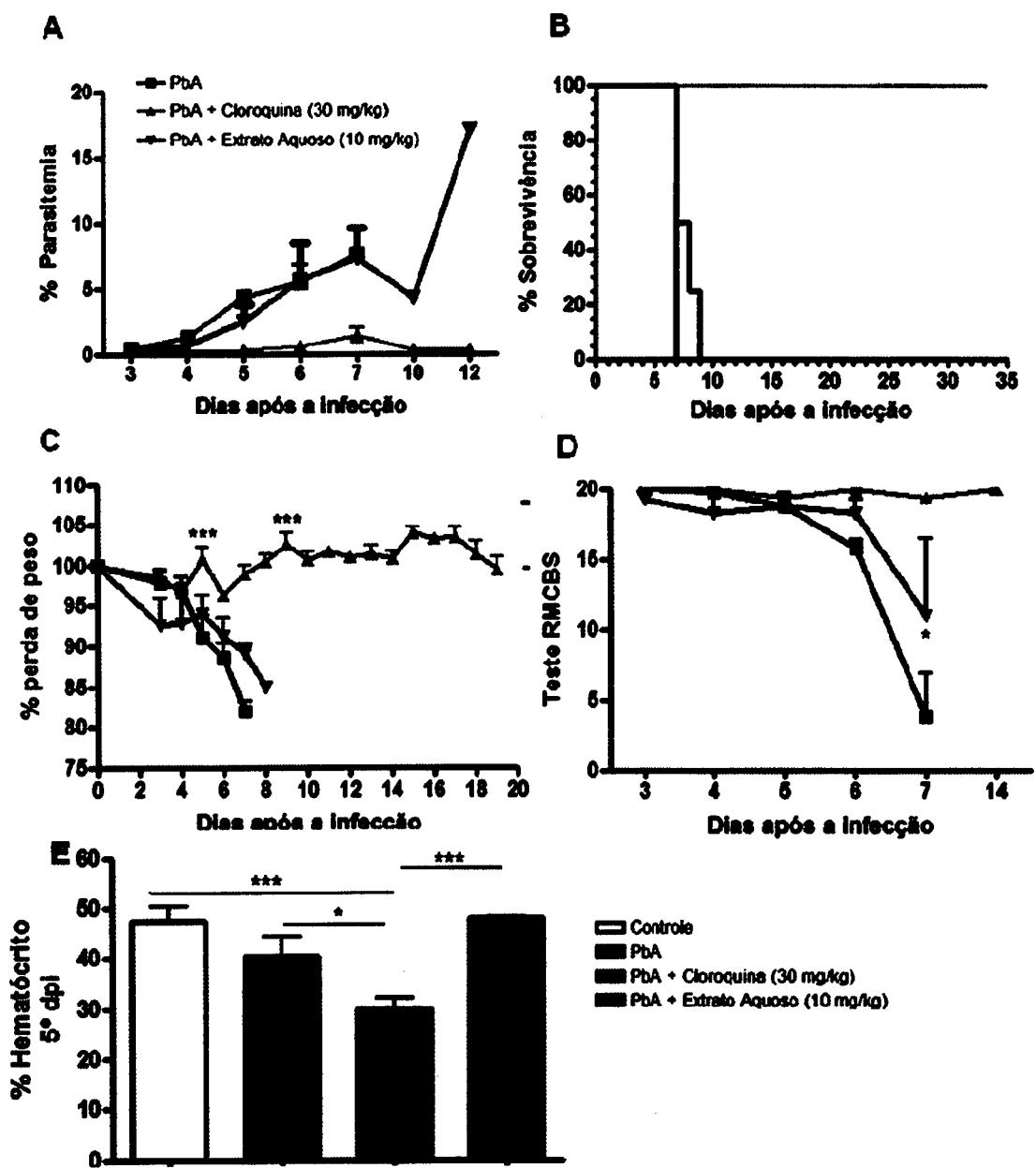


Figura 2

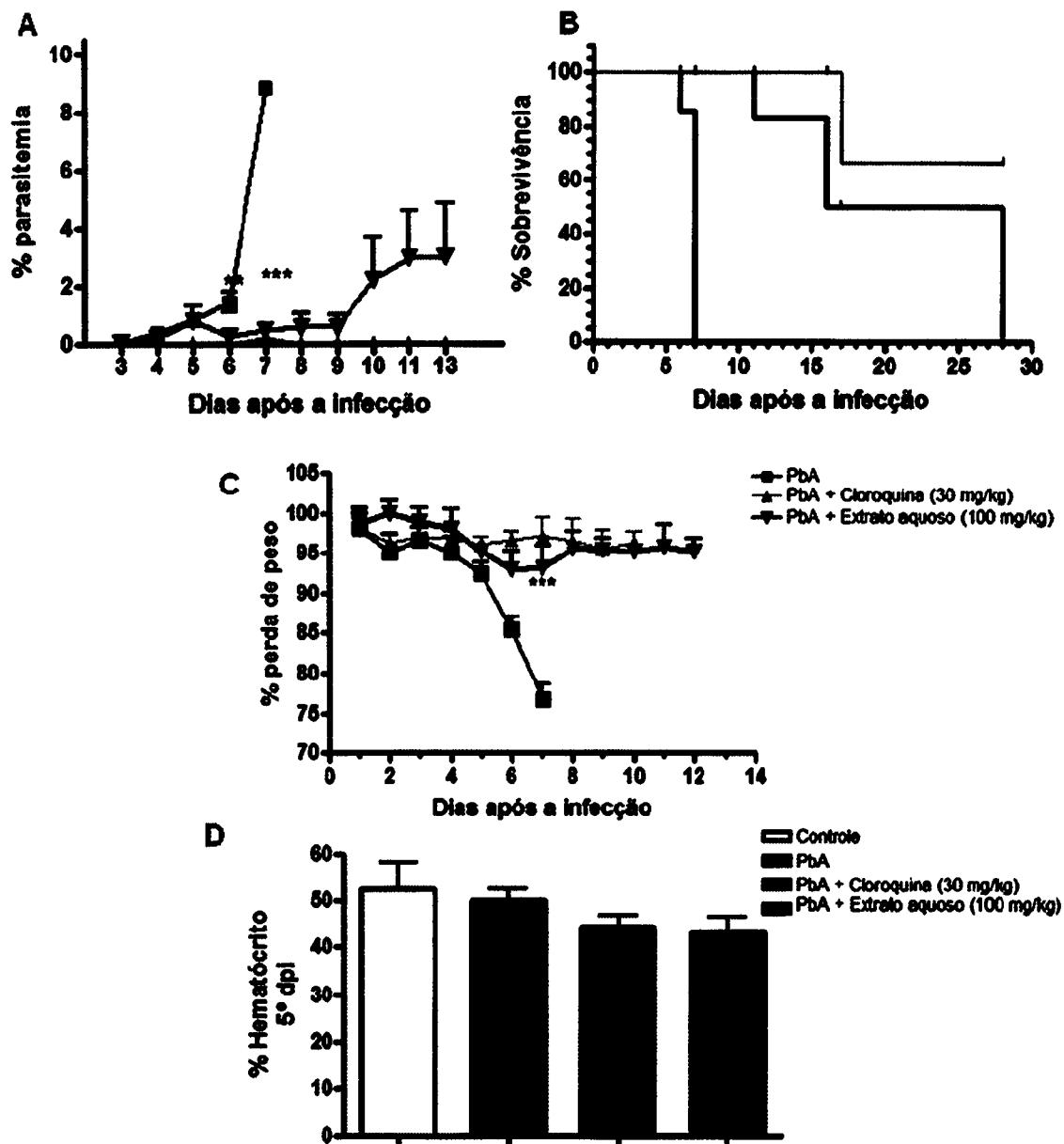


Figura 3

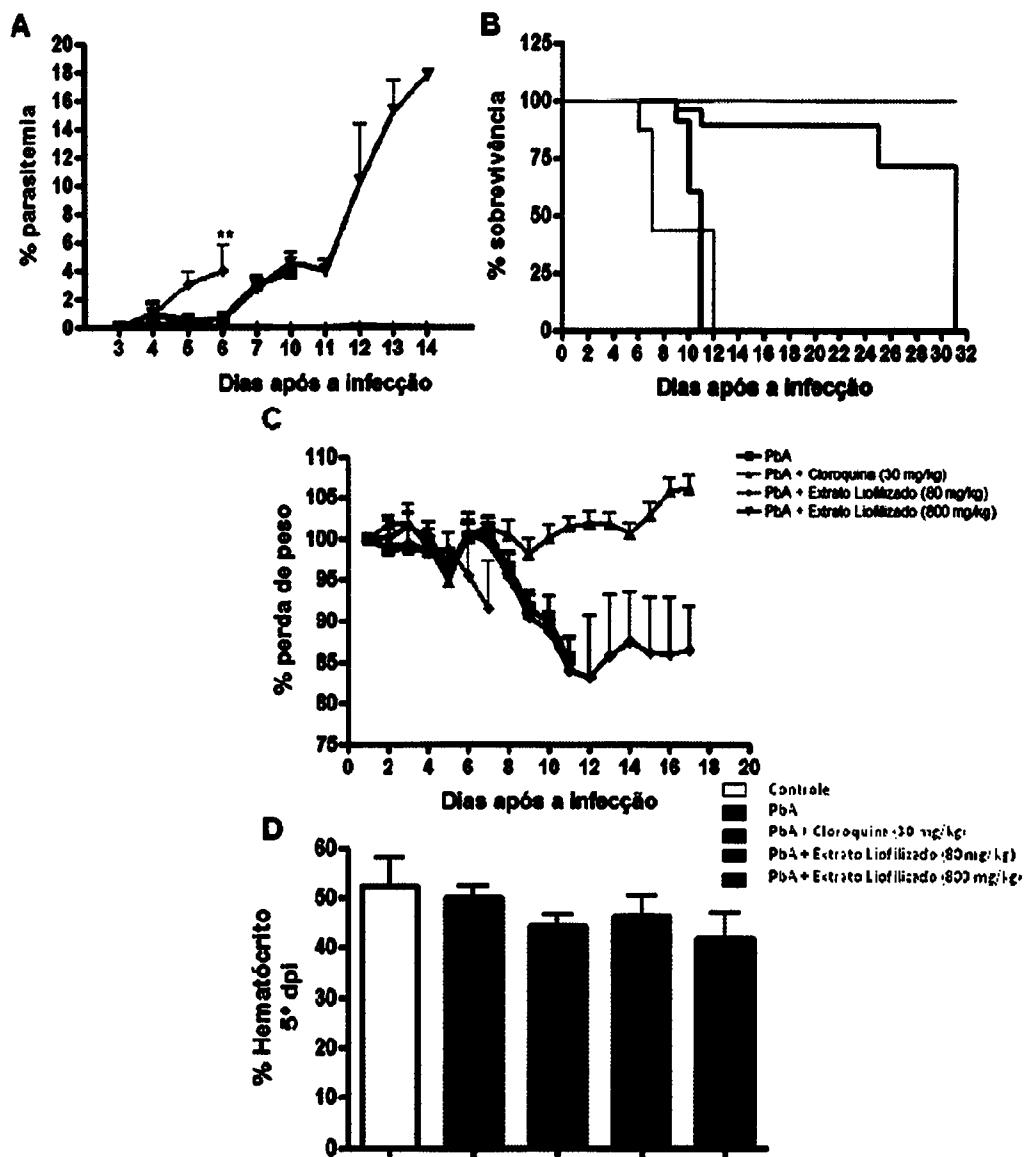
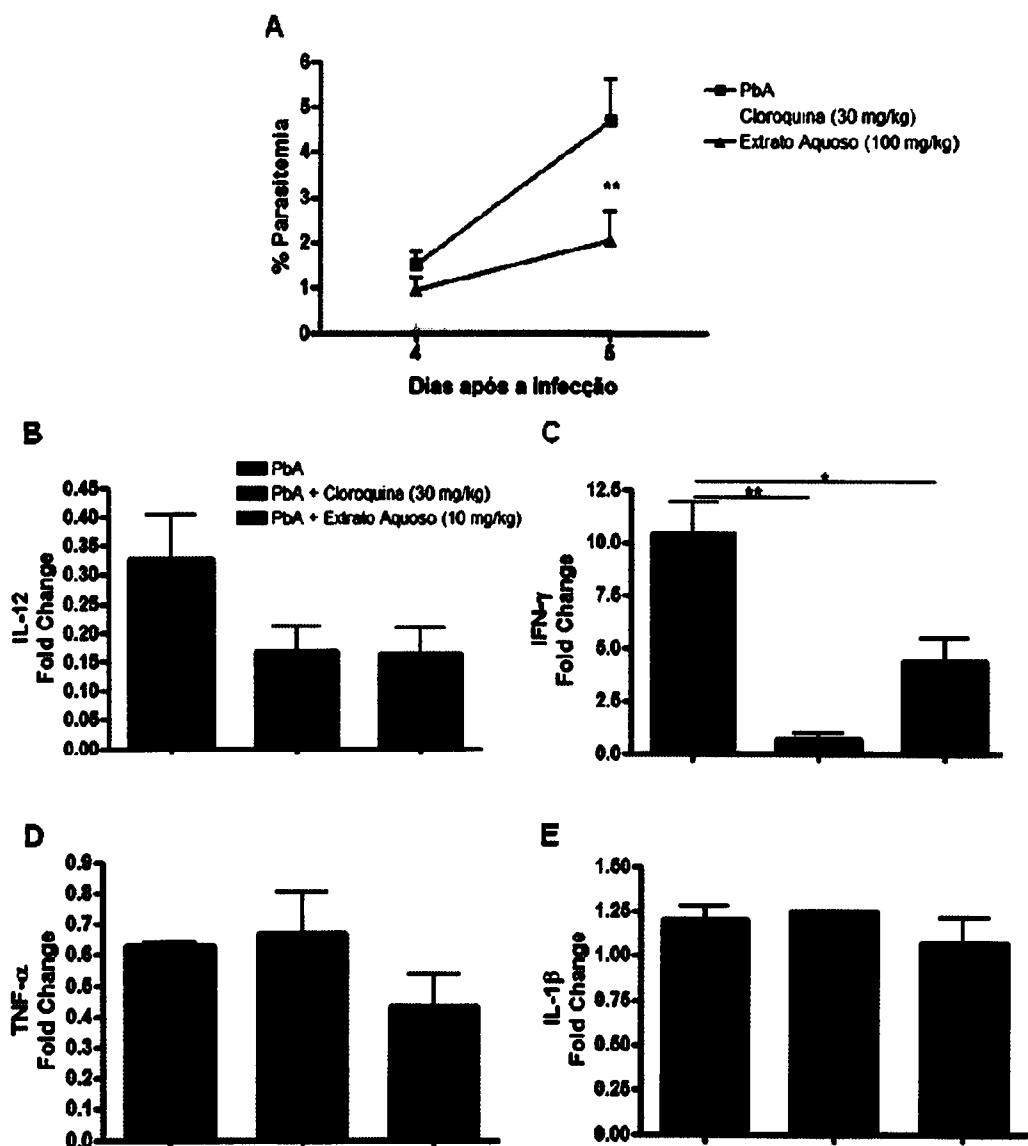
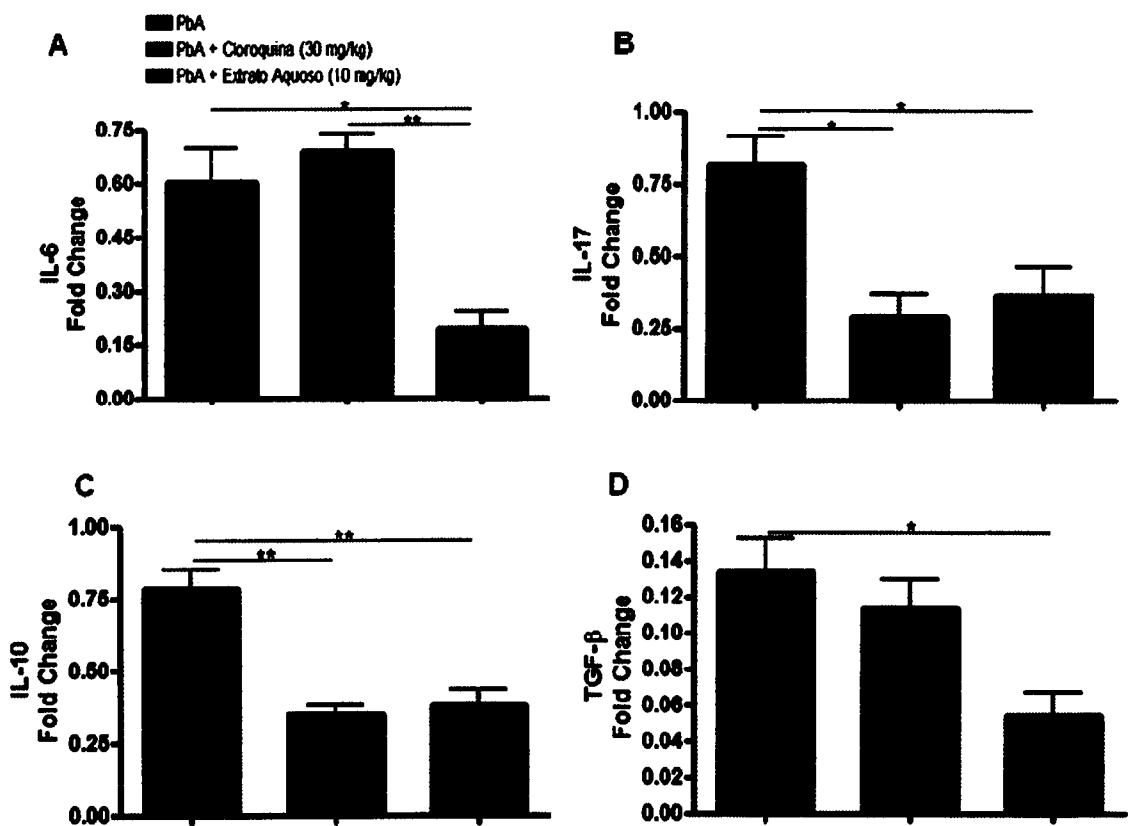
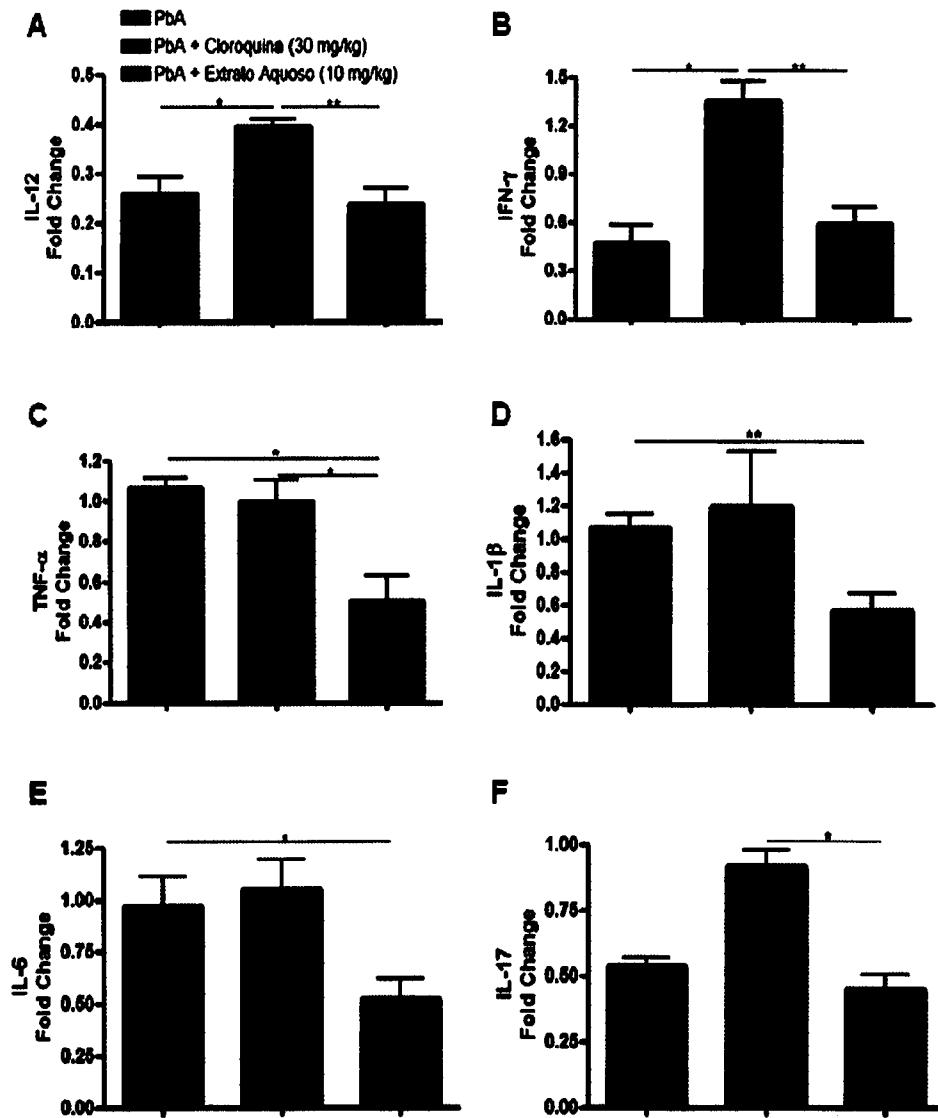


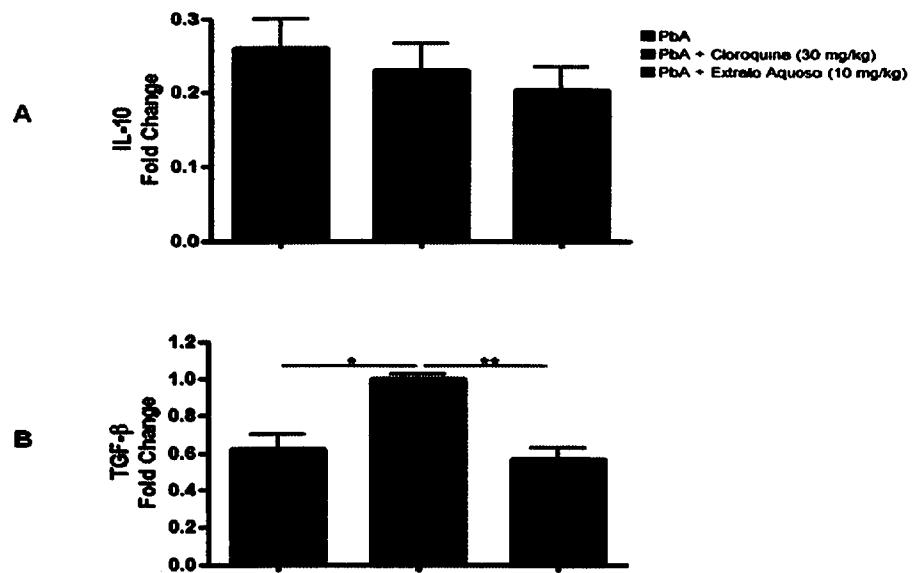
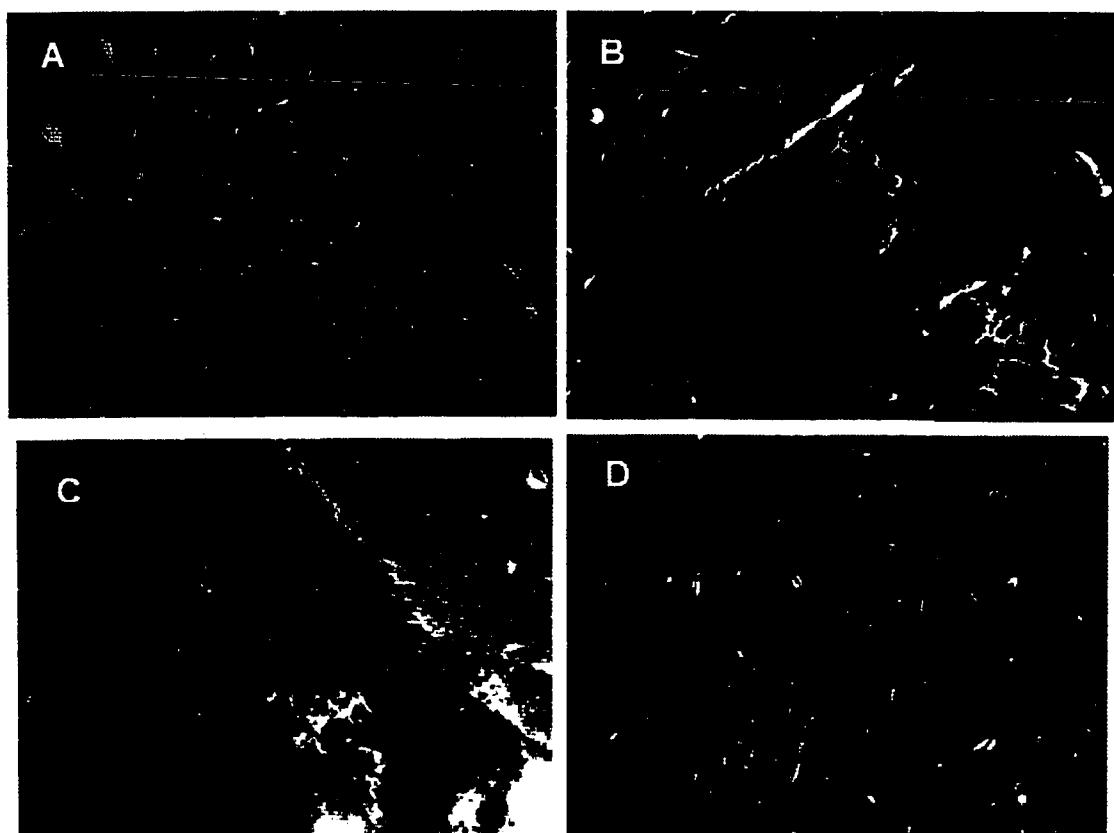
Figura 4

**Figura 5**



**Figura 6**

**Figura 7**

**Figura 8****Figura 9**

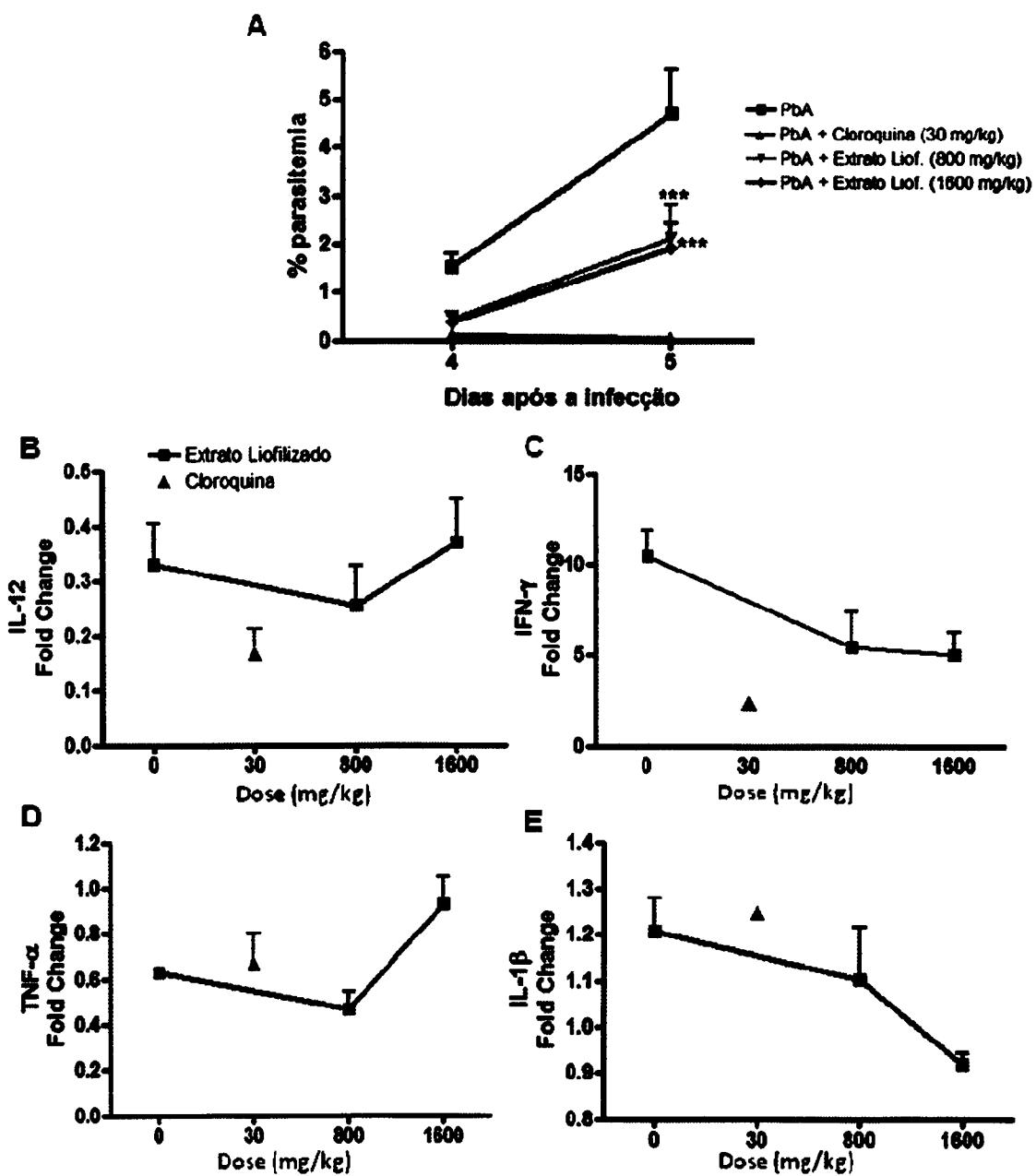


Figura 10

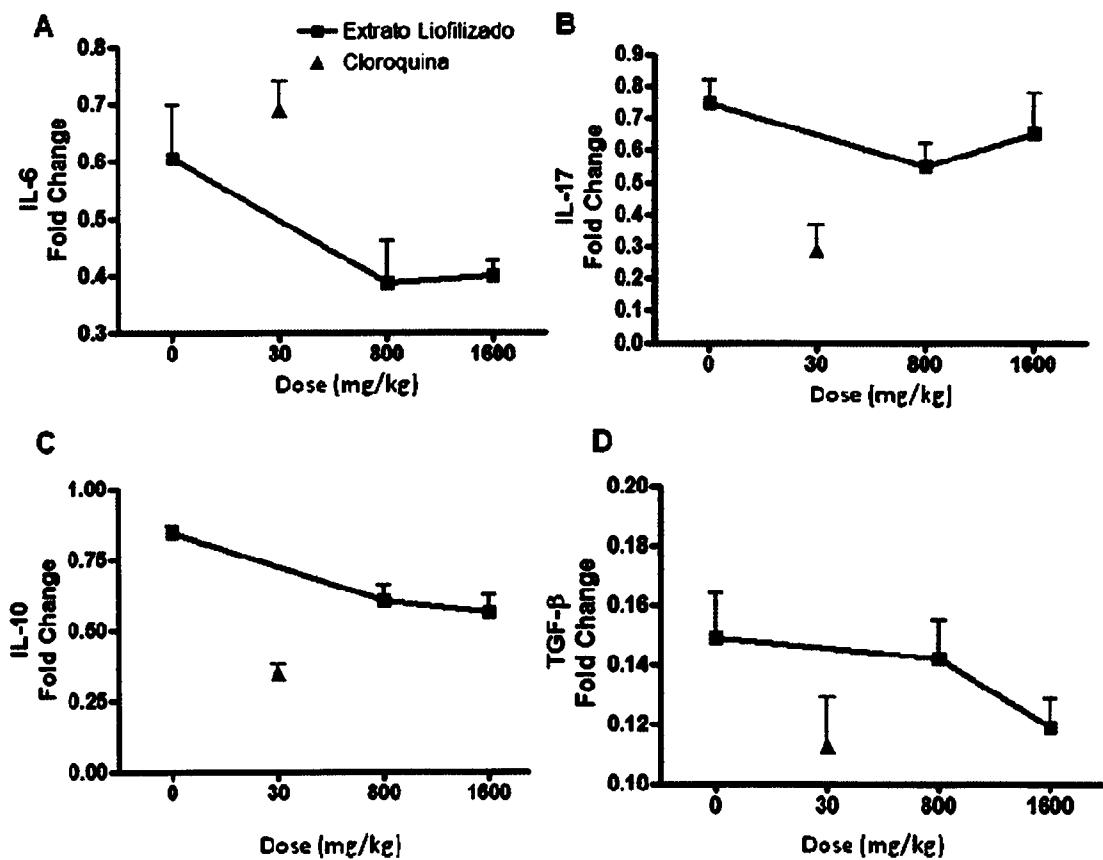


Figura 11

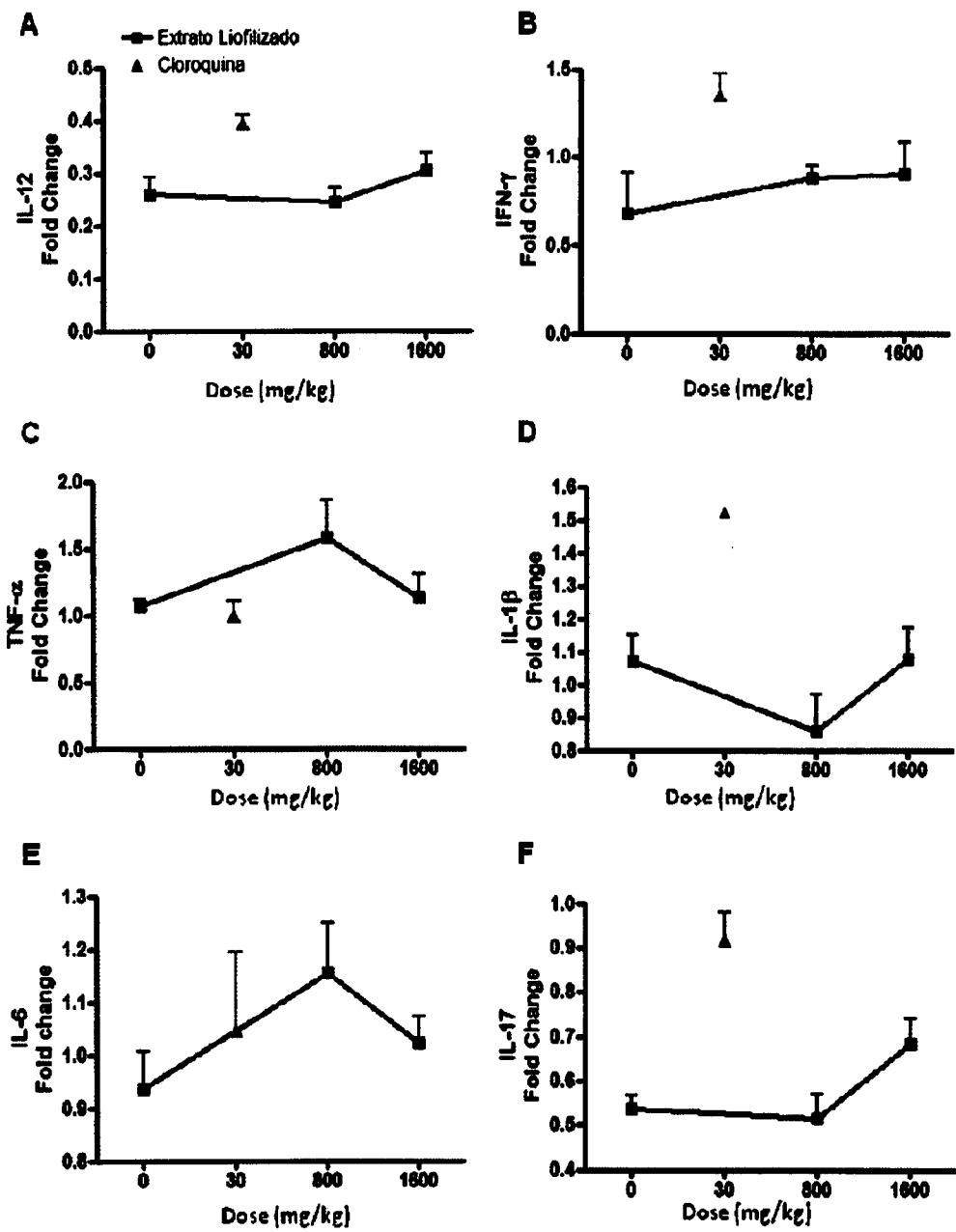


Figura 12

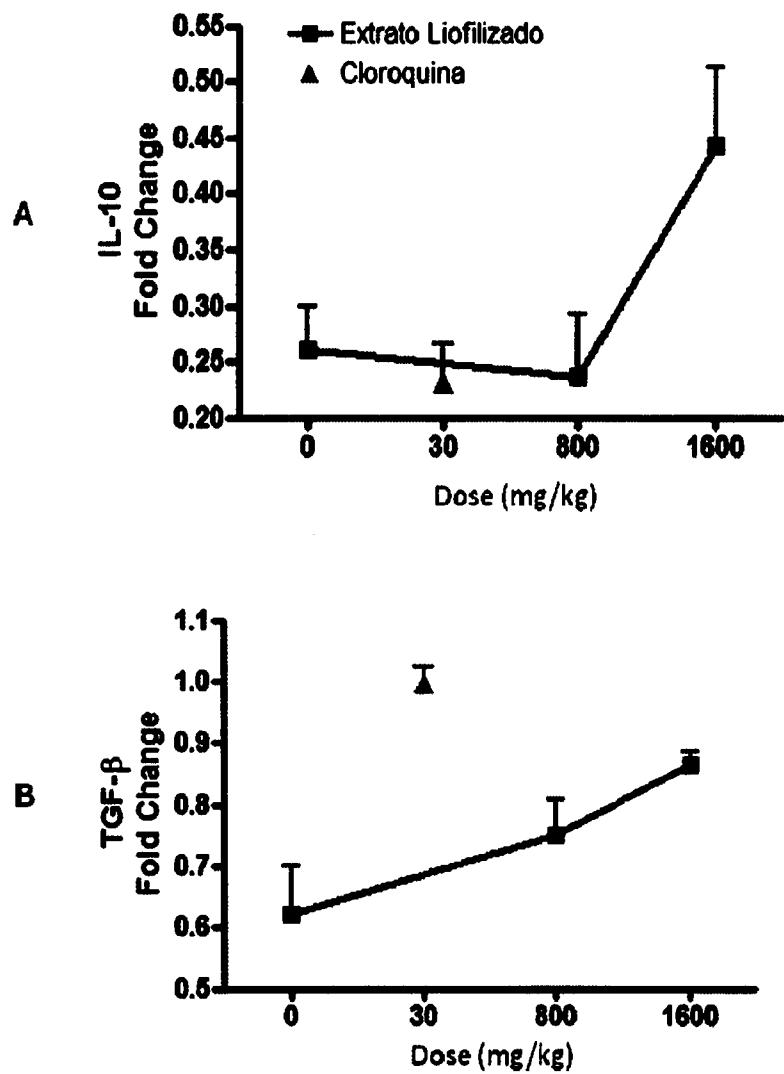
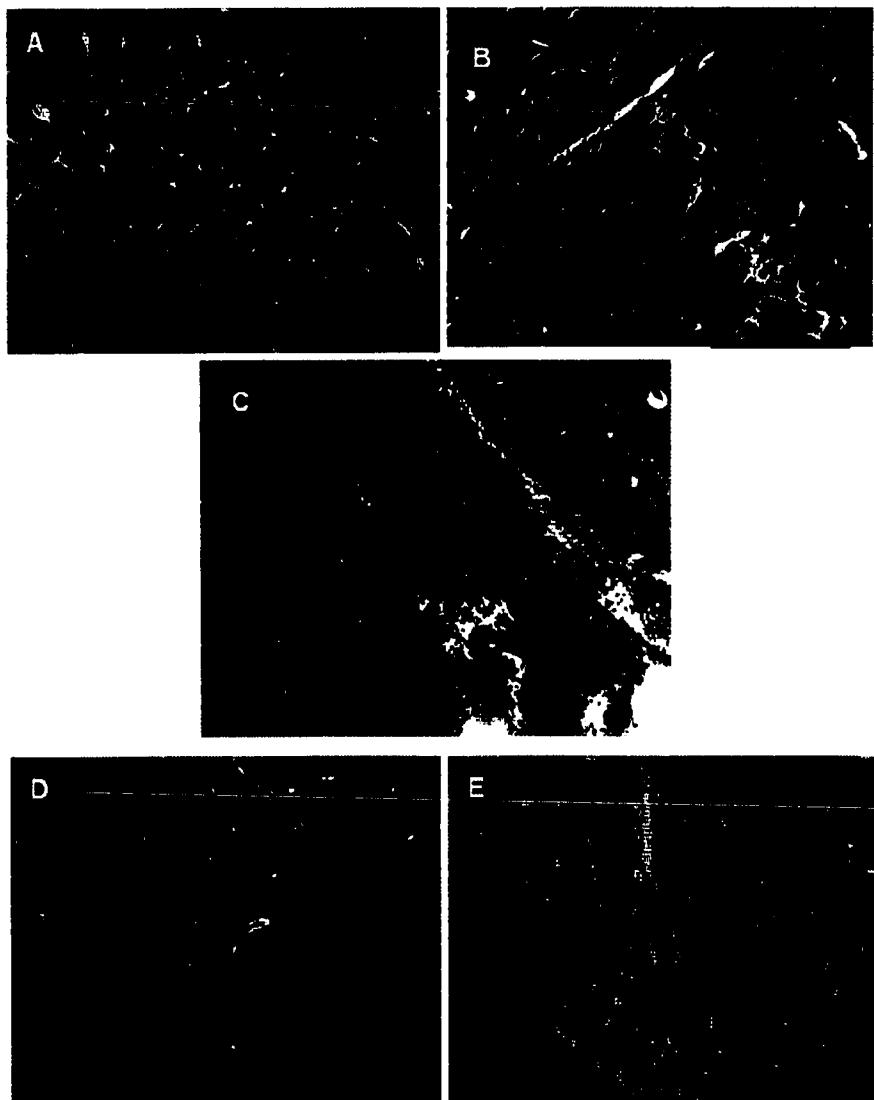
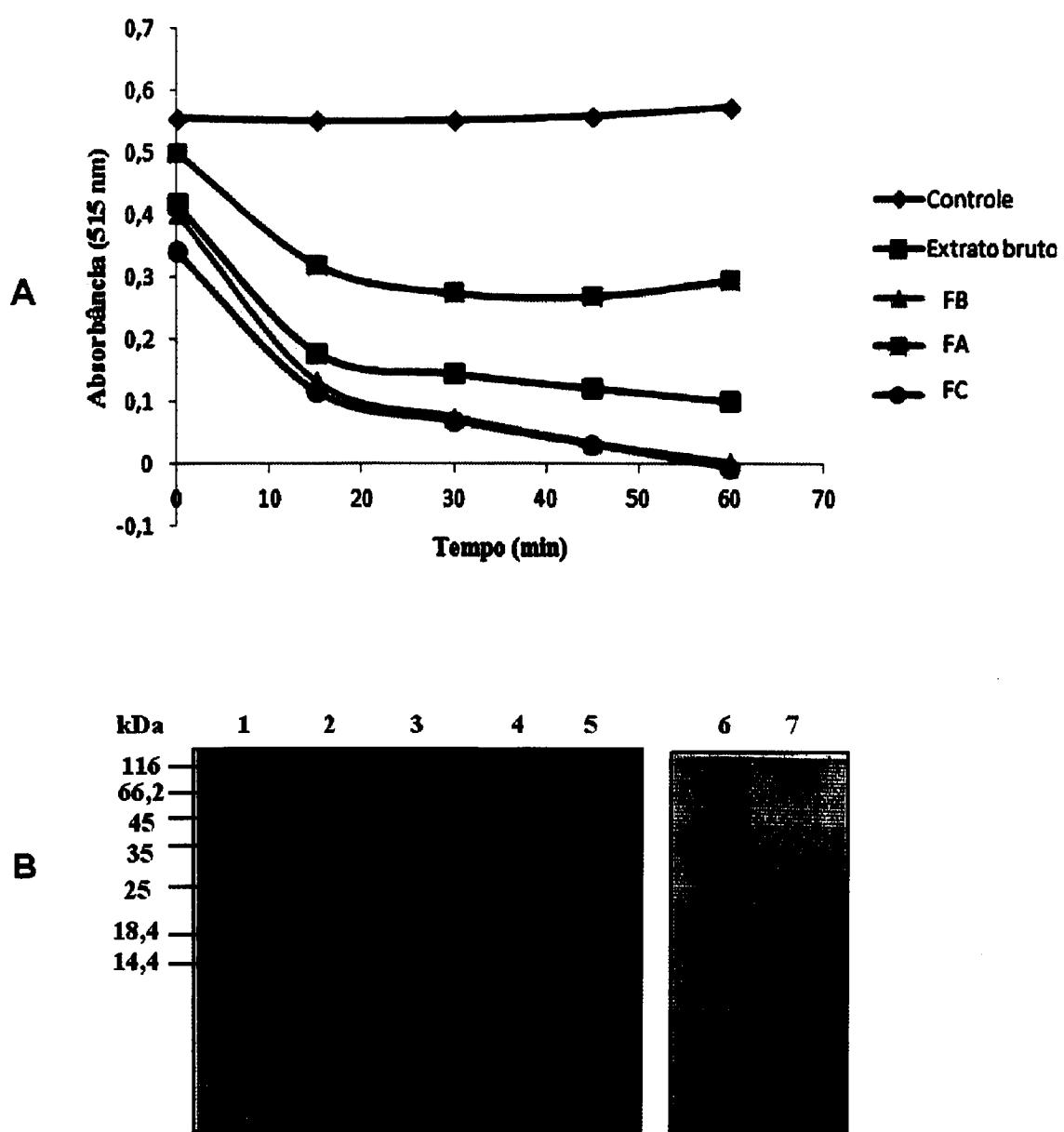


Figura 13



**Figura 14**

**Figura 15**

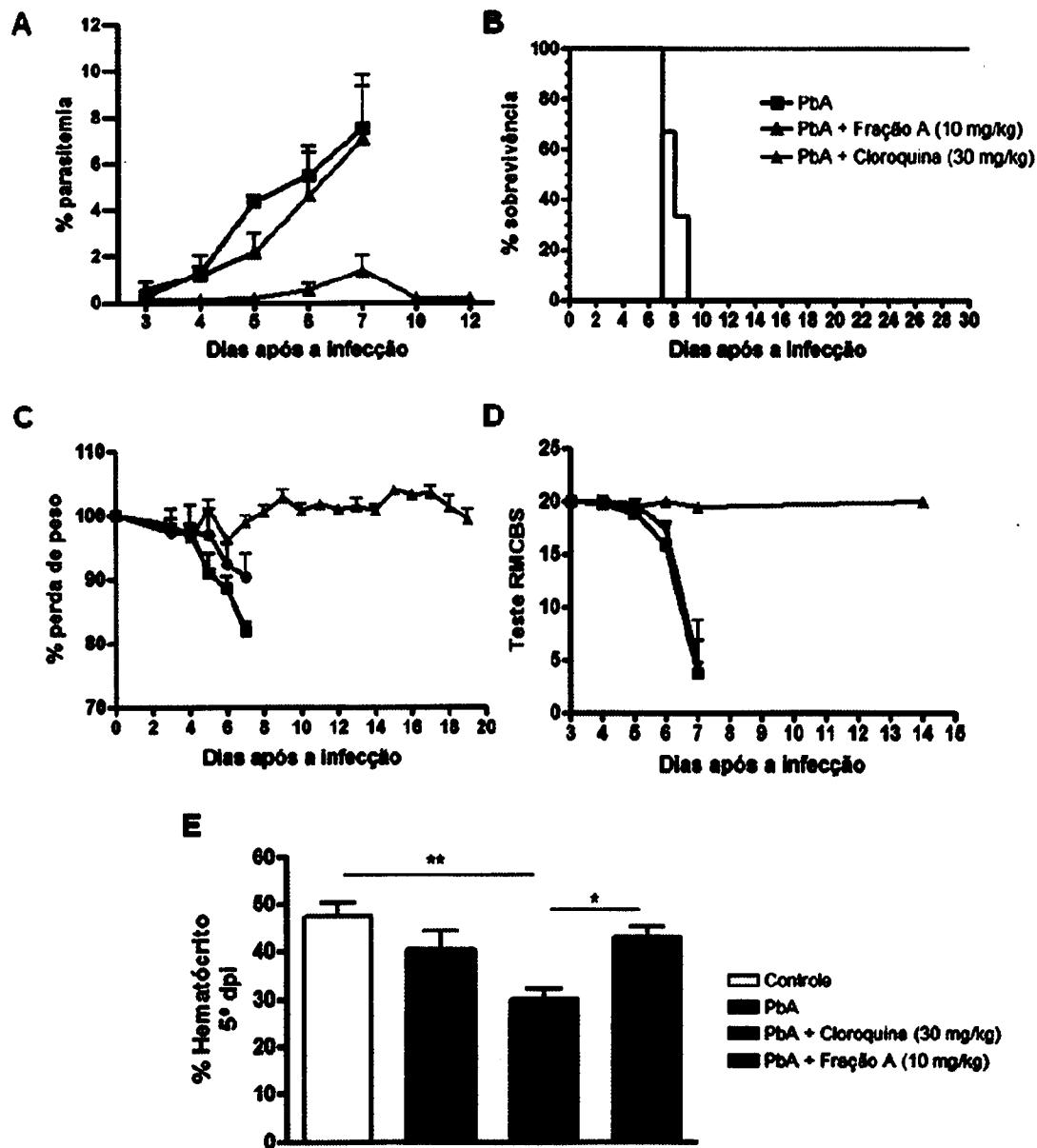


Figura 16

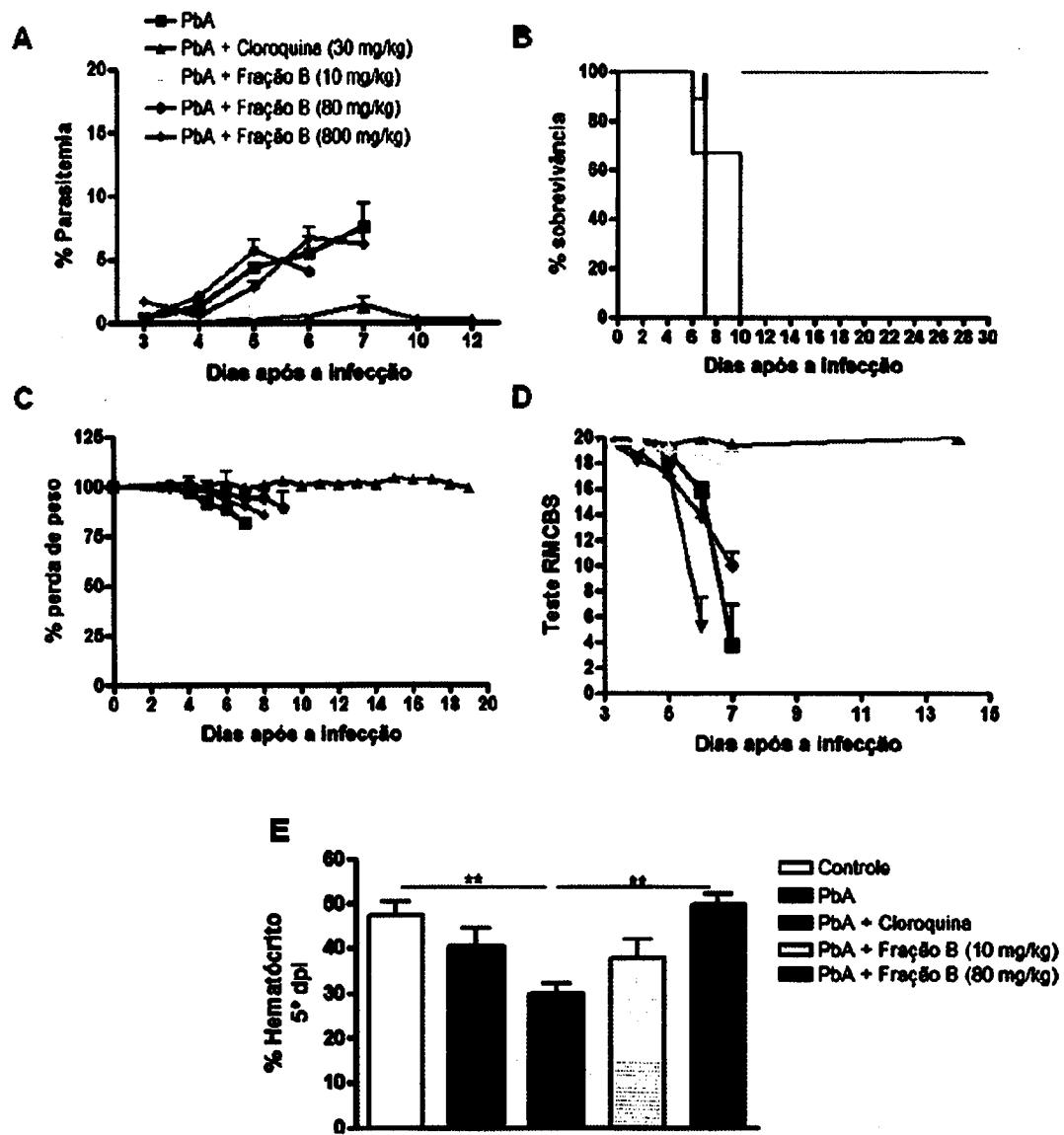


Figura 17

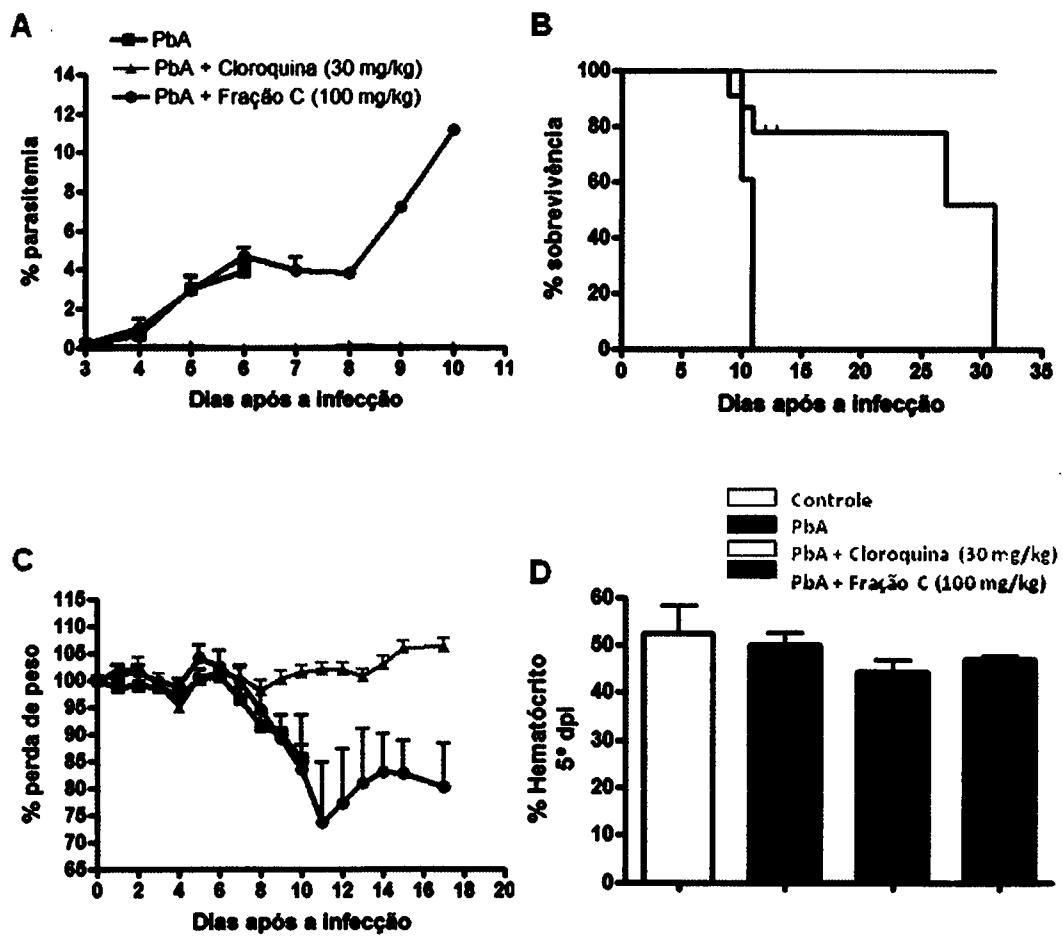


Figura 18

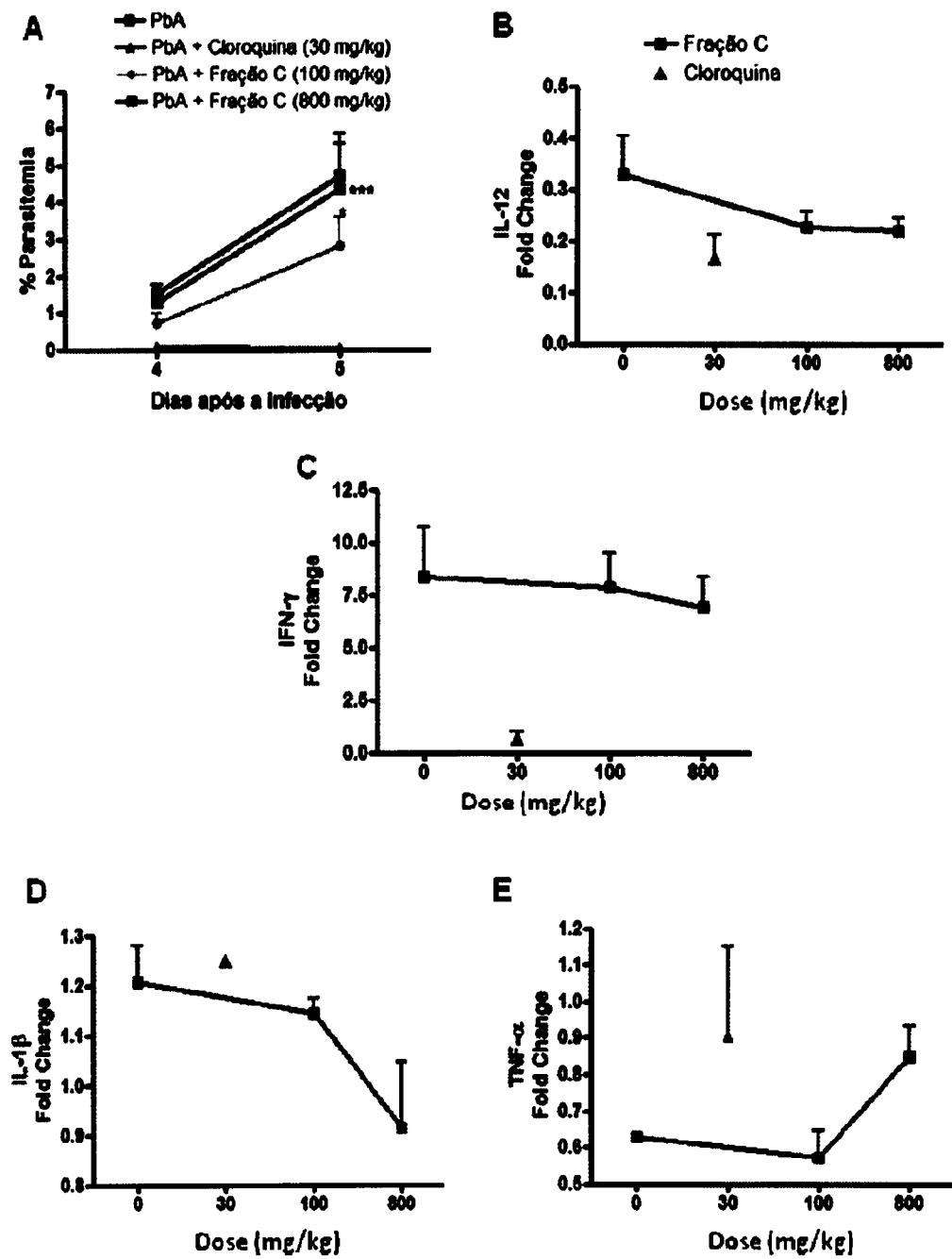
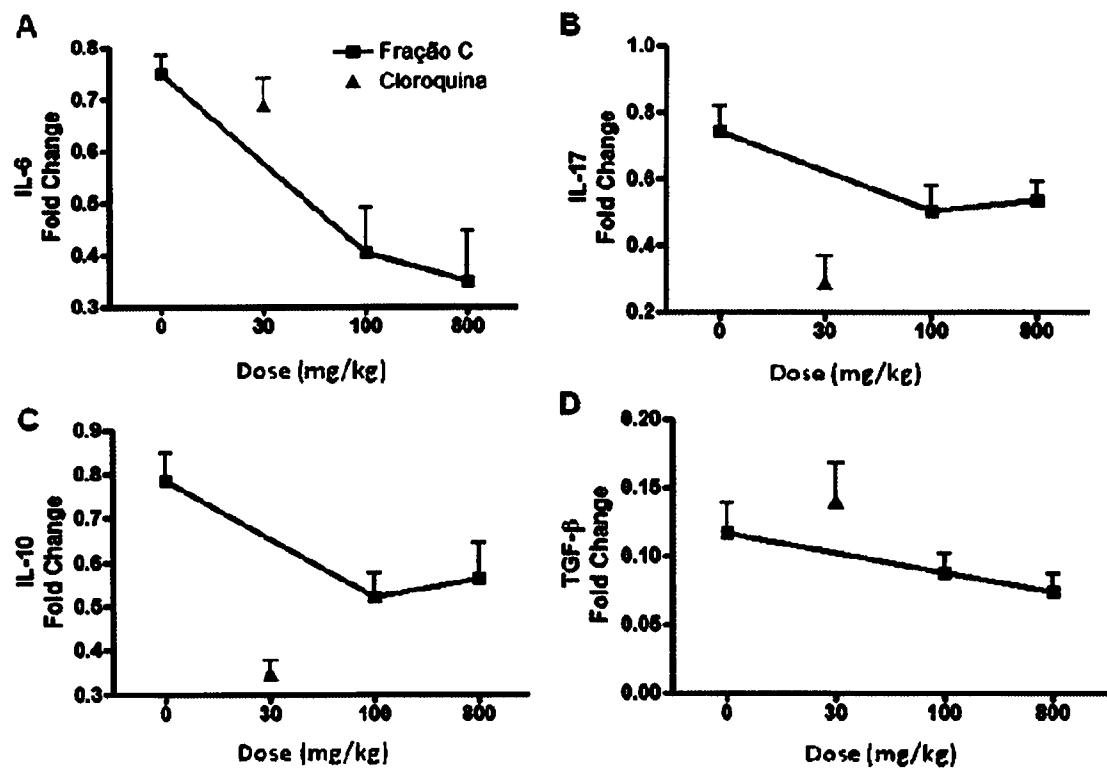
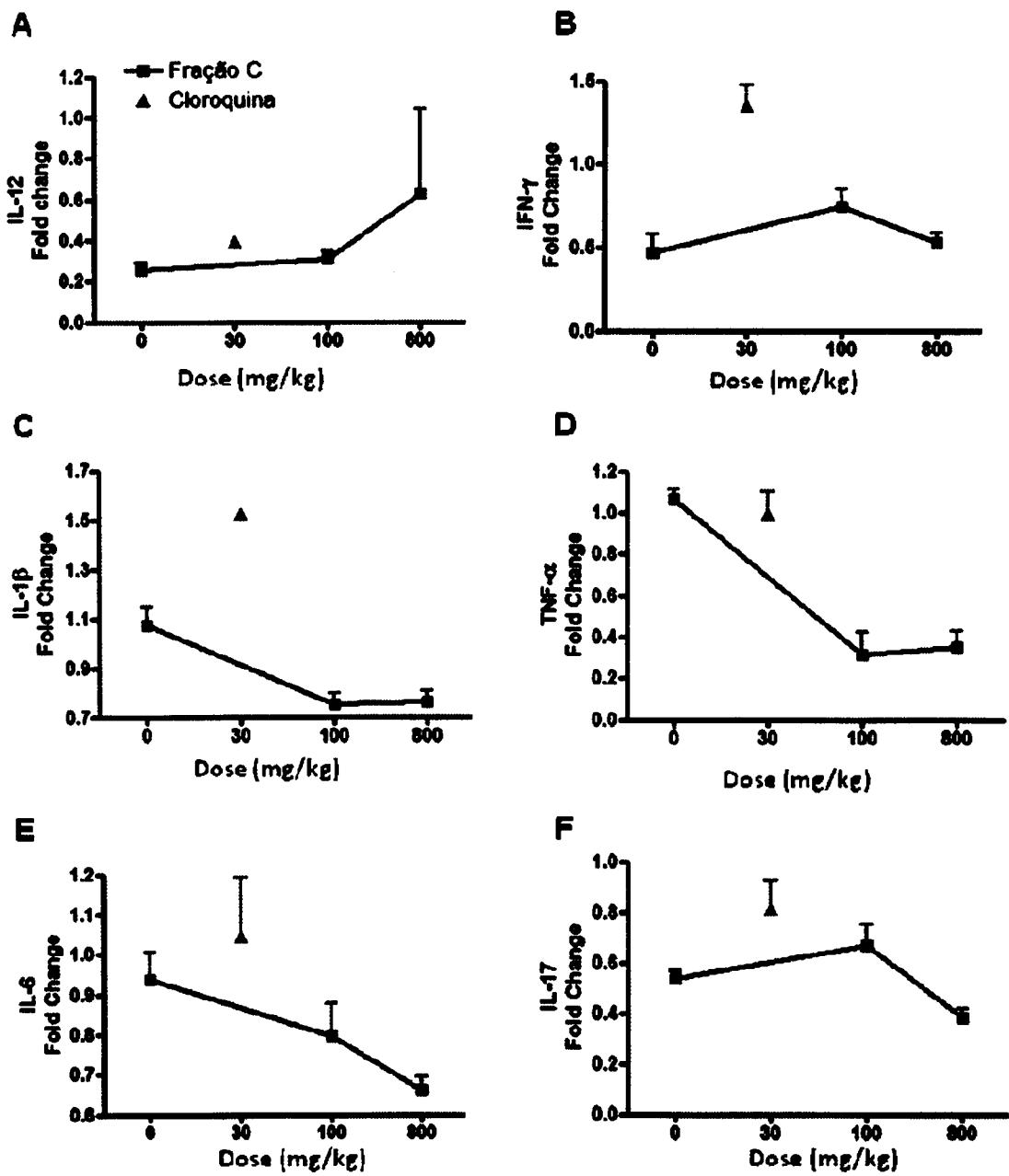


Figura 19



**Figura 20**

**Figura 21**

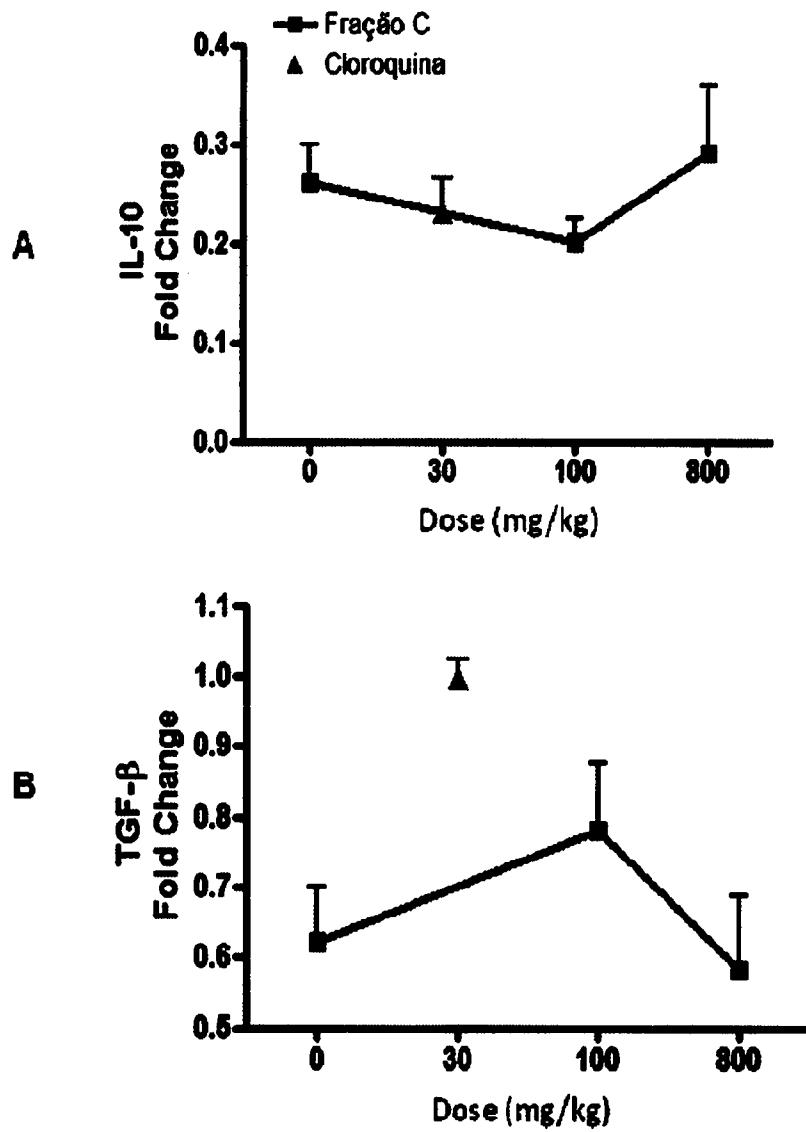
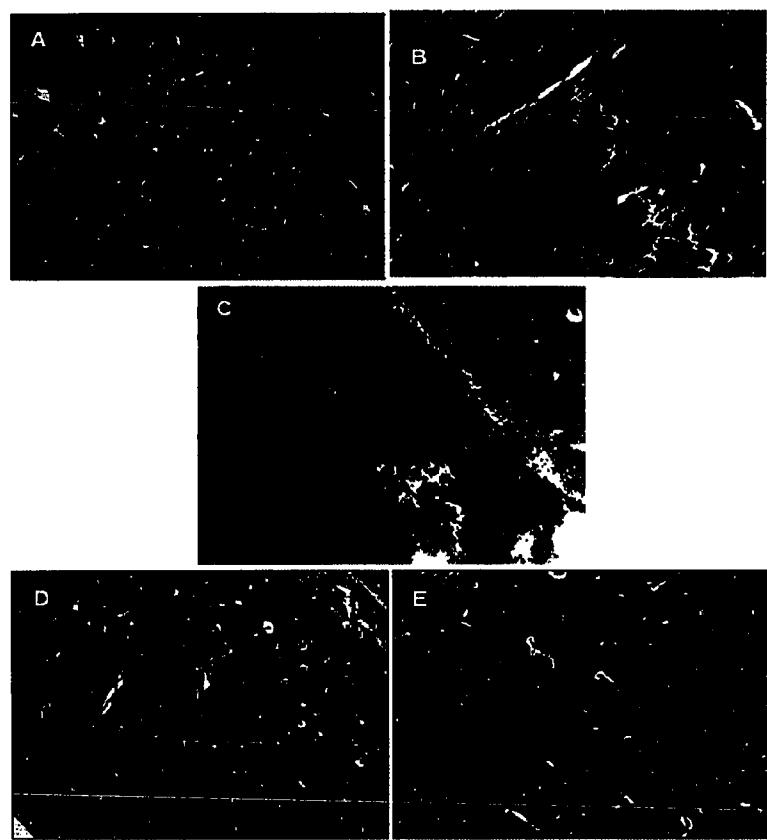


Figura 22

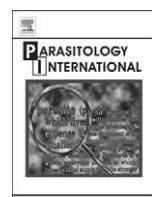


**Figura 23**

## **RESUMO**

### **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMALÁRICA E USO**

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de composições farmacêuticas, obtidas a partir do extrato aquoso e/ou liofilizado de *Agaricus blazei* e de suas frações, em associação ou não à cloroquina, para o tratamento da malária.



## Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species

Diogo G. Valadares <sup>a,1</sup>, Mariana C. Duarte <sup>b,1</sup>, Jamil S. Oliveira <sup>a</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli <sup>c</sup>, Vivian T. Martins <sup>a</sup>, Lourena E. Costa <sup>b</sup>, João Paulo V. Leite <sup>d</sup>, Marcelo M. Santoro <sup>a</sup>, William C.B. Régis <sup>e,f,2</sup>, Carlos A.P. Tavares <sup>a,2</sup>, Eduardo A.F. Coelho <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Patologia Clínica COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Minasfungi do Brasil LTDA, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>f</sup> Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 January 2011

Received in revised form 31 May 2011

Accepted 2 June 2011

Available online 24 June 2011

#### Keywords:

*Leishmania*

*Agaricus blazei* Murill mushroom

Leishmanicidal activity

Treatment

### ABSTRACT

Leishmaniasis is a major public health problem, and the alarming spread of parasite resistance underlines the importance of discovering new therapeutic products. The present study aims to investigate the *in vitro* leishmanicidal activity of an *Agaricus blazei* Murill mushroom extract as compared to different *Leishmania* species and stages. The water extract proved to be effective against promastigote and amastigote-like stages of *Leishmania amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*, with IC<sub>50</sub> (50% inhibitory concentration) values of 67.5, 65.8, and 56.8 µg/mL for promastigotes, and 115.4, 112.3, and 108.4 µg/mL for amastigotes-like respectively. The infectivity of the three *Leishmania* species before and after treatment with the water extract was analyzed, and it could be observed that 82%, 57%, and 73% of the macrophages were infected with *L. amazonensis*, *L. major*, and *L. chagasi*, respectively. However, when parasites were pre-incubated with the water extract, and later used to infect macrophages, they were able to infect only 12.7%, 24.5%, and 19.7% of the phagocytic cells for *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*, respectively. In other experiments, macrophages were infected with *L. amazonensis*, *L. chagasi*, or *L. major*, and later treated with the aforementioned extract, presented reductions of 84.4%, 79.6%, and 85.3% in the parasite burden after treatment. A confocal microscopy revealed the loss of the viability of the parasites within the infected macrophages after treatment with the water extract. The applied extract presented a low cytotoxicity in murine macrophages and a null hemolytic activity in type O<sup>+</sup> human red blood cells. No nitric oxide (NO) production, nor inducible nitric oxide synthase expression, could be observed in macrophages after stimulation with the water extract, suggesting that biological activity may be due to direct mechanisms other than macrophage activation by means of NO production. In conclusion, the results demonstrate that the *A. blazei* Murill water extract can potentially be used as a therapeutic alternative on its own, or in association with other drugs, to treat Visceral and Cutaneous Leishmaniasis.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Protozoan parasites of the *Leishmania* genus are the etiological agents of a vector-borne disease that has presented high morbidity and mortality throughout the world. Leishmaniasis has affected around 12 million people and is present in 88 countries, mainly in tropical and subtropical areas. The approximately 2 million new cases per year and the nearly 350 million people living in endemic regions reveal the importance of this neglected disease [1,2].

Historically, chemotherapy to treat leishmaniasis has been based on the use of pentavalent antimonial drugs. One of the available anti-leishmanial drugs, meglumine antimoniate (Glucantime®), is clinically unsatisfactory, once that it is not very effective and may have severe side effects. Furthermore, a high number of relapses of the disease have been described [3,4]. Pentamidine, another anti-leishmanial drug, is unsuitable as a first line treatment due to its toxicity. Amphotericin B and its liposomal formulation are effective, though such drugs are expensive and their use requires hospitalization. Reported clinical results using oral miltefosine treatment are encouraging; however, this drug is linked to potential teratogenicity and should not be given to pregnant women or to those of childbearing age [5]. The number of reported VL cases is increasing. Moreover, VL has emerged as an opportunistic infection in human immunodeficiency virus-infected (HIV) patients [6]. Therefore, the development of cost-effective alternative therapeutic strategies has become a high-priority.

\* Corresponding author at: Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo de Doenças Parásitárias, Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 31.270-901. Tel./fax: +55 31 3409 4983.

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F. Coelho).

<sup>1,2</sup> These authors contributed equally to this work.

Prior research has been carried out concerning natural products and their biological effects, such as fungicidal, antimicrobial, antimalarial, antimycobacterial, and antiviral activities. However, only a few studies have investigated the biological potential of Brazilian mushrooms. *Agaricus blazei* Murill is a commonly found mushroom in Brazil. Its use has been associated with folk medicine in the treatment of some diseases, including diabetes mellitus and arterial hypertension [7–13]. This mushroom presents compounds, such as  $\beta$ -D-glucans, glycoproteins, cerebrosides, polysaccharides, steroids, ergosterol, and graxs acids, which can activate and/or modulate the immune response of the hosts [14–17].

The present study assessed the *in vitro* leishmanicidal activity of an *A. blazei* Murill water extract against *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major* promastigote and amastigote-like stages. Studies were extended to establish their minimum inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ), leishmanicidal effects on intra-macrophages *Leishmania* stages, nitric oxide (NO) production, inducible nitric oxide syntase (iNOS) expression, as well as their cytotoxic effects on murine macrophages and human red blood cells.

## 2. Material and methods

### 2.1. *A. blazei* Murill water extract

The *A. blazei* Murill water extract was prepared by macerating 50 g of fresh mushrooms in 50 mL of sterile milli-Q water using a Waring-Blendor homogenizer. Next, the macerated mixture was centrifuged at 10,000  $\times$  g for 20 min at 4 °C (Sorval, LC5C model). The supernatant was then sterilized by passing through a 0.22  $\mu$ m membrane in a laminar flow hood under sterile conditions and stored at –20 °C, until use. This procedure has been patented at the Federal University of Minas Gerais (UFMG) (PI 014100001550/CTI&T).

### 2.2. Parasites and mice

*Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8), *L. chagasi* (MHOM/BR/1970/BH46), and *L. major* (MHOM/IL/1980/Friedlin) were used in this study. Parasites were grown at 24 °C in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO, USA), supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, at a 7.4 pH [18]. Stationary-phase promastigote and amastigote-like of *Leishmania* used in this work were prepared as described [19]. Murine macrophages were collected from peritoneal cavities of female BALB/c mice (6-weeks old), which were purchased from Institute of Biological Sciences of UFMG. The Animal Use Committee of the UFMG approved experimental protocols.

### 2.3. Leishmanicidal *in vitro* activity

Inhibition of cell growth was assessed *in vitro* by cultivating promastigote and amastigote-like ( $4 \times 10^5$ , each one) of *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major* in the presence of different individual concentrations (25 to 200  $\mu$ g/mL) of an *A. blazei* Murill water extract in 96-well culture plates (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA), for 48 h at 24 °C. Amphotericin B was used as a positive control (10  $\mu$ g/mL). Cell viability was assessed by measuring the cleavage of 2 mg/mL of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma). Absorbances were measured by using a multi-well scanning spectrophotometer (LABTRADE, model 660) at a wavelength of 570 nm. Analyses were performed in triplicate, and results were expressed as the mean percentage reduction of the parasites compared to non-treated control wells. The 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was determined by applying the sigmoidal regression of the concentration-response curves. Data shown are representative of three different experiments, performed in triplicate, which presented similar results.

### 2.4. Chemical characterization of the *A. blazei* Murill water extract

Chemical analysis of the water extract was performed on chromatography plates coated with silica gel GF 254® (Merck, Darmstadt, Germany) for the detection of tannins, coumarins, flavonoids, anthraquinones, triterpenes, steroids, saponins, cardiotonic glycosides, and alkaloids. Different mobile phases and detection reagents were used in accordance with the protocol described by Wagner et al. [20]. Proteins were detected in SDS-PAGE 10% gels by silver staining, while glycoproteins presence were demonstrated in SDS-PAGE 10% stained by periodic acid Schiff. The presence of carbohydrates was investigated using a phenol-sulphuric acid method [21].

### 2.5. Inhibition of infection in phagocytic cells

The inhibitory effect of the *A. blazei* Murill water extract on the *Leishmania* invasion of macrophages was evaluated in promastigotes of *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*. Parasites were pre-incubated with the water extract (25  $\mu$ g/mL), for 1 h at 24 °C. Next, cells were washed three times with RPMI 1640 medium and further incubated for 4 h with murine macrophages at a ratio of 10 *Leishmanias* per 1 macrophage. After, cells were again washed, set, and stained, to determine the percentages of infected macrophages by counting 100 cells in triplicate. Additionally, an optical microscopy was used to view the *Leishmania* infection profiles within the murine macrophages.

### 2.6. Treatment of infected macrophages

Macrophages were plated on round glass coverslips inside the wells of a 24-well culture plate at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells per coverslip in an RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, at a 7.4 pH. After 2 h of incubation at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>, promastigotes of *L. chagasi*, *L. major*, and *L. amazonensis*  $5 \times 10^6$  were added to the wells and the cultures were incubated for 4 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Next, free parasites were removed by extensive washing with an RPMI 1640 medium, and infected macrophages were treated for 48 h with the *A. blazei* Murill water extract (50  $\mu$ g/mL). Cells were washed in RPMI 1640 and incubated with 4% paraformaldehyde for 15 min, at which time they were treated with 70% ethanol in an ice-bath for 4 h, and again washed three times with sterile PBS. The percentage of the inhibition of *Leishmania* intra-macrophages viability was determined by counting 100 cells in triplicate and comparing this to the infected and non-treated cells. Additionally, a confocal microscopy was performed to view the inhibition of *Leishmania* viability within intra-macrophages. For this, an RNaseA solution was added (200  $\mu$ g/mL), and incubation occurred for 30 min at 37 °C, after which time, a solution comprised of 370  $\mu$ L of 0.1 M HCl in 148  $\mu$ L of PBS 1× was added per well. After 45 s, 1.5 mL of an acridine orange solution (3  $\mu$ g/mL, pH 5.0) was added and incubation occurred for 5 min, at which time the cells were analyzed. Data shown are representative of three separate experiments, performed in triplicate, which presented similar results.

### 2.7. Nitric oxide (NO) production and iNOS Western blot

To visualize the macrophage activation via NO production after treatment with an *A. blazei* Murill water extract, cells ( $4 \times 10^5$ ) were incubated alone in an RPMI 1640 medium (background control) or separately stimulated with the water extract (50  $\mu$ g/mL) or concanavalin A (ConA; 5  $\mu$ g/mL), at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 24, 48, and 72 h. Following incubation, 100  $\mu$ L of culture supernatant was mixed with an equal volume of Griess reagent (Sigma). After an incubation of 30 min at room temperature, nitrite concentration was calculated using a standard curve of known concentrations. Data were expressed as  $\mu$ M per  $4 \times 10^5$  cells. Data shown are representative of three different experiments, performed in triplicate, which presented similar results.

After separation of the supernatants, and in order to detect iNOS expression, cells were lysed in an ice-cold lyses buffer (100 mM Tris; pH 8.0; 2 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% Triton X-100), which was supplemented by a complete proteases inhibitors cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Lysates were centrifuged at 14,000 × g for 10 min at 4 °C, and the protein concentration was determined using the DC Protein Assay Reagents Package (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), employing bovine serum albumin (BSA) as a standard. The proteic extract (20 µg) was analyzed by means of a SDS-PAGE 10% gel, and proteins were transferred onto cellulose membranes using a semi-dry electroblotting apparatus (Locus Biotechnology). The membranes were blocked with a 5% BSA in Tris Saline-Tween 20 0.05% (TBS-T: 10 mM Tris-HCl; pH 7.4; 0.15 M NaCl; 0.05% Tween 20 0.05%), for 2 h at room temperature. Blots were incubated with 1:1,000 monoclonal anti-mouse iNOS (123 kDa) and beta-actin (45 kDa) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) overnight, under constant shaking, at 4 °C. After having been washed 5 times with TBS-T, membranes were incubated using an anti-mouse IgG goat antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, dilution 1:1,000 diluted in 1% non-fat dry milk) for 2 h at room temperature. After having been washed 7 times with TBS-T, blots were developed using chloronaphthol (12.5 mg), diaminobenzidine (25 mg), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vol (20 µL), for 30 min, and the reaction development was ended by adding distilled water.

## 2.8. Cytotoxicity and hemolytic activity

Cytotoxicity was evaluated by cultivating macrophages ( $4 \times 10^5$ ) with different concentrations (25 to 200 µg/mL) of the *A. blazei* Murill water extract in 96-well plates, for 24 h at 4 °C. Cell viability was assessed by the MTT assay, and results were expressed as the percentage of cell lyses compared to cultures treated with amphotericin B (AmB, 1 µg/mL). The hemolytic activity was investigated by incubating the *A. blazei* Murill water extract (25 to 200 µg/mL) with a 5% red blood cell (human O<sup>+</sup>) suspension for 1 h at 37 °C. The erythrocyte suspension was centrifuged (1000 × g for 10 min), and cell lysis was determined spectrophotometrically (540 nm), as described [22]. The absence (blank) or 100% presence of hemolysis (positive control) was determined by replacing the extract for an equal volume of PBS 1x or distilled water, respectively. The results were determined by the percentage of hemolysis compared to the negative and positive controls. Data shown are representative of three separate experiments, performed in triplicate, which presented similar results.

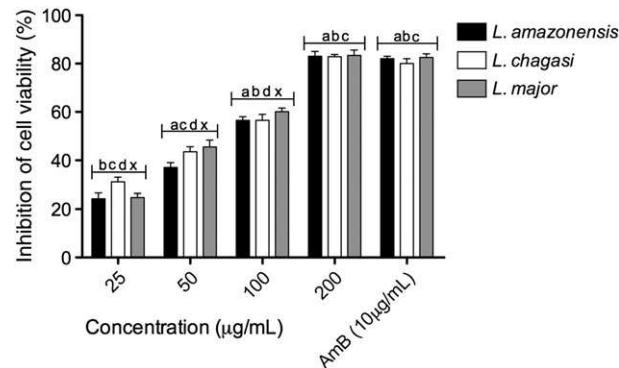
## 2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (version 5.0 for Windows). The differences among the diverse treatments (25, 50, 100 and 200 µg/mL) carried out using the *A. blazei* Murill water extract, as well as the reduction of the percentage of infected macrophages, were evaluated by the one-way ANOVA analysis, followed by Bonferroni's post-test for multiple comparisons. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Leishmanicidal activity of the water extract of *A. blazei* Murill in *Leishmania*

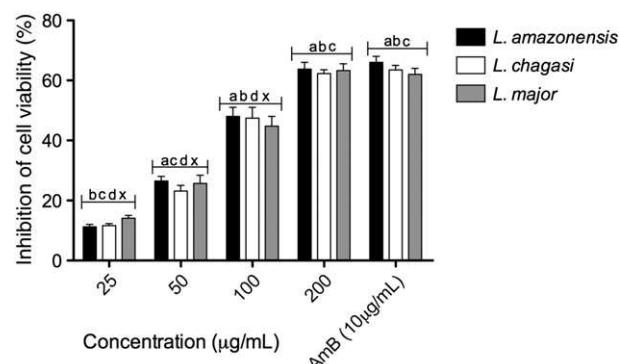
The *in vitro* leishmanicidal effect of the *A. blazei* Murill water extract was tested against promastigote and amastigote-like stages of *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*. Parasites were separately incubated with different extract concentrations (25 to 200 µg/mL) for 48 h at 24 °C. In the evaluation of the results, it could be observed that the leishmanicidal activity was based on a dependent-dose application, given that a lower dose (25 µg/mL) of the extract induced the inhibition of



**Fig. 1.** Leishmanicidal activity of the water extract of *Agaricus blazei* Murill against promastigotes of *L. chagasi*, *L. major*, and *L. amazonensis*. Parasites ( $4 \times 10^5$ ) were incubated with different individual concentrations (25 to 200 µg/mL) of the *A. blazei* Murill water extract, and cell viability was analyzed by MTT assay, after incubation for 48 h at 24 °C. Amphotericin B (AmB, 10 µg/mL) was used as a positive control. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation of the inhibition of *Leishmania* viability in each concentration tested. Differences were considered statistically significant ( $P < 0.05$ ) when comparing the parasites treated with: (a) 25 µg/mL, (b) 50 µg/mL, (c) 100 µg/mL, or (d) 200 µg/mL of the water extract, and the parasites treated with AmB (x).

*Leishmania* viability percentages in the order of 26.5%, 29.3%, and 23.2% for *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major* promastigotes (Fig. 1), respectively, whereas in the amastigote-like stage, the inhibition of cell viability percentages were of 10.5%, 12.3%, and 13.2%, respectively (Fig. 2). The higher dose of the water extract (200 µg/mL) evoked higher inhibition of *Leishmania* viability percentages in the order of 85%, 81.6%, and 85% for *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major* promastigotes, respectively, and of 61.5%, 63.6%, and 65.6% for amastigote-like stages, respectively, for the three species. In the evaluation of IC<sub>50</sub>, promastigotes proved to be more susceptible than amastigote-like as they presented IC<sub>50</sub> values of 67.5, 65.8, and 56.8 µg/mL for *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*, respectively, while the values for amastigote-like stages were 115.4, 112.3, and 108.4 µg/mL for *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*, respectively (Table 1). Amphotericin B (10 µg/mL), used as a positive control, presented significant reductions in the viability of the three *Leishmania* species evaluated (Figs. 1 and 2).

To provide additional information concerning the chemical entities in the *A. blazei* Murill water extract that can be responsible for the biological effects observed in this study, a chemical characterization was performed, as described in the Material and methods section. The result of this characterization illustrated the presence of tannins, saponins,



**Fig. 2.** Leishmanicidal activity of the water extract of *Agaricus blazei* Murill against amastigotes-like of *L. chagasi*, *L. major*, and *L. amazonensis*. Parasites ( $4 \times 10^5$ ) were incubated with different individual concentrations (25 to 200 µg/mL) of the *A. blazei* Murill water extract, and cell viability was analyzed by MTT assay, after incubation for 48 h at 24 °C. Amphotericin B (AmB, 10 µg/mL) was used as a positive control. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation of the inhibition of *Leishmania* viability in each concentration tested. Differences were considered statistically significant ( $P < 0.05$ ) when comparing the parasites treated with: (a) 25 µg/mL, (b) 50 µg/mL, (c) 100 µg/mL, or (d) 200 µg/mL of the water extract, and the parasites treated with AmB (x).

**Table 1**

Fifty percent inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of the water extract of *Agaricus blazei* Murill against different *Leishmania* species. The results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the inhibition of *Leishmania* viability for promastigote and amastigote-like of the three *Leishmania* species.

Leishmania species	$IC_{50}$ (μg/mL)	
	Promastigotes	Amastigotes-like
<i>L. amazonensis</i>	67.5 $\pm$ 1.7	115.4 $\pm$ 2.1
<i>L. chagasi</i>	65.8 $\pm$ 1.7	112.3 $\pm$ 2.0
<i>L. major</i>	56.8 $\pm$ 1.7	108.4 $\pm$ 2.2

**Table 3**

Percentage of infected macrophages and parasite burden after treatment with the *Agaricus blazei* Murill water extract. The results are expressed as medium  $\pm$  standard deviation of the percentages of the infected macrophages and the reduction of the parasite burden in treated cultures.

Promastigotes	Percentage of infected macrophages	Reduction of internalized parasites (%)
<i>L. amazonensis</i>	82.0 $\pm$ 2.7	44.1 $\pm$ 2.3
<i>L. chagasi</i>	57.0 $\pm$ 1.3	30.1 $\pm$ 1.8
<i>L. major</i>	73.0 $\pm$ 3.4	45.2 $\pm$ 3.1

**Table 2**

Inhibition of the infection in murine macrophages after treatment of promastigotes with the *Agaricus blazei* Murill water extract. The results are expressed as medium  $\pm$  standard deviation of the percentages of the infected macrophages by the non-treated and treated cultures of *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*.

Promastigotes	Percentage of infected macrophages by non-treated <i>Leishmania</i>	Percentage of infected macrophages by treated <i>Leishmania</i>	Infективness reduction
<i>L. amazonensis</i>	82.0 $\pm$ 2.7	12.7 $\pm$ 1.6	84.4 $\pm$ 2.3
<i>L. chagasi</i>	57.0 $\pm$ 1.3	24.5 $\pm$ 1.7	79.6 $\pm$ 1.9
<i>L. major</i>	73.0 $\pm$ 3.4	19.7 $\pm$ 1.4	85.3 $\pm$ 3.1

proteins, glycoproteins, polysaccharides, and carbohydrates within the water extract.

### 3.2. Inhibition of infection and treatment of infected macrophages

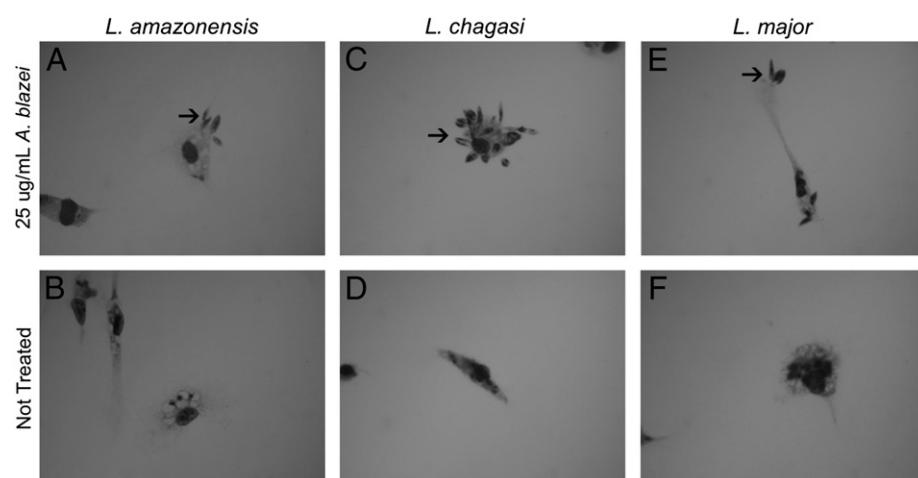
The *Leishmania* infectivity treated with the water extract was evaluated in murine macrophages. Parasites (*L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*) non-treated with the water extract were able to infect 82%, 57%, and 73% of the phagocytic cells, respectively. When parasites were pre-incubated with 25 μg/mL of the water extract for 1 h, they were able to infect approximately 12.7%, 24.5%, and 19.7% of the murine macrophages, respectively, in turn presenting reductions in their infectivity in the order of 84.4%, 79.6%, and 85.3% for *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*, respectively. In this light, it can be deduced that

pre-treatment with the water extract was able to inhibit significantly the infection of *Leishmania* into the macrophages (Table 2). An optical microscopy was carried out on macrophages infected with the non-treated and treated parasites, and it could be observed that the treated parasites remained attached to the external membranes of phagocytic cells and were unable to be internalized within them, thus demonstrating a direct effect of the water extract in reducing the infection into the macrophages (Fig. 3).

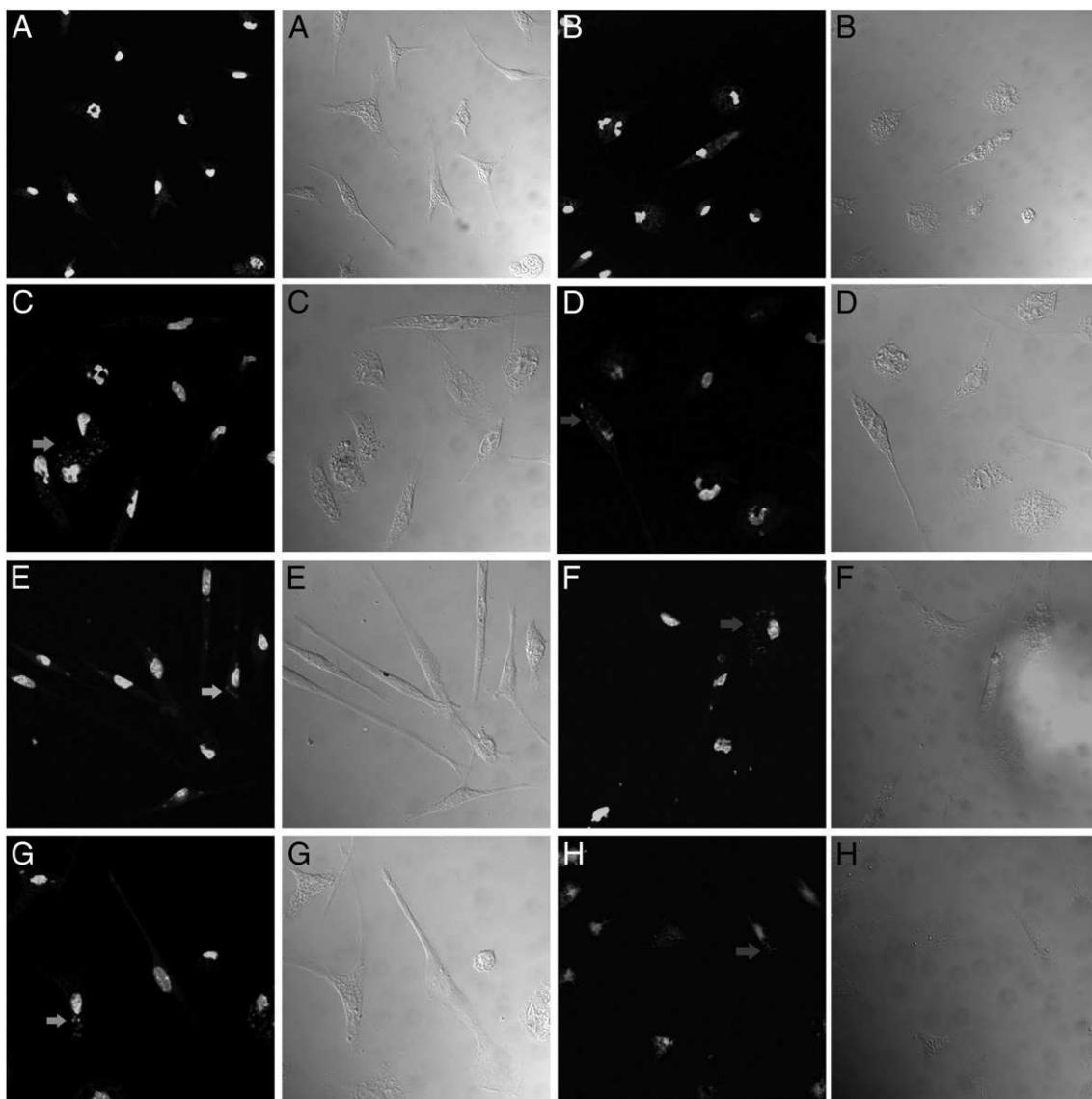
In this manner, an evaluation of the capacity of the water extract in treating infected macrophages was also performed. Cells were first pre-infected with *L. amazonensis*, *L. chagasi*, or *L. major* promastigotes and later treated with 50 μg/mL of water extract for 4 h at 24 °C. The results showed that macrophages that were infected and later treated presented reductions in the parasite burden in the order of 44.1%, 30.1%, and 45.2% for *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*, respectively (Table 3). In addition, a confocal microscopy was performed, which indicated that in the infected cells and treated with the water extract, many intramacrophages parasites, which were labeled with an orange color to reveal the presence of apoptotic DNA, could be observed when the three *Leishmania* species were tested. It is interesting to note that infected and non-treated macrophages presented colonized vacuoles, demonstrating the efficacy of the treatment with the water extract into the infected cells (Fig. 4).

### 3.3. Nitric oxide (NO) production and iNOS expression

The activation of macrophages by NO production after the treatment with the *A. blazei* Murill water extract was also investigated. The data



**Fig. 3.** Optical microscopy of the inhibition of the infection *Leishmania* in murine macrophages. Promastigotes were pre-incubated with the of *A. blazei* Murill water extract (25 μg/mL) for 1 h at 24 °C. After incubation, parasites were washed and used to infect macrophages (10:1 ratio) for 4 h at 24 °C. Optical microscopy of untreated *Leishmanias* illustrates the presence of parasites within parasitophorous vacuoles in the infected macrophages (panels A, C, and E for *L. amazonensis*, *L. chagasi* and *L. major*, respectively). In panels B, D, and F, *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*, respectively, that had been pre-incubated with the water extract remained attached to the external membrane of the macrophages and were unable to infect the phagocytic cells.

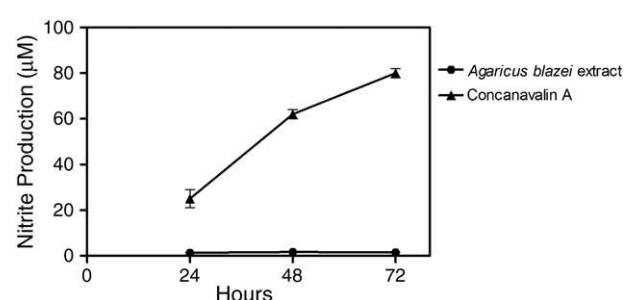


**Fig. 4.** Confocal microscopy analysis of treatment of infected macrophages. Murine macrophages were infected with different *Leishmania* species (1:10 ratio, respectively) and later treated with the *A. blazei* Murill water extract (50 µg/mL). Panels A and B indicate uninfected and untreated macrophages, and uninfected macrophages that had been treated with the water extract, respectively. The labeling of the infected and untreated cells can be observed in panels C, E, and G for *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*, respectively (green arrows). In panels D, F, and H, macrophages infected with *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major*, respectively, which were treated with the water extract. In these cases, there is a general overview of macrophages containing non-viable parasites (orange color).

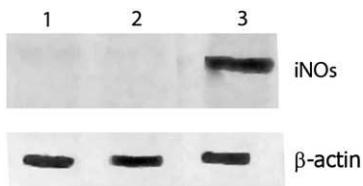
showed no production of nitrite after 24, 48, and 72 h of incubation (Fig. 5). Concanavalin A (ConA, 5 µg/mL) was used as a positive control and demonstrated a high NO production. To confirm whether or not the water extract truly induced the NO production, the expression of iNOS was investigated by applying a Western-blot technique. As shown in Fig. 6, no iNOS expression could be detected in the macrophages that were incubated alone or stimulated with the water extract. However, after stimulation with ConA, cells were able to show an iNOS expression.

### 3.4. Cytotoxicity and hemolytic activity

The cytotoxicity of the *A. blazei* Murill water extract was investigated in murine macrophages. The *in vitro* assay demonstrated no significant cytotoxicity in cells with a high concentration (200 µg/mL) of the water extract, especially when compared to amphotericin B, which, when used in the concentration of 1 µg/mL, was able to induce toxicity in 20% of the cells (Table 4). In addition, the hemolytic activity in O<sup>+</sup> human red blood



**Fig. 5.** Nitric oxide (NO) production. Murine macrophages ( $4 \times 10^5$ ) were separately stimulated with the *A. blazei* Murill water extract (50 µg/mL) or Concanavalin A (5 µg/mL) for 24, 48, and 72 h, at 37 °C, in 5% CO<sub>2</sub>. Lines represent mean ± standard deviation of nitrite levels (µM) per group, after incubation at the different periods of time. Data shown are representative of three independent experiments, performed in triplicate, which presented similar results.



**Fig. 6.** Inducible nitric oxide syntase (iNOS) expression. Murine macrophages were incubated alone (medium; background control, in 1) or separately stimulated with the *A. blazei* Murill water extract (50 µg/mL, in 2) or Concanavalin A (5 µg/mL, in 3) for 24 h at 37 °C, in 5% CO<sub>2</sub>. Cells were lysed, and iNOS expression (123 kDa) levels were measured by Western-blot assay using specific antibodies. Beta-actin expression (45 kDa) was used as a standard.

cells was also determined as a cytotoxic parameter, and no significant damage to human erythrocytes could be observed after incubation with 200 µg/mL of the water extract (Table 4).

#### 4. Discussion

Current treatment for Visceral and Cutaneous Leishmaniasis is considered inadequate, given that drugs present high toxicity levels, high cost, a growing parasite resistance, and long-term treatments [23]. Compounds extracted from natural products represent an important source for research concerning new drugs to be used in developing novel therapeutic agents [24–30]. In this light, the purpose of this study was to evaluate the leishmanicidal activity of an *A. blazei* Murill water extract against different *Leishmania* species, namely, *L. amazonensis*, *L. major*, and *L. chagasi* promastigote and amastigote-like stages.

The water extract showed a good leishmanicidal activity against the different *Leishmania* species and in both parasite stages. It proved to be effective in inhibiting the infection of macrophages by parasites that had been pre-incubated with the water extract, as well as in reducing the parasite burden in infected macrophages that were later treated with the water extract. In addition, the extract presented a low cytotoxicity in murine macrophages and no hemolytic activity in human red blood cells. The biological activity of the mushroom can be considered relevant, as it was effective against *Leishmania* species found in different parts of the world. In this light, *L. major*, an important etiological agent of Old World Cutaneous Leishmaniasis, was the strain that proved to be most susceptible to the water extract, presenting IC<sub>50</sub> values of 56.8 and 108.4 µg/mL for promastigote and amastigote-like stages, respectively. Similarly, the water extract also proved to be effective against *L. chagasi*, presenting IC<sub>50</sub> values of 65.8 and 112.3 µg/mL, as well as against *L. amazonensis*, with IC<sub>50</sub> values of 67.5 and 115.4 µg/mL for promastigote and amastigote-like stages, respectively. Results from the present study showed that the *A. blazei* Murill was more potent against *Leishmania* promastigotes than against amastigotes-like since the IC<sub>50</sub> values were higher in inducing leishmanicidal activity in the amastigote-like stage. These differences can be, at least in part, explained by the distinct morphological and biochemical characteristics of both stages, given that the amastigotes can modulate the immune response of the hosts and, consequently, be more resistant than the promastigotes forms [31].

**Table 4**

Cytotoxicity and hemolytic activity. The results are expressed as medium ± standard deviation of the percentage of the cytotoxic and hemolytic activities of the *A. blazei* Murill water extract. ND: not done.

Treatment (µg/mL)	Cytotoxicity (%)	Hemolysis (%)
<i>A. blazei</i> extract (25)	3.15 ± 1.15	3.51 ± 1.04
<i>A. blazei</i> extract (50)	6.02 ± 0.89	2.73 ± 1.39
<i>A. blazei</i> extract (100)	12.31 ± 1.78	3.51 ± 1.17
<i>A. blazei</i> extract (200)	15.55 ± 1.98	4.32 ± 1.22
Amphotericin B (1)	20.00 ± 4.00	ND

Macrophages represent the main host phagocytic cells in leishmaniasis and play a relevant role in the immunological control of intracellular parasitism through the production of oxygen derivative metabolites [32]. Through the up-regulation of NO production within the cells, macrophages can trigger an intracellular killing mechanism of the internalized parasites [33]. Mushrooms are known for their immune properties that can be associated with the polysaccharide fractions. In particular, β-glucans have been reported to activate leukocytes and can increase the phagocytic activity of the cells, the production of reactive oxygen intermediates, as well as the production of inflammatory mediators, such as cytokines and chemokines [14,34,35]. In a chemical characterization performed with the water extract used in this study, the presence of the tannins, saponins, proteins, glycoproteins, polysaccharides and carbohydrates was observed. Therefore, the present study aimed to investigate the NO production and the iNOS expression by macrophages treated with the *A. blazei* Murill water extract. It could be observed that the water extract did not induce NO production, nor iNOS expression, suggesting that the leishmanicidal activity observed may be due to a mechanism other than NO production by macrophages. Recently, Volman et al. (2010) reported that the *Agaricus bisporus* mushroom was able to induce a strong immune-stimulating effect on bone marrow-derived macrophages and NO production, whereas the *A. blazei* Murill was unable to induce the NO production [36]. This result is in accordance with findings from the present study.

Tempone et al. (2001) showed that snake venom presented leishmanicidal activity without inducing NO production by the phagocytic cells [37]. According to this data, together with those described in this work, it can be speculated that other mechanisms than NO production may well be involved in the elimination of parasites without requiring macrophage activation via iNOS expression. This finding suggests that the product can transpose the membrane of the macrophages and reach the internalized parasites through a direct effect of the water extract onto the parasites. A confocal microscopy revealed that infected macrophages that were later treated with the water extract, as compared to infected and non-treated controls, presented significant reductions in the parasite burden. An optical microscopy showed that parasites that were pre-incubated with the water extract, as compared to the controls, encountered several difficulties in infecting macrophages. As a low cytotoxicity in the macrophages and a poor hemolytic activity in human red blood cells were observed, it could be inferred that the water extract is safe for mammalian cells, considering that a high concentration of this product (200 µg/mL) presented low cytotoxicity in the host cells. Amphotericin B, when applied in a low doses (10 µg), proved to be quite efficient in eliminating parasites, but it was highly cytotoxic in mammalian cells, thus demonstrating some of its reported adverse effects.

In conclusion, this study described the leishmanicidal activity of an *A. blazei* Murill water extract in different *Leishmania* species and in the both stages. This study showed that the extract's activity was not mediated by NO production and that parasite elimination may well be due to a direct effect into the infected macrophages. Further studies may lead to the characterization of molecular mechanisms and to identification of isolated compounds of *A. blazei* Murill mushroom that can be responsible to the leishmanicidal activity observed in this research. Thus, further exploration of this mushroom is recommended how an attempt to find suitable chemotherapeutic alternatives for the treatment of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis.

#### Acknowledgments

This study was supported by grants from Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) of UFMG (Edital 07/2010), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; CBB-APQ-01322-08 and CBB-APQ-02364-08), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; APQ-577483/2008-0), and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica (INCT/Nano-BIOFAR).

DGV and EAFC are grant recipient of CNPq, while MACF is a grant recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## References

- [1] Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:230–50.
- [2] World Health Organization. Leishmaniasis: the disease and its impact. WHO communicable diseases surveillance and response. Geneva: WHO; 2003 <http://www.who.int/eme/diseases/leish/leisdis1.html>.
- [3] Thakur CP, Sinha GP, Pandey AK, Kumar N, Kumar P, Hassan SM, Narain S, Roy RK. Do the diminishing efficacy and increasing toxicity of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar, India, justify its continued use as a first-line drug? An observational study of 80 cases. *Ann Trop Med Parasitol* 1998;92:561–9.
- [4] Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharla A, Kumar PC, Murray HW. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 2000;31:1104–7.
- [5] Bhattacharya G, Herman J, Delfin D, Salem MM, Barszcz T, Mollet M, Riccio G, Brun R, Werbovetz KA. Synthesis and antitubulin activity of N1- and N4-substituted 3,5-dinitro sulfonamides against African trypanosomes and *Leishmania*. *J Med Chem* 2004;47:1823–32.
- [6] Tremblay M, Olivier M, Bernier R. *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitol Today* 1996;12:257–61.
- [7] Grinde B, Hetland G, Johnson E. Effects on gene expression and viral load of a medicinal extract from *Agaricus blazei* Murill in patients with chronic hepatitis C infection. *Int Immunopharmacol* 2006;6:1311–4.
- [8] Talcott JA, Clark JA, Lee IP. Measuring perceived effects of drinking an extract of basidiomycetes *Agaricus blazei* Murill: a survey of Japanese consumers with cancer. *BMC Complement Altern Med* 2007;29:7–32.
- [9] Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill: review of literature and pharmacotoxicological problems. *Evid Based Complement Altern Med* 2008;5:3–15.
- [10] Hsu CH, Hwang KC, Chiang YH, Chou P. The mushroom *Agaricus blazei* Murill extract normalizes liver function in patients with chronic hepatitis B. *J Altern Complement Med* 2008;14:299–301.
- [11] Sorimachi K, Akimoto K, Koge T. Inhibitory effect of *Agaricus blazei* Murill components on abnormal collagen fiber formation in human hepatocarcinoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72:621–3.
- [12] Gonzaga ML, Bezerra DP, Alves AP, De Alencar NM, Mesquita RO, Lima MW, Soares SA, Pessoa C, De Moraes MO, Costa-Lotufo LV. *In vivo* growth-inhibition of sarcoma 180 by an alpha-(1→4)-glucan-beta-(1→6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. *Nat Med (Tokyo)* 2009;63:32–40.
- [13] Kim CF, Jiang JJ, Leung KN, Fung KP, Lau CB. Inhibitory effects of *Agaricus blazei* Murill extracts on human myeloid leukemia cells. *J Ethnopharmacol* 2009;122:320–6.
- [14] Wasser SP, Weis AL. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *Int J Med* 1999;1:31–62.
- [15] Hashimoto T, Nonaka Y, Minato K, Kawakami S, Mizuno M, Fukuda I, Kanazawa K, Ashida H. Suppressive effect of polysaccharides from the edible and medicinal mushrooms, *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* Murill, on the expression of cytochrome P450s in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66:1610–4.
- [16] Urben AF. Caracterização morfológica e fisiológica de acessos de *Agaricus blazei* e *A. sylvaticus*. V Congresso latino americano de Micologia, Brasília; 2005. p. 203–5.
- [17] Padilha MM, Ávila AA, Sousa PJ, Cardoso LG, Perazzo FF, Carvalho JC. Anti-inflammatory activity of water and alkaline extracts from mushrooms (*Agaricus blazei* Murill). *J Med Food* 2009;12:359–64.
- [18] Coelho EAF, Tavares CA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, Charest H, Matlaskewski G, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun* 2003;71:3988–94.
- [19] Coelho EAF. Avaliação dos níveis de proteção e da resposta imune induzida pela imunização com os抗原os A2 e LACK na infecção experimental com *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Doctoral Thesis. Department of Biochemistry and Immunology. Institute of Biological Sciences (ICB), UFMG, 2004.
- [20] Wagner H, Bland S, Zgainski EM. Plant drug analysis. Berlin: Springer-Verlag; 1984. 320 pp.
- [21] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956;28:350–6.
- [22] Löfgren SE, Milette LC, Steindel M, Bachère E, Barracco MA. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. *Exp Parasitol* 2008;118:197–202.
- [23] Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi P. Anti-trypanosomal and leishmanicidal activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1352–64.
- [24] Araújo CAC, Alegre LV, Leon LL. Leishmanicidal activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry* 1998;49:751–4.
- [25] Akendengue B, Ngou-Milama E, Laurens A, Hocquemiller R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite* 1999;6:3–8.
- [26] Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, Pinto AC, Henriques AT, Bou-Habib DC, Saraiá BEM. Leishmanicidal activity of indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1349–54.
- [27] Hatimi S, Boudouma M, Bichichi M, Chaïb N, Idrissi NG. *In vitro* evaluation of antileishmania activity of *Artemisia herba alba* Asso. *Bull Soc Pathol Exot* 2001;94:29–31.
- [28] Ferreira ICP, Lonardoni MVC, Machado GMC, Leon LL, Gobbi-Filho L, Pinto LHB, Oliveira AJB. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:1–3.
- [29] Buckner FS, Wilson AJ. Colorimetric assay for screening compounds against *Leishmania* amastigotes grown in macrophages. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:600–5.
- [30] Campos FF, Rosa LH, Cota BB, Caligiorne RB, Rabello ALT, Alves TMA, Rosa CA, Zanil CL. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus spp.*, an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *PLoS Negl Trop Dis* 2008;12:e348.
- [31] Kima PE. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol* 2007;37:1087–96.
- [32] Balaraman S, Tewary P, Singh VK, Madhubala R. *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317:639–47.
- [33] Mauél J, Ransijn A. *Leishmania spp.*: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp Parasitol* 1997;87:98–111.
- [34] Mizuno T. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Rev Int* 1995;11:7–21.
- [35] Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity* 2003;19:311–5.
- [36] Volman JJ, Mensink RP, Van Griensven LJ, Plat J. Effects of alpha-glucans from *Agaricus bisporus* on *ex vivo* cytokine production by LPS and PHA-stimulated PBMCs; a placebo-controlled study in slightly hypercholesterolemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:720–6.
- [37] Tempone AG, Andrade HF, Spencer PJ, Lourenço CO, Rogero JR, Nascimento N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:620–4.

# Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei* Murill against *Leishmania amazonensis*

Diogo G. Valadares · Mariana C. Duarte · Laura Ramírez ·  
Miguel A. Chávez-Fumagalli · Paula S. Lage · Vivian T. Martins · Lourena E. Costa ·  
Tatiana G. Ribeiro · Wiliam C. B. Régis · Manuel Soto · Ana Paula Fernandes ·  
Carlos A. P. Tavares · Eduardo A. F. Coelho

Received: 18 October 2011 / Accepted: 24 June 2012 / Published online: 15 July 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** The development of therapeutic alternatives to treat leishmaniasis has received considerable attention. The present study aimed to investigate the efficacy of the *Agaricus blazei* Murill water extract (AbM) to treat BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. First, a dose-titration curve was performed. The most well-defined concentration able to induce the most effective results in the infected animals, considering a daily administration of the product, was that of 100 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>. In this context, the AbM was administered orally, beginning on day 0 up to 20 days postinfection. Additional animals were treated with amphotericin B (AmpB, 5 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) by peritoneal route for the same period of time, while the control group received distilled water. The animals were evaluated at 14 weeks post-infection, at which time the parasitological

and immunological parameters were analyzed. Mice treated with the AbM presented a 60 % reduction in the inflammation of infected footpads as compared to untreated control-infected mice. Moreover, in the treated mice, as compared to the untreated controls, approximately 60 and 66 % reductions could be observed in the parasite burdens of the footpad and draining lymph nodes, respectively. In addition, no parasites could be detected in the spleen of treated mice at week 14 postinfection. These treated animals produced significantly higher levels of interferon gamma (IFN-γ) and nitric oxide (NO), higher levels of parasite-specific IgG2a isotype antibodies, and lower levels of interleukin (IL)-4, and IL-10 in the spleen and lymph node cell cultures than did the controls. Differences could be observed by comparing animals treated with AbM to those treated with AmpB,

D. G. Valadares · V. T. Martins · C. A. P. Tavares  
Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

M. C. Duarte · E. A. F. Coelho  
Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses, Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Pampulha, Avenida Antônio Carlos, 6627, CEP 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

L. Ramírez · M. Soto  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

M. A. Chávez-Fumagalli  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

P. S. Lage · L. E. Costa · E. A. F. Coelho (✉)  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil  
e-mail: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

T. G. Ribeiro  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

W. C. B. Régis  
Minasfungi do Brasil Ltda., Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

W. C. B. Régis  
PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

A. P. Fernandes  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

as indicated by a significant reduction in tissue parasitism, higher levels of IFN- $\gamma$  and NO, and lower levels of IL-4 and IL-10, as well as by a decreased hepatic toxicity. In conclusion, the present study's data show that the *A. blazei* Murill water extract presents a high potential for the treatment of leishmaniasis, although additional studies on mice, as well as on other mammal hosts, are warranted in an attempt to determine this extract's true efficacy as compared to other known therapeutic products.

## Introduction

Leishmaniasis is a group of vector-transmitted diseases that are endemic in 88 tropical and subtropical countries. Many geographic regions are endemic for multiple *Leishmania* species. This is the case in South America, where the disease is caused by at least eight different species of *Leishmania* (WHO 2000). American tegumentary leishmaniasis (ATL) includes a variety of forms that are commonly referred to by their clinical and pathologic features: cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL), and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Leishmania amazonensis* is associated with all clinical forms of ATL (Afonso and Scott 1993; Grimaldi and Tesh 1993) as well as with visceral leishmaniasis (VL) in humans (Barral et al. 1991).

Historically, the treatment of leishmaniasis has been based on the use of pentavalent antimonials. The parenteral administration of these compounds is still the first choice therapy; however, increased parasite resistance and side effects, such as arthralgias, myalgias, pancreatitis, leukopenia, and cardio-toxicity, are important problems experienced by patients (Berman 2003; Croft and Coombs 2003; Oliveira et al. 2011). Liposomal amphotericin B (AmpB) is considered effective, though these formulations are very expensive (Mondal et al. 2010). Results from clinical trials of oral miltefosine treatment are encouraging; however, therapies using miltefosine are expensive, are linked to potential toxicity, and should not be given to pregnant or to childbearing age women (Kedzierski et al. 2009). Therefore, the development of alternative therapeutic strategies to treat leishmaniasis has become a high priority (Frézard and Demicheli 2009). Over the past few decades, major emphasis has been given to the identification of new formulations for both oral and topical treatments of the disease (Berman 2005; Croft and Coombs 2003). In this context, new treatment routes, as compared to parenteral administration, represent an interesting approach and offer several advantages, including improved safety, better compliance, and a lesser pain than that produced by needle-use administration (Aguiar et al. 2009; Croft and Olliaro 2011).

*Agaricus blazei* Murill is a commonly found mushroom in Brazil, and its use has been associated with folk medicine in the treatment of some diseases like leukemia, cancer, and

arterial hypertension (Kim et al. 2005; Talcott et al. 2007; Kim et al. 2009). Compounds such as  $\beta$ -D-glucans, glycoproteins, saponins, tannins, polysaccharides, steroids, ergosterol, and fatty acids have been detected in this mushroom, which have been shown to activate the host's immune response in different in vitro experiments (Sorimachi et al. 2001; Bernardshaw et al. 2005; Forland et al. 2010). Recently, the present study's group showed that the *A. blazei* Murill water extract presents an effective in vitro antileishmanial activity against different *Leishmania* species, including *L. amazonensis* (Valadares et al. 2011). In addition to the elimination of parasites in the infected macrophages, the water extract showed no cytotoxic effects in either murine macrophages or human red blood cells.

The present study investigated the efficacy of the *A. blazei* Murill water extract (AbM) in the treatment of BALB/c mice that had been experimentally infected by *L. amazonensis*, a highly susceptible mouse model. The extract was administered orally in BALB/c mice. Its capability of treating the infected animals was compared to that obtained through parenteral treatment using AmpB, by examining parasitological and immunological parameters.

## Materials and methods

### Mice

The Committee on the Ethical Handling of Research Animals from Federal University of Minas Gerais (UFMG) approved all the animal handling methods and procedures (code 056/2010). Female BALB/c mice (8 weeks age) were obtained from the breeding facilities of the Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, UFMG, and were maintained under specific pathogen-free conditions.

### Parasites and antigen preparation

*Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8) was grown at 24 °C in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO, USA), supplemented with 20 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, at pH 7.4. The soluble *L. amazonensis* antigenic extract (SLA) was prepared from  $1 \times 10^{10}$  stationary-phase promastigotes, as previously described by Coelho et al. (2003). Parasites were kindly provided by Dr Maria Norma Melo (Department of Parasitology, ICB, UFMG).

### *Agaricus blazei* Murill water extract

The AbM was prepared by macerating 50 g of fresh mushrooms in 50 mL of sterile Milli-Q water added to a protease

inhibitor cocktail (Sigma, catalog P8340) using a Waring-Blendor homogenizer for 1 h at 4 °C. Next, the mixture was centrifuged at 10,000×g for 30 min at 4 °C (LC5C model, Sorval). The supernatant was then collected, sterilized by being passing through a 0.22-μm membrane, and stored at –80 °C until use.

#### Infection and treatment regimens

BALB/c mice ( $n=12$  per group) were infected in the right hind footpad with  $2 \times 10^5$  stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis*. Animals were divided into three groups, according to the regimens of treatment, each receiving the treatment once a day, beginning at day 0 of infection and followed up until 20 days postinfection: (1) treatment with the *A. blazei* Murill water extract (AbM, 100 mg kg<sup>−1</sup> of body weight/day) by oral route, (2) treatment with amphotericin B deoxycholate (AmpB, 5 mg kg<sup>−1</sup> day<sup>−1</sup>, Sigma, catalog A9528) by parenteral route, and (3) administration of distilled water by oral route. All animals were maintained in abstinence of food for 3 h pretreatment and 1 h posttreatment.

#### Cutaneous lesion development

The course of the disease was monitored weekly by measuring the footpad thickness with an electronic caliper (799-6/150 model, Starrett®, Brazil) and expressed as the increase in thickness of the infected hind footpad, as compared to the uninfected left footpad. Mice were evaluated for lesion development for 14 weeks.

#### Estimation of parasite load

The mice ( $n=6$  per group) were euthanized at 10 and 14 weeks postinfection, when the infected footpads, spleen, and draining lymph node (dLN) were collected for parasite quantitation by means of a limiting dilution assay, as described by Vieira et al. (1996). Briefly, the organs were weighed and homogenized, using a glass tissue grinder in sterile phosphate-buffered saline (PBS). Tissue debris was removed by centrifugation at 150×g, and cells were concentrated by centrifugation at 2,000×g. The pellet was resuspended in 1 mL of Schneider's insect medium supplemented with 20 % FBS. Two hundred twenty microliters of the resuspension was plated onto 96-well flat-bottom microtiter plates (Nunc, Nunclon®, Roskilde, Denmark) and diluted in log-fold serial dilutions in supplemented Schneider's culture medium with a  $10^0$ – $10^{-24}$  dilution. Each sample was plated in triplicate and read 7–10 days after the beginning of the culture at 24 °C. Pipette tips were discarded after each dilution to avoid carrying adhered parasites from one well to another. Results are expressed as the negative log of the

titer (i.e., the dilution corresponding to the last positive well) adjusted per microgram of tissue.

#### Cytokine analysis

To measure IFN-γ, IL-4, and IL-10, the spleen and dLN cultures ( $5 \times 10^6$  cells, each one) were collected at week 10 postinfection and stimulated with SLA *L. amazonensis* (50 μg/mL<sup>−1</sup>), in duplicate, on 24-well, flat-bottomed plates (Nunc) for 48 h at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. The IFN-γ, IL-4, and IL-10 levels were determined in the culture supernatants by commercial kits (catalogue nos. 555138, 555232, and 555252 to IFN-γ, IL-4, and IL-10, respectively; BD OptEIA™ Pharmingen), according to manufacturer's instructions.

#### Nitric oxide production

To view the macrophage activation via nitric oxide (NO) production, the spleen and dLN ( $5 \times 10^6$  cells, each) were stimulated with SLA *L. amazonensis* (50 μg/mL<sup>−1</sup>) for 48 h at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Following incubation, 50 μL of culture supernatants was mixed with an equal volume of Griess reagent (Sigma). After an incubation of 30 min at room temperature, the nitrite concentration was calculated using a standard curve of known concentration.

#### Serum levels of alanine transaminase and aspartate transaminase

Serum samples from the mice were collected to determine alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) levels. The dosages were performed using commercial kits (catalogs K049 and K048 for ALT and AST, respectively, Bioclin Quibasa Ltda., Brazil), according to manufacturer's instructions.

#### Analysis of humoral responses

SLA *L. amazonensis*-specific IgG, IgG1, and IgG2a antibodies were measured by ELISA (Coelho et al. 2003). Briefly, 96-well plates (Falcon model) were sensitized with SLA *L. amazonensis* (1 μg/well) for 18 h at 4 °C. Next, the plates were washed five times with PBS 1×/Tween 20 0.05 %, and the wells were blocked with a PBS 1×/bovine serum albumin 10 %/Tween 20 0.05 % solution, for 2 h at 37 °C. The plates were then washed seven more times under the same conditions, and serum samples (1:100 diluted) were added, in duplicate, for 1 h at 37 °C. After, the plates were washed seven times; specific peroxidase-labeled antibodies for mouse IgG, IgG1, and IgG2a isotypes (Sigma) were added separately (1:5,000 diluted), and incubation occurred for 1 h at 37 °C. Next, the plates were again washed seven times, at which time H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and o-

phenylenediamine were added for the development of reactions that occurred for 30 min in the dark and were stopped by the addition of 20  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  2 N. Optical densities were read at 492 nm in an ELISA microplate spectrophotometer (LAB-660 model, LGC Biotechnology).

### Statistical analysis

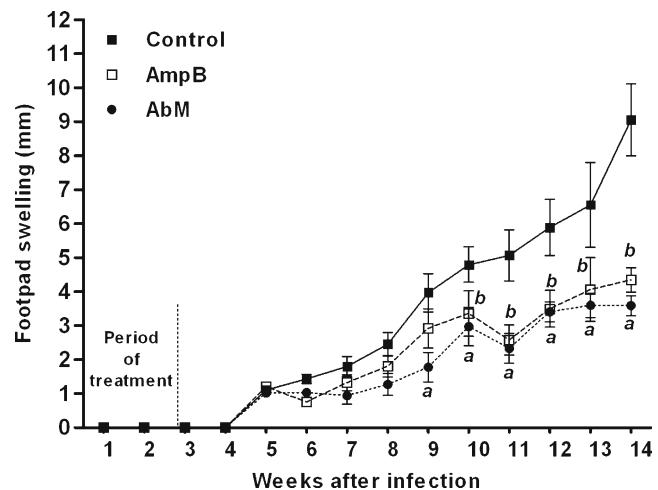
Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (version 5.0 for Windows). The differences among the diverse groups were evaluated using the one-way ANOVA analysis, followed by Bonferroni's posttest for multiple comparisons. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ . Data shown are representative of two different experiments, which presented similar results.

## Results

### In vivo efficacy of the *Agaricus blazei* Murill water extract to protect against *L. amazonensis*

In this study, an oral treatment employing an *A. blazei* Murill water extract (AbM) was applied in BALB/c mice experimentally infected with *L. amazonensis*. In previous in vivo experiments developed by the present study's group (data not shown), a dose–titration curve was performed to determine the best concentration of AbM able to induce the most effective results in treating the infected mice. It could be observed that the concentration of  $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ , administered once a day up to 20 days postinfection, produced the most reliable results concerning the animal treatments. Therefore, in the present study, AbM was administered orally at this concentration from day 0 up to 20 days postinfection. As a result, a significant reduction in the average lesion sizes could be observed in the animals treated with either AbM or AmpB after the ninth week of infection, as compared to the control mice (Fig. 1). Animals from both treatment groups displayed similar results in the swelling of the footpad, while controls showed a significant increase in their infected footpads. The protective response was sustained up to 14 weeks postinfection, when the mice treated with AbM or AmpB were still able to control the increase in lesion size.

To evaluate the parasite burden in the animals, the infected footpads, spleen, and dLN were collected at weeks 10 and 14 postinfection. Both treatments, i.e. with AbM and AmpB, as compared to the control mice, resulted in significant reductions in the parasite load, in nearly all evaluated organs, not including the dLN at week 14 postinfection, when results between the control and AmpB groups displayed no significant difference between them (Fig. 2). However, animals treated with AbM, as compared to those treated with AmpB, displayed better results in reducing the



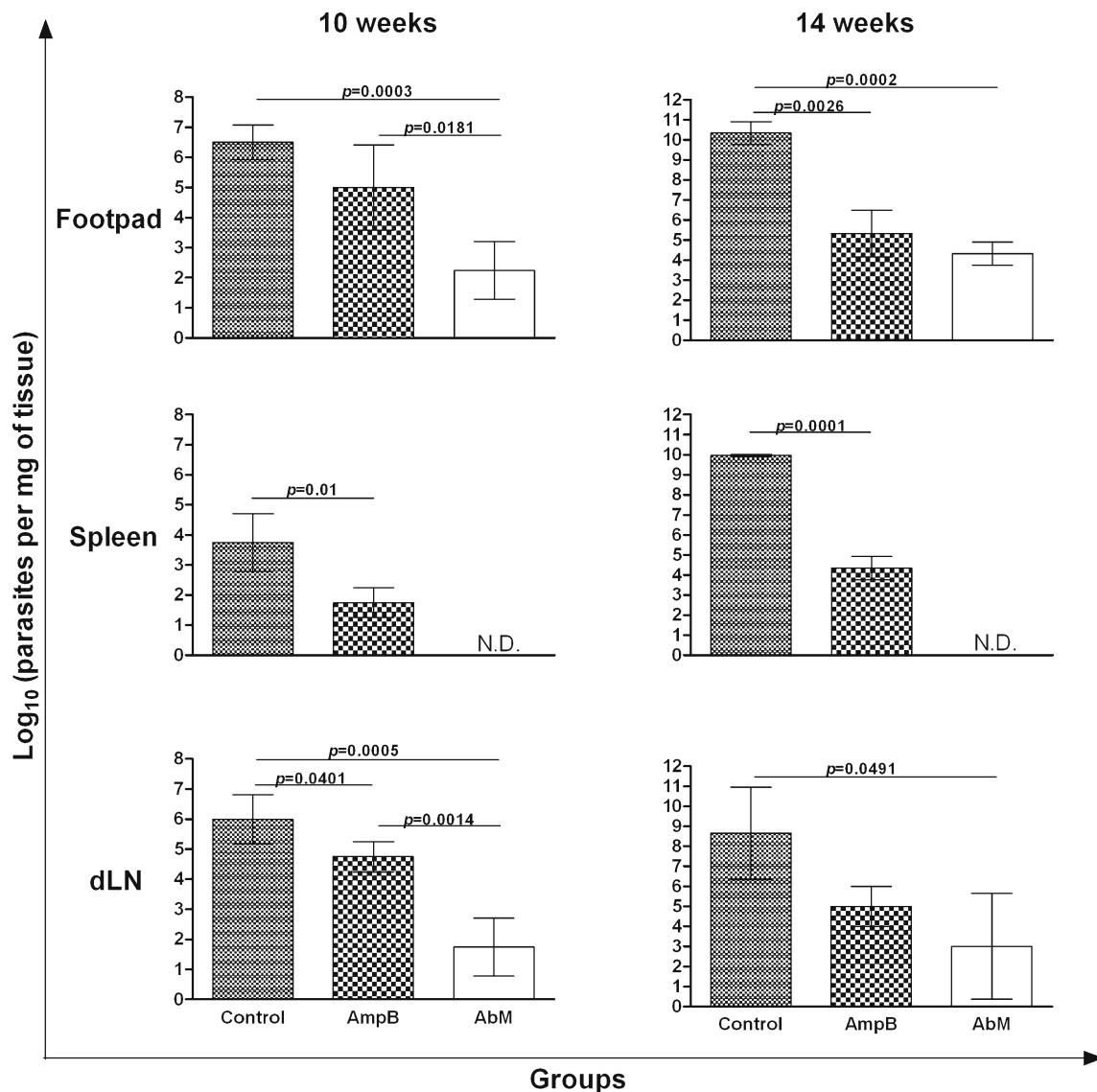
**Fig. 1** Footpad swelling in mice infected with *L. amazonensis* and treated with *A. blazei* Murill or amphotericin B. BALB/c mice ( $n=8$  per group) were infected in the right hind footpad with  $2 \times 10^5$  stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis*. From day 0 of infection up to 20 days postinfection, animals were treated orally with the *A. blazei* Murill water extract (AbM,  $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ), while another group received amphotericin B (AmpB,  $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) by parenteral route for the same period of time. An additional group received distilled water by oral route. All animals received treatments once a day. Lines indicate the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of the lesion size (in millimeters) of the infected animals. Lesion development in the infected animals was monitored weekly up to week 14 postinfection. Significant differences between the AbM and AmpB groups and the control group are indicated in the graph ("a" for AbM and control groups, and "b" for AmpB and control groups)

parasite load, including a complete elimination of parasites in the spleen of the animals at week 10 postinfection, which was maintained until week 14 of the treatment follow-up.

### SLA-specific cellular and humoral responses elicited against *L. amazonensis*

To evaluate if the treatment altered immunological parameters associated with the resistance and/or susceptibility of BALB/c mice infected with *L. amazonensis*, the production of IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 in the spleen and dLN culture supernatants was evaluated at week 10 postinfection. As shown in Fig. 3, spleen cells from mice treated with AbM produced significantly higher levels of SLA-specific IFN- $\gamma$  than those secreted by spleen cells of animals treated with AmpB or control mice. Spleen cells were also incubated alone (nonstimulated, background control) and produced very low levels of all evaluated cytokines (data not shown).

The SLA-specific IL-4 and IL-10 production was also investigated. Spleen cells from AbM-treated mice produced lower levels of IL-4 in relation to the levels detected in the control mice (Fig. 3). In the control group, in both splenic and dLN cultures, as compared to the IFN- $\gamma$  levels, a higher production of IL-4 could be observed, suggesting a predominance not only in the draining site of infection but also in



**Fig. 2** Parasite burden in the infected animals treated with *A. blazei* Murrill or amphotericin B. BALB/c mice ( $n=8$  per group) were infected in the right hind footpad with  $2 \times 10^5$  stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis* and were killed at weeks 10 and 14 postinfection. The

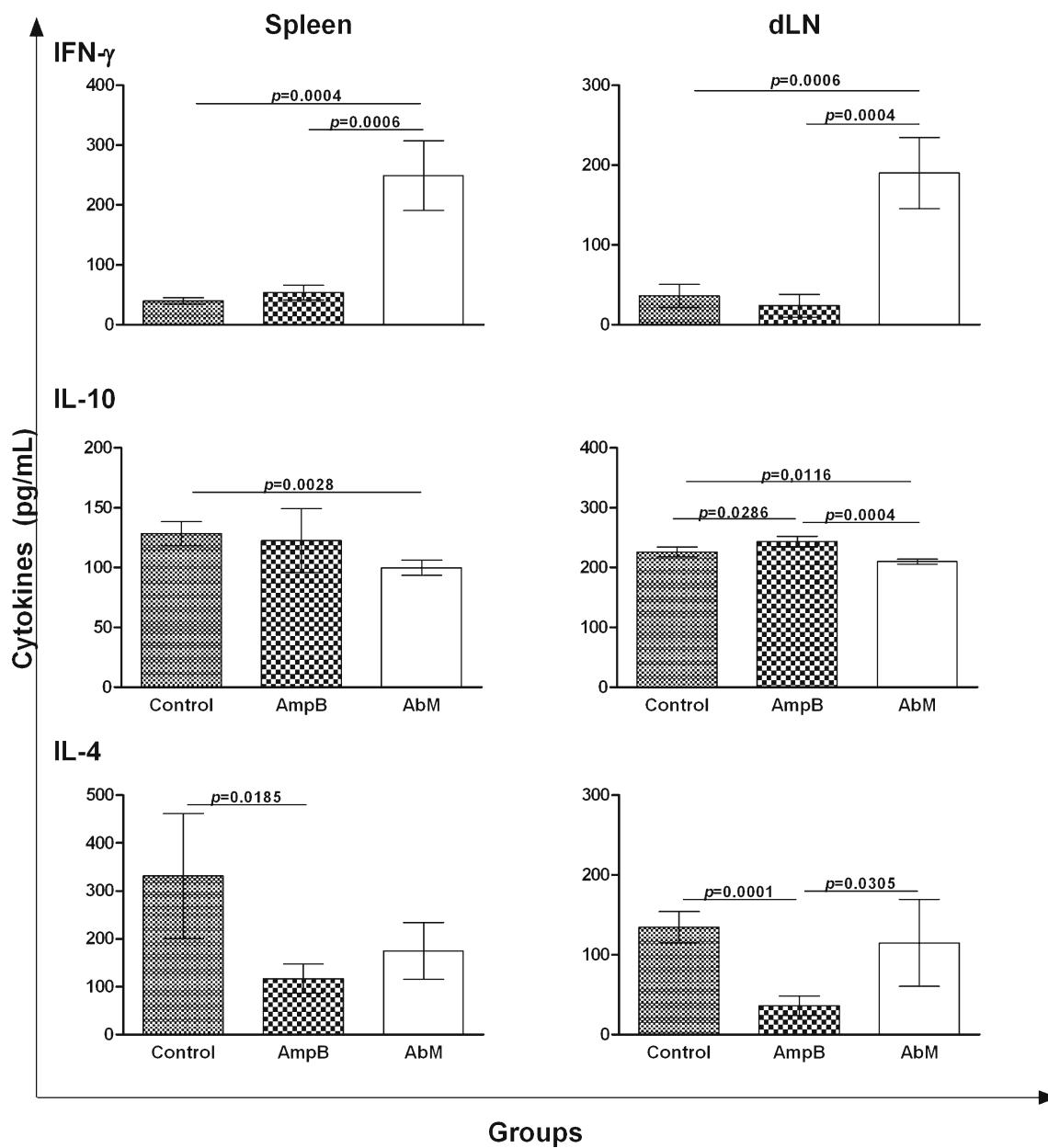
parasite load was then determined in the infected footpads, spleen, and dLN. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation (SD) of the groups. Significant differences among the AbM, AmpB, and control groups are indicated in the graphs. N.D. Not detected

the systemic level of a Th2 response. In addition, the production of IL-10 by dLN in the AbM group proved to be significantly lower when compared to the AmpB and control groups (Fig. 3).

The humoral response elicited against *L. amazonensis* in the groups was investigated in an attempt to determine the global anti-*Leishmania* antibody response induced after the treatments of the infected animals (Fig. 4). It could be observed that the control mice, as compared to the groups treated with AbM or AmpB, produced higher levels of SLA-specific IgG antibodies, as well as higher levels of IgG1 in relation to the IgG2a isotype. By contrast, treatment with AbM affected the global specific *L. amazonensis* humoral response, given that these animals produced lower levels of

SLA-specific IgG antibodies and higher levels of IgG2a, as compared to the IgG1 isotype, suggesting the predominance of a Th1 immune response in the group that received the treatment with the *A. blazei* water extract.

To determine the influence of the treatments using AbM or AmpB as effector functions of infected macrophages in killing *L. amazonensis* killing, the nitrite production in the spleen and dLN of the animals was also assayed (Fig. 5). The nitrite production in spleen cell supernatants was significantly higher in the mice treated with AbM, as compared to those treated with AmpB or the control mice. Curiously, when dLN was used to determine the nitrite production, the levels obtained in the treated groups were lower than those obtained using splenic cell cultures.



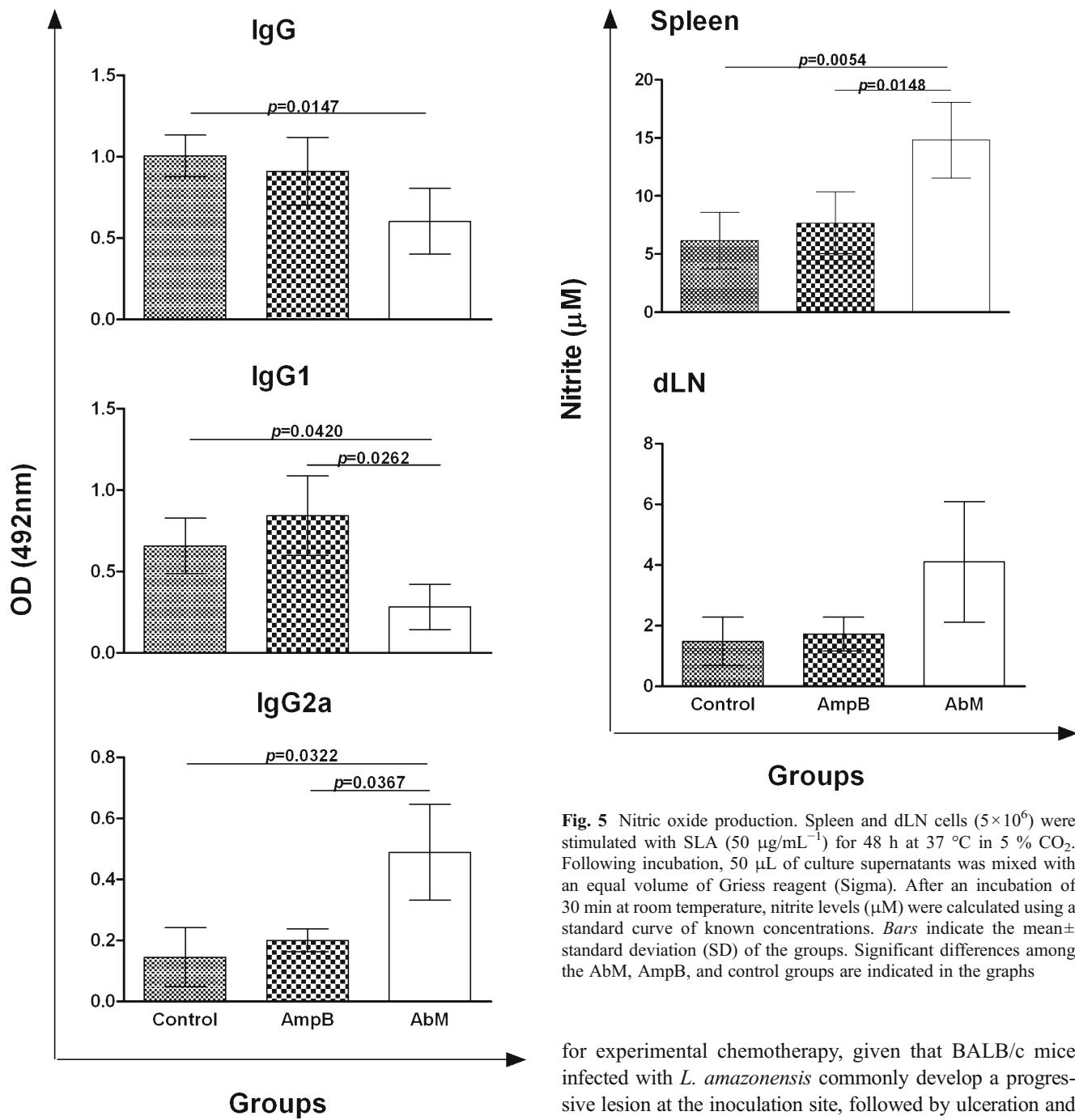
**Fig. 3** Cytokine levels in the infected animals treated with *A. blazei* Murill or amphotericin B. Single-cell suspensions were obtained from the spleen and dLN of infected and treated mice, 10 weeks post-infection. Cells were stimulated with SLA ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) for 48 h at

37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 levels were measured in culture supernatants by ELISA. Bars indicate the mean±standard deviation (SD) of the groups. Significant differences among the AbM, AmpB, and control groups are indicated in the graphs

The hepatic toxicity of the treatments using AbM or AmpB was also investigated in the animals. Serum samples of the mice were collected and the ALT and AST levels were determined using commercial kits. The data presented in Fig. 6 show that mice treated with AmpB displayed higher levels of ALT and AST when compared to the levels obtained in the animals treated with AbM. Moreover, the levels of ALT and AST in animals treated with AbM were comparable to those detected in noninfected/nontreated mice, suggesting the absence of hepatic toxicity in the AbM-treated mice.

## Discussion

The development of new therapeutic strategies and products to treat leishmaniasis has received considerable attention in recent years, including the use of new formulations administered by oral and topical routes (Aguiar et al. 2009, 2010; Croft and Olliaro 2011). The purpose of this study was to analyze whether or not the *A. blazei* Murill water extract was effective against different *Leishmania* species in in vitro experiments (Valadares et al. 2011) when administered at day 0 of infection and continuing up to 20 days postinfection,



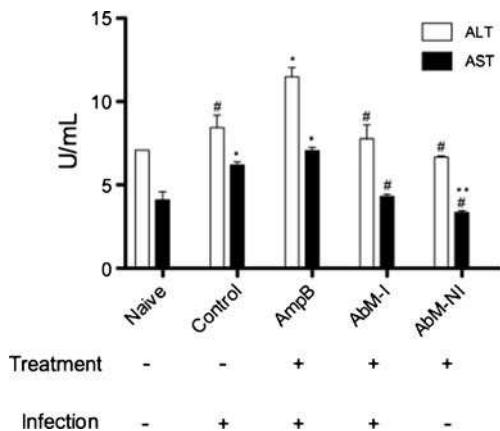
**Fig. 4** SLA-specific antibody responses in the infected animals treated with *A. blazei* Murill or amphotericin B. Serum samples were obtained from the infected and treated mice, 10 weeks post-infection. Serum samples were tested by ELISA to determine the presence of SLA-specific IgG, IgG1, and IgG2a antibodies. Bars indicate the mean $\pm$  standard deviation (SD) of the groups. Significant differences among the AbM, AmpB, and control groups are indicated in the graphs

as well as whether or not it was capable of treating BALB/c mice experimentally infected with *L. amazonensis*.

The experimental model used in this study is extremely susceptible and can be considered a highly stringent model

**Fig. 5** Nitric oxide production. Spleen and dLN cells ( $5 \times 10^6$ ) were stimulated with SLA ( $50 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ) for 48 h at  $37^\circ\text{C}$  in 5 %  $\text{CO}_2$ . Following incubation, 50  $\mu\text{L}$  of culture supernatants was mixed with an equal volume of Griess reagent (Sigma). After an incubation of 30 min at room temperature, nitrite levels ( $\mu\text{M}$ ) were calculated using a standard curve of known concentrations. Bars indicate the mean $\pm$  standard deviation (SD) of the groups. Significant differences among the AbM, AmpB, and control groups are indicated in the graphs

for experimental chemotherapy, given that BALB/c mice infected with *L. amazonensis* commonly develop a progressive lesion at the inoculation site, followed by ulceration and loss of tissue, which occurs simultaneously with the appearance of visceralization and metastasis at distant sites (Cupolilo et al. 2003). This model is generally refractory to treatment, especially when treatment is administered to developed lesions that have been followed up to check for progressive infections. In this case, the treatments do not commonly lead to significant reductions in parasitism and/or cures, unless additional interventions, such as the association of drugs, are employed (Aguiar et al. 2010). Therefore, in the present study, the treatment with AbM began immediately after infection, and its effect was directly compared to AmpB treatment, a well-known model of treatment for leishmaniasis, before the



**Fig. 6** Serum levels of alanine transaminase and aspartate transaminase. Serum samples of naive, control (distilled water), AmpB, or AbM-treated and infected (AbM-I), or AbM-treated (AbM-NI) and non-infected mice were collected to determine the serum levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) using commercial kits. White (ALT) and black (AST) bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of the groups. The single asterisk indicates significant differences in relation to the naive mice; double asterisk indicates significant differences in relation to the control mice, and the number symbol indicates significant differences in relation to the AmpB group

parasite burden had reached increased levels in the infected animals. In this context, both AbM and AmpB treatments were able to promote a significant reduction in both lesion size and tissue parasitism in the treated and infected animals. However, at approximately 10 weeks postinfection, the AbM treatment, as compared to AmpB therapy, proved to be more effective, leading to a significant reduction in the parasite burden in different sites, including a complete elimination of the parasites in the spleen of the treated and infected animals, which could be observed at 10 and 14 weeks postinfection. This is consistent with previous reports indicating that the *A. blazei* Murill water extract presents an effective in vitro anti-leishmanial activity against different *Leishmania* species, including *L. amazonensis* (Valadares et al. 2011).

It was also possible to verify that the treatment with AbM was effective in inducing an elevated Th1 immune response in the infected animals. These mice presented a higher IFN- $\gamma$  and NO production, associated with the predominance of *L. amazonensis*-specific IgG2a isotype antibodies. By contrast, control BALB/c mice that had been chronically infected with *L. amazonensis* displayed high levels of IL-4 or IL-10 by splenic and dLN cell cultures, and a higher production of IgG1 isotype antibodies. These results are in agreement with Padigel et al. (2003), who showed that low levels of IL-10 produced by splenic cultures of BALB/c mice infected with *L. amazonensis* can favor a higher production of IFN- $\gamma$  and NO and that low levels of IL-4 are also important to a healing phenotype in the infected animals with *L. amazonensis*.

Macrophages represent the main infected host cells in leishmaniasis and play a relevant role in the immunological

control of intracellular parasitism, through the production of oxygen derivative metabolites (Balaraman et al. 2004). Through the upregulation of NO production within the cells, macrophages can trigger intracellular killing mechanisms of the internalized parasites (Van Assche et al. 2011). Therefore, leishmaniasis treatment efficacy is dependent on synergic interactions between the anti-*Leishmania* effect of drugs and the immune responses of the animals, in turn leading to the production of IFN- $\gamma$  and NO. The present study observed that mice treated with AbM produced high levels of NO. In this context, the increased ability of AbM-treated *L. amazonensis* infected macrophages to produce NO may be associated with the decreased parasite loads observed in these mice. It is also possible that the higher production of IFN- $\gamma$  and lower levels of IL-4 and IL-10 observed in these animals have limited the multiplication of parasites, thus leading to a reduction in the tissue parasitism and, consequently, for the activation of parasite killing mechanisms of the macrophages. In this context, Sorimachi et al. (2001) reported that the *A. blazei* mushroom is able to induce a strong immune-stimulating effect based on the NO production in bone marrow-derived macrophages. Bernardshaw et al. (2006) also showed that the AbM is able to induce the of NO and proinflammatory cytokine (IL-1, IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha) production, but not of the IL-10, in human monocytes. Similarly, Tang et al. (2009) showed that this mushroom is also effective in inducing the production of high levels of IFN- $\gamma$  and low levels of IL-4 and IL-10 in spleen cell supernatants of naive BALB/c mice. Altogether, these data indicate that treatment with AbM induced infected BALB/c mice toward a *L. amazonensis*-specific Th1 immune response that was maintained during infection, allowing these animals to prevent the development of a more severe disease, as was also observed in the control mice.

Prior reports have associated mushroom immune properties with polysaccharide fractions. Similarly,  $\beta$ -glucans fungi have also been reported to activate leukocytes and to increase the phagocytic activity of these cells, monocytes, and granulocytes; the production of reactive oxygen intermediates; as well as the production of inflammatory mediators, such as cytokines and chemokines (Sorimachi et al. 2001; Bernardshaw et al. 2006, 2007). A chemical characterization was performed to provide additional information concerning the chemical entities in the *A. blazei* Murill water extract that may well be responsible for the antileishmanial biological effects observed in the present study. The result illustrated the presence of tannins, saponins, glycoproteins, and polysaccharides within AbM.

Finally, no hepatic toxic effect could be observed in the AbM-treated mice. By contrast, in the animals treated with AmpB, significant elevations in the ALT and AST levels could be detected, indicating a possible hepatic damage caused by the use of AmpB in the animals, as previously described by Croft and Coombs (2003). In this context, the

present study's results are in agreement with findings from Hsu et al. (2008) and Wu et al. (2011), whose studies showed that in vivo treatment with *A. blazei* led to the reduction of ALT and AST levels in rats in models of chronic hepatitis B and hepatic fibrosis, respectively, as well as induced a healing phenotype in the treated and infected animals.

In conclusion, this study's data show that the *A. blazei* Murill water extract presents a high potential to be employed in the treatment of leishmaniasis, although additional studies are necessary to determine its efficacy in association with well-known therapeutic products, as well as its efficacy in other mammal models.

**Acknowledgments** This work was supported by grants from Pró-Reitoria de Pesquisa from UFMG (Edital 08/2011), FAPEMIG (CBB-APQ-00496-11, CBB-APQ-02364-08, and CBB-APQ-00496-11), CNPq (APQ-472090/2011-9), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica (INCT NANO-BIOFAR), and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Vacinas (INCT-V), CNPq. DGV, APF, and EAFC are grant recipient of CNPq, while MACF is a grant recipient of CAPES. This study was in part supported in Spain by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación FIS/PI1100095.

## References

- Afonso LC, Scott P (1993) Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. Infect Immun 61:2952–2959
- Aguiar MG, Silva DL, Nunan FA, Nunan EA, Fernandes AP, Ferreira LAM (2009) Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. J Antimicrob Chemother 64:1234–1240
- Aguiar MG, Pereira AMM, Fernandes AP, Ferreira LAM (2010) Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Antimicrob Agents Chemother 54:4699–4704
- Balaraman S, Tewary P, Singh VK, Madhubala R (2004) *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. Biochem Biophys Res Commun 317:639–647
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi G Jr, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro-de-Jesus A, Almeida R, Badaró R, Barral-Netto M, Carvalho EM, Johnson WD Jr (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg 44:536–546
- Berman J (2003) Current treatment approaches to leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis 16:397–401
- Berman F (2005) Clinical status of agents being developed for leishmaniasis. Expert Opin Invest Drugs 14:1337–1346
- Bernardshaw S, Hetland G, Ellertsen LK, Tryggestad AM, Johnson E (2005) An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill differentially stimulates production of pro-inflammatory cytokines in human monocytes and human vein endothelial cells *in vitro*. Inflammation 29:147–153
- Bernardshaw S, Hetland G, Ellertsen LK, Tryggestad AMA, Johnson E (2006) An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill differentially stimulates production of pro-inflammatory cytokines in human monocytes and human vein endothelial cells *in vitro*. Inflammation 29:147–153
- Bernardshaw S, Lyberg T, Hetland G, Johnson E (2007) Effect of an extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill on expression of adhesion molecules and production of reactive oxygen species in monocytes and granulocytes in human whole blood *ex vivo*. APMIS 115:719–725
- Coelho EAF, Tavares CAP, Carvalho FAA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, Matlashedewski G, Gazzinelli RT, Fernandes AP (2003) Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. Infect Immun 71:3988–3994
- Croft SL, Coombs GH (2003) Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends Parasitol 19:502–508
- Croft SL, Olliaro P (2011) Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. Clin Microbiol Infect 17:1478–1483
- Cupolilo SM, Souza CS, Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Goncalves da Costa SC (2003) Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. Histol Histopathol 18:1059–1065
- Forland DT, Johnson E, Tryggestad AM, Lyberg T, Hetland G (2010) An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production *in vitro*. Cytokine 49:245–250
- Frézard F, Demicheli C (2009) New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. Expert Opin Drug Deliv 7:1343–1358
- Grimaldi G Jr, Tesh RB (1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev 6:230–250
- Hsu CH, Hwang KC, Chiang YH, Chou P (2008) The mushroom *Agaricus blazei* Murill extract normalizes liver function in patients with chronic hepatitis B. J Altern Complement Med 14:299–301
- Kedzierski L, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Andrews PC, Junk PC, Kedzierska K (2009) Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. Curr Med Chem 16:599–614
- Kim YW, Kim KH, Choi HJ, Lee DS (2005) Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. Biotechnol Lett 27:483–487
- Kim CF, Jiang JJ, Leung KN, Fung KP, Lau CB (2009) Inhibitory effects of *Agaricus blazei* Murill extracts on human myeloid leukemia cells. J Ethnopharmacol 122:320–326
- Mondal S, Bhattacharya P, Rahaman M, Ali N, Goswami RP (2010) A curative immune profile one week after treatment of Indian kala-azar patients predicts success with a short-course liposomal amphotericin B therapy. PLoS Negl Trop Dis 27:e764
- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA (2011) Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. Acta Trop 118:87–96
- Padigel UM, Alexander J, Farrell JP (2003) The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. J Immunol 171:3705–3710
- Sorimachi K, Akimoto K, Ikebara Y, Inafuku K, Okubo A, Yamazaki S (2001) Secretion TNF- $\alpha$ , IL-12 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions *in vitro*. Cell Struct Funct 26:103–108
- Talcott JA, Clark JA, Lee IP (2007) Measuring perceived effects of drinking an extract of basidiomycetes *Agaricus blazei* Murill: a survey of Japanese consumers with cancer. BMC Complement Alternat Med 29:7–32
- Tang NY, Yang JS, Lin JP, Hsia TC, Fan MJ, Lin JJ, Weng SW, Ma YS, Lu HF, Shen JJ, Lin JG, Chung JG (2009) Effects of *Agaricus blazei* Murill extract on immune responses in normal BALB/c mice. In Vivo 23:761–766
- Valadares DG, Duarte MC, Oliveira JS, Chávez-Fumagalli MA, Martins VT, Costa LE, Leite JPV, Santoro MM, Régis WCB, Tavares CAP,

- Coelho EAF (2011) Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. Parasitol Int 60:357–363
- Van Assche T, Deschacht M, Da Luz RA, Maes L, Cos P (2011) *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. Free Radic Biol Med 51:337–351
- Vieira LQ, Goldschmidt M, Nashleanas M, Pfeffer K, Mak T, Scott P (1996) Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. J Immunol 157:827–835
- World Health Organization (2000) The disease and its impact. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html>
- Wu MF, Hsu YM, Tang MC, Chen HC, Chung JG, Lu HF, Lin JP, Tang NY, Yeh C, Yeh MY (2011) *Agaricus blazei* Murill extract abrogates CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. In Vivo 25:35–40



## Prophylactic or therapeutic administration of *Agaricus blazei* Murill is effective in treatment of murine visceral leishmaniasis

Diogo G. Valadares<sup>a</sup>, Mariana C. Duarte<sup>b</sup>, Laura Ramírez<sup>c</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>d</sup>, Vivian T. Martins<sup>a</sup>, Lourena E. Costa<sup>e</sup>, Paula S. Lage<sup>e</sup>, Tatiana G. Ribeiro<sup>f</sup>, Rachel O. Castilho<sup>g</sup>, Ana Paula Fernandes<sup>h</sup>, Wiliam C.B. Régis<sup>i,j</sup>, Manuel Soto<sup>c</sup>, Carlos A.P. Tavares<sup>a</sup>, Eduardo A.F. Coelho<sup>b,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>f</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>g</sup> Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>h</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

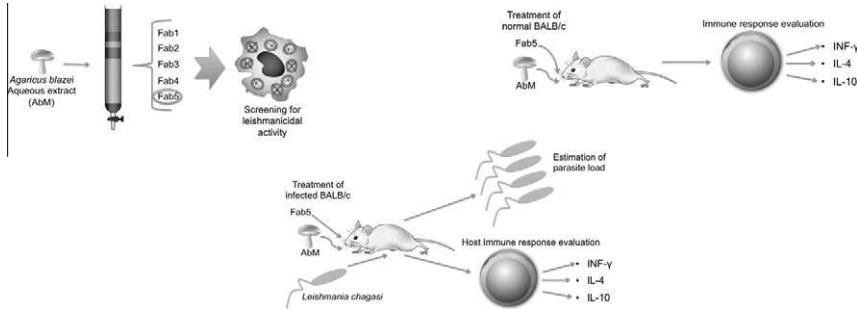
<sup>i</sup> Minasfungi do Brasil Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>j</sup> PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### HIGHLIGHTS

- Leishmanicidal activity from fractions purified from *Agaricus blazei* extract (AbM).
- Treatment of BALB/c mice infected with *Leishmania chagasi*.
- Evaluation using parasitological and immunological parameters.
- Efficacy in the prevention and treatment using Fab5 or AbM.
- Therapeutic alternative to visceral leishmaniasis.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 March 2012

Received in revised form 11 June 2012

Accepted 12 July 2012

Available online 20 July 2012

#### Keywords:

Visceral leishmaniasis  
*Agaricus Blazei* Murill  
Purified fractions  
Chemo-prophylaxis  
Oral treatment  
BALB/c mice

### ABSTRACT

The present study aimed to investigate the *in vitro* antileishmanial activity of five fractions obtained from *Agaricus blazei* water extract (AbM), namely, Fab1, Fab2, Fab3, Fab4, and Fab5; and use the selected leishmanicidal fraction to treat BALB/c mice infected with *Leishmania chagasi*. A curve dose–titration was performed to obtain the concentration to be test in infected animals. In this context, Fab5 fraction and AbM were used in the doses of 20 and 100 mg/kg/day, respectively, with the product been administered once a day. The effect induced by a chemo-prophylactic regimen, based on the administration Fab5 fraction and AbM 5 days before infection, and maintained for an additional 20 days post-infection was compared to a therapeutic regimen, in which the compounds were administered from 0 to 20 days of infection. Control animals were either treated with amphotericin B deoxycholate (AmpB) or received distilled water. All groups were followed up for 10 weeks post-infection, when parasitological and immunological parameters were analyzed. The Fab5 presented the best results of *in vitro* leishmanicidal activity. In the *in vivo* experiments, the use of Fab5 or AbM, as compared to control groups, resulted in significant reduced parasite burdens in the liver, spleen, and draining lymph nodes of the infected animals, as compared to control groups.

\* Corresponding author at: Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses, Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Fax: +55 31 3409 4983.

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F. Coelho).

A Type 1 immune response was observed in the Fab5 or AbM treated animals. No significant toxicity was observed. The chemo-prophylactic regimen proved to be more effective to induce these responses. In this context, the data presented in this study showed the potential of the purified Fab5 fraction of AbM as a therapeutic alternative to treat visceral leishmaniasis. In addition, it can be postulated that this fraction can be also employed in a chemo-prophylactic regimen associated or not with other therapeutic products.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Leishmaniasis is a group of vector-transmitted diseases that are endemic in 88 tropical and subtropical countries. Many geographic regions are endemic for multiple *Leishmania* species. This is the case in South America, where the disease is caused by at least eight different species of *Leishmania* (World Health Organization, 2009). American tegumentary leishmaniasis (ATL) includes some forms that commonly refer to their clinical and pathologic features: cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL), and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) (Grimaldi and Tesh, 1993). By contrast, human and canine visceral leishmaniasis (VL) in South America is mostly related to infections with *Leishmania chagasi* (Maia and Campino, 2008).

The current treatment for leishmaniasis has been based on the use of pentavalent antimonials. The parenteral administration of these compounds is still the first choice for therapy; however, increased parasite resistance and several side effects are important problems reported by patients (Croft and Coombs, 2003; Minodier and Parola, 2007). Liposomal amphotericin B (AmpB) is effective, but highly cost for the majority of patients (Mondal et al., 2010). Results from clinical trials of oral miltefosine treatment are encouraging; however, therapy is linked to potential toxicity, resistance, and teratogenicity, and should not be given to pregnant or to childbearing age women (Oliveira et al., 2011a). Therefore, the development of new therapeutic strategies to treat leishmaniasis has become a high-priority (Frézard and Demicheli, 2010). In this context, major emphases have been given to the identification of new and lower toxic compounds and alternative administration routes (Garnier and Croft, 2002; Berman, 2005; Giudice and Campbell, 2006; Aguiar et al., 2010; Carneiro et al., 2010).

*Agaricus blazei* Murill is a commonly found mushroom in Brazil, and its use has been associated with folk medicine in the treatment of some diseases, like leukemia, cancer, and arterial hypertension (Kim et al., 2005; Talcott et al., 2007; Kim et al., 2009). Compounds, such as  $\beta$ -D-glucans, glycoproteins, saponins, tannins, cerebrosides, polysaccharides, steroids, such as ergosterol, and fatty acids have been detected in this mushroom, which have been shown to activate and/or modulate the host immune response (Sorimachi et al., 2001; Bernardshaw et al., 2005; Forland et al., 2010). Recently, an *in vitro* antileishmanial activity against *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and *L. major* was demonstrated for an *A. blazei* water extract (Valadares et al., 2011).

The present study investigated the antileishmanial activity of five purified fractions of the *A. blazei* water extract, namely, Fab1, Fab2, Fab3, Fab4, and Fab5. For those fractions presenting the best anti-*L. chagasi* activity *in vitro* (Fab4 and Fab5), as well as for the *A. blazei* water extract (AbM), the leishmanicidal activity on intramacrophage *Leishmania*, as well as cytotoxic effect on murine macrophages and human red blood cells, were studied. Afterwards, the Fab5 and AbM were tested *in vivo* using the experimental infection of BALB/c mice with as the model, through comparison of chemo-prophylactic and therapeutic regimens. Their effects were also compared with the parenteral administration of AmpB by examining parasitological and immunological parameters. Besides, a phytochemical screening was carried out in the AbM and Fab5, in order

to indicate the substances involved in the therapeutic efficacy of the both products.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mice and parasites

The Committee on the Ethical Handling of Research Animals (CEUA) from the Federal University of Minas Gerais (UFMG) approved all animal handling methods and procedures (code 056/2010). Female BALB/c mice (8 weeks of age) were obtained from the breeding facilities of the Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, UFMG, and were maintained under specific pathogen-free conditions. *L. chagasi* (MHOM/BR/1970/BH46) was grown at 24 °C in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO, USA), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, at pH 7.4. The soluble *L. chagasi* antigenic extract (SLA) was prepared from a  $1 \times 10^{10}$  stationary-phase promastigotes, as described (Coelho et al., 2003).

### 2.2. Preparation of the *A. blazei* water extract and purified fractions

For AbM water extract preparation, 28 g of the fresh mushroom was macerated in 50 mL of milli-Q water containing a protease inhibitor cocktail (Sigma, code P8340). The product was macerated in an ice bath and maintained for 1 h at 4 °C, at which time it was filtered on paper filter to remove the insoluble particles. Lately, the AbM was submitted to centrifugations at 8.000g for 45 min at 4 °C, using different Amicon columns with different molecular weight cut-off (daltons – Da). Thus, Fab5 (molecules > 100,000 Da), Fab4 (between 100,000 and 50,000 Da), Fab3 (between 50,000 and 10,000 Da), Fab2 (between 10,000 and 3000 Da), and Fab1 (<3000 Da) were selected. The AbM and the purified fractions were lyophilized and maintained at –80 °C, until use.

### 2.3. Chemicals

Acetonitrile and methanol (HPLC grade) were purchased from Tedia (Fairfield, OH, USA) and J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), respectively. Concentrated phosphoric acid (85% w/v, Merck, Darmstadt, Germany) was used. Ultrapure water was obtained using a Milli-Q plus system (Millipore, Milford, MA, USA). HPLC grade reference substances used were gallic acid (GA, 98%); epigallocatechin (EGC, 90%), catechin (C, min. 98%), epigallocatechin gallate (EGCG, 95%), epicatechin (EC, 90%); epigallocatechin gallate (EGCG, 95%), purchased from Sigma (Milwaukee, WI, USA).

### 2.4. Phytochemical analysis and HPLC characterization of AbM and Fab5

The presence of tannins, flavonoids, coumarins, quinones, alkaloids, triterpenes and steroids and saponins was evaluated in AbM and Fab5 by thin layer chromatography (TLC) analysis and specific

reagents (Wagner et al., 1984). Analyses were carried out on the Waters 2995 system (USA) composed of quaternary pump, auto sampler (model 2695), photodiode array detector (model 2996) and Empower software for data processing. An ODS C-18 LiChrospher® (125 × 4.0 mm ID, 5 µm; Merck) was employed at a temperature of 30 °C and flow rate of 1.0 mL/min. UV-photodiode array detection was performed at  $\lambda$  210 nm. UV spectra from  $\lambda$  210 to 400 nm were recorded on line for peak identification. A linear gradient of aqueous 0.1% phosphoric acid (A) and acetonitrile (B) was employed: A–B (95:5, v/v) to A–B (5:95, v/v), in 60 min, followed by 5 min of linear gradient 95% de A and 5% B. The AbM, Fab5 and reference compounds (GA, EGC, C, GC, EGCG) were dissolved in methanol to concentrations of 10, 5 and 1 mg/mL, respectively (Tarascou et al., 2010). After centrifugation at 8400g for 10 min, a volume of 10 µL of the sample solutions were automatically injected onto the apparatus. The presence of GA in AbM and Fab5 was also confirmed for co-injection experiments. Proteins were detected in SDS-PAGE 10% gels by silver staining, while glycoproteins presence were demonstrated in SDS-PAGE 10% stained by periodic acid Schiff. The presence of carbohydrates was investigated using a phenol-sulfuric acid method (Dubois et al., 1956).

#### 2.5. Evaluation of the *in vitro* antileishmanial activity of the *A. blazei* preparations

The activity of the purified fractions of *A. blazei* was assessed *in vitro* by cultivating promastigotes of *L. chagasi* ( $4 \times 10^5$  cells) in the presence of different individual concentrations (10–200 µg/mL) of Fab1, Fab2, Fab3, Fab4, and Fab5 on 96-well culture plates (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) for 48 h at 24 °C. Cell viability was assessed by measuring the cleavage of 2 mg/mL of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma). Absorbance levels were measured by using a multi-well scanning spectrophotometer (Labtrade, model 660) at a wavelength of 570 nm. As controls, AbM (10–200 µg/mL) and AmpB (0.1–10 µg/mL, Sigma, code A9528) were assayed. All analyses were performed in triplicate, and the product concentrations needed to inhibit 50% of the parasites viability ( $IC_{50}$ ) were calculated by applying a sigmoidal regression of the concentration–inhibition curves.

#### 2.6. Citotoxicity and hemolytic activity

Citotoxicity was evaluated by an MTT assay by cultivating macrophages ( $4 \times 10^5$ ) in different concentrations (10–200 µg/mL) of Fab4, Fab5, or AbM on 96-well plates for 24 h. Analyses were performed in triplicate, and the product concentrations needed to inhibit 50% of the macrophage viability ( $CC_{50}$ ) was calculated by applying a sigmoidal regression of a concentration–inhibition curve. As control, AmpB (0.1–10 µg/mL) was assayed. In addition, the hemolytic activity was evaluated by incubating the Fab4, Fab5, or AbM at different individual concentrations (10–200 µg/mL), using a 5% red blood cell (human O<sup>+</sup>) suspension for 1 h at 37 °C, in which the erythrocyte suspension was centrifuged (1000g for 10 min), and cell lysis was determined spectrophotometrically (540 nm). Analyses were also performed in triplicate, and the product concentrations needed to produce the lysis of 50% of the red blood cells ( $RBC_{50}$ ) was calculated by applying a sigmoidal regression of a concentration–inhibition curve.

#### 2.7. Treatment of infected macrophages

Murine peritoneal macrophages were plated on round glass coverslips within the wells of a 24-well culture plate (Nunc, Nunclon®, Roskilde, Denmark) at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells per coverslip in RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, at

pH 7.4. After 2 h of incubation at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>, stationary-phase promastigotes of *L. chagasi* were added to the wells ( $5 \times 10^6$ ), and the cultures were incubated for 4 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Next, free parasites were removed by extensive washing with an RPMI 1640 medium, and infected macrophages either remained non-treated or were treated for 48 h with the Fab4, Fab5, AbM or AmpB (10, 10, 50 and 1 µg/mL, respectively). Cells were washed in RPMI 1640, incubated with 4% paraformaldehyde for 15 min, treated with 70% ethanol in an ice-bath for 4 h and, finally, washed three times with sterile PBS. The percentage of infected cells and the number of amastigotes per macrophage were analyzed by counting 200 cells, in triplicate, and treated and non-treated macrophages were compared.

#### 2.8. *In vivo* regimens

Different mice groups were employed ( $n = 12$ , per group). Two groups received the Fab5 fraction or the AbM (20 and 100 mg/kg/day, respectively), 5 days before infection by oral route. Two other independent mice groups received the same treatment, at 0-day of infection. For all four groups, treatment was continued for up to 20 days post-infection. Control groups were treated with amphotericin B deoxycholate (AmpB, 5 mg/kg/day, Sigma, code A9528) from days 0 to 20 post-infection by parenteral route or received distilled water. Additional animals received an oral administration schedule with Fab5 or AbM for 20 days and were not infected. All groups were treated once a day.

#### 2.9. Infection

Mice were infected in their right hind footpad with  $1 \times 10^7$  stationary-phase promastigotes of *L. chagasi*. All animals received follow-up for 10 weeks, at which time they were euthanized, and the liver, spleen, and draining lymph nodes (dLN) were collected to determine parasite burden and cytokine evaluation in the same period of time.

#### 2.10. Estimation of parasite load

The spleen, liver, and dLN of the infected mice were used for parasite quantitation, following a technical protocol previously described (Vieira et al., 1996). Briefly, organs were weighted and homogenized, using a glass tissue grinder in sterile PBS. Tissue debris was removed by centrifugation at 150g, and cells were concentrated by centrifugation at 2000g. The pellet was resuspended in 1 mL of Schneider's medium supplemented with 20% FBS. Two hundred and twenty microliters of the suspension were plated onto 96-well flat-bottom microtiter plates (Nunc) and diluted in log-fold serial dilutions in supplemented Schneider's culture medium at a  $10^0$ – $10^{-20}$  dilution. Each sample was plated in triplicate and read 12 days after the beginning of the culture at 24 °C. Pipette tips were discarded after each dilution to avoid carrying adhered parasites from one well to another. Results are expressed as the negative log of the titer (i.e., the dilution corresponding to the last positive well) adjusted per microgram of tissue.

#### 2.11. Cytokine analysis

To measure IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10, the spleen cells ( $5 \times 10^6$  cells) were collected in the same time when the parasite load was evaluated in the animals and cells were stimulated with SLA (50 µg/mL), Fab5 or AbM (10 µg/mL, each one), in duplicate, on 24-well flat-bottomed plates (Nunc) for 48 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. The levels of IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 were determined in the culture supernatants, using commercial kits (BD OptEIA™, Pharmingen), according to manufacturer instructions.

**Table 1**Analysis of *L. chagasi* promastigotes viability after treatment.

Substances	Concentration range ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>
Fab1	10–200	$220.0 \pm 2.8$
Fab2	10–200	$317.0 \pm 3.3$
Fab3	10–200	$218.0 \pm 2.6$
Fab4 <sup>b</sup>	10–200	$15.8 \pm 1.2$
Fab5 <sup>b</sup>	10–200	$13.0 \pm 1.3$
Water extract (AbM)	10–200	$67.4 \pm 1.7$
Amphotericin B	0.1–10	$1.0 \pm 0.9$

<sup>a</sup> Inhibition of *Leishmania* viability (50%) calculated by applying sigmoidal regression of the concentration–inhibition curves. Mean  $\pm$  standard deviation is indicated.

<sup>b</sup> Statistical difference between the Fab4 and Fab5 groups and AbM group ( $P < 0.001$ ).

## 2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (version 5.0 for Windows). The differences were evaluated by the one-way ANOVA analysis, followed by the post-Bonferroni test for comparisons among *in vitro* results and by the Tukey post-test for comparisons among *in vivo* experimental groups. All differences were considered significant when  $P < 0.05$ . Data shown are representative of three separate experiments, which presented similar results.

## 3. Results

### 3.1. In vitro efficacy of the Fab4 and Fab5 fractions from *A. blazei* water extract against *L. chagasi*

To analyze the *in vitro* effects in *Leishmania* viability of the different fractions obtained from AbM, stationary-phase promastigotes of *L. chagasi* were treated with different concentrations of the fractions to calculate the  $\text{IC}_{50}$  (Table 1). The Fab4 and Fab5 fractions presented the best results concerning the inhibition of the parasite viability, with  $\text{IC}_{50}$  values of  $15.8 \pm 1.2$  and  $13.0 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ , respectively, which were lower than those detected for the AbM. Since the  $\text{IC}_{50}$  values for Fab1, Fab2, and Fab3 were higher than those for the AbM ( $220.0 \pm 2.8$ ,  $317.0 \pm 3.3$  and  $218.0 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$ , respectively) these fractions were discarded from further analysis. In a subsequent step, the toxicity of the AbM, Fab4, and the Fab5 fractions was evaluated. Murine macrophage viability ( $\text{CC}_{50}$ ) and the lysis of red blood cell suspensions ( $\text{RBC}_{50}$ ) were evaluated after treatment with the *Agaricus* preparations. The high  $\text{CC}_{50}$  and  $\text{RBC}_{50}$  values observed for AbM, as well as for both fractions (Table 2), demonstrated the low cytotoxicity of

the preparations. When the selectivity index ( $\text{SI} = \text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$ ) was calculated, the values encountered for the Fab4 and Fab5 fractions were higher than that obtained for the AbM, mainly due to the high  $\text{IC}_{50}$  value of this latter preparation. Since it has been postulated that candidates for new treatment regimens should present an SI value higher than 20 (Nwaka and Hudson, 2006), data from the present study indicate that the tested fractions can improve AbM properties.

The capacity of the AbM, as well as of the Fab4 and Fab5 fractions, to treat *in vitro* infected macrophages was also evaluated. Murine macrophages were infected with stationary-phase promastigotes of *L. chagasi* and later treated with the fractions ( $10 \mu\text{g/mL}$ , each one), for 48 h at  $24^\circ\text{C}$ . The results showed that non-treated and infected macrophages presented 57% of the infection, with an average of 2.0 amastigotes per cell. The AbM treatment decreased the number of infected cells and the average number of amastigotes per cell (24.5 and 1.7 cells, respectively). Furthermore, treatment with Fab4 and Fab5 induced the highest decrease in the percentage of infected macrophages (4.0 and 1.7 cells, respectively) as well as in the average number of amastigotes per cell (0.8 and 0.4 cells, respectively) (Table 2). Comparing the data obtained with both fractions, the Fab5 displayed the best capacity to induce the *in vitro* reduction in the number of intracellular amastigotes.

### 3.2. In vivo treatment using the Fab5 or AbM against *L. chagasi*

Based on the *in vitro* results, Fab5 was selected for the *in vivo* experiments in order to treat BALB/c mice against *L. chagasi* infection. The fraction was applied to the animals before (in a chemo-prophylactic regimen) or after (in a therapeutic regimen) infection with stationary-phase promastigotes of *L. chagasi*. As controls, one independent mouse group was treated with AmpB at the 0-day of infection, while control group received distilled water. A dose–titration curve was performed in order to determine the concentration of Fab5 and AbM able to reduce significantly the tissue parasitism in treat mice. We observed that the concentration of 20 and 100 mg/kg/day, respectively, administered once a day, during 20 days post-infection, gave the best results in treating animals.

As shown in Fig. 1, mice from groups treated with the *Agaricus* preparations (AbM or Fab5), by the both treatment regimens—therapeutic (tAbM and tF5) versus chemo-prophylactic (cAbM and cF5), as compared to the control group that received distilled water, displayed significant reductions in the parasite burdens in all evaluated organs. In addition, parasite loads found in the three organs from the *Agaricus*-treated mice were significantly lower than those detected in mice treated with AmpB, except in the liver from animals treated with the AbM preparations. Comparing the efficacy

**Table 2**Cytotoxicity and treatment of infected macrophages<sup>a</sup>.

Substances <sup>b</sup>	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	SI	$\text{RBC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Percentage of infected macrophages/number of amastigotes per cell <sup>c</sup>	Percentage of infected macrophages after treatment/number of amastigotes per cell <sup>d</sup>
Fab4	$15.8 \pm 1.2$	$662.8 \pm 1.5$	41.9	$682.4 \pm 1.8$	57.0/2.0	4.0/0.8
Fab5	$13.0 \pm 1.3$	$674.4 \pm 2.4$	51.9	$772.1 \pm 2.0$	57.0/2.0	1.7/0.4
AbM	$67.4 \pm 1.7$	$675.0 \pm 2.1$	10.0	$770.5 \pm 1.7$	57.0/2.0	24.5/1.7
AmpB	$1.0 \pm 0.9$	$7.6 \pm 2.0$	8.8	N.D. <sup>e</sup>	57.0/2.0	4.0/2.8

<sup>a</sup> Murine peritoneal macrophages were employed in cytotoxicity and *in vitro* treatment assays:  $4 \times 10^5$  and  $5 \times 10^5$  cells per well, respectively. Erythrocyte suspensions ( $0^\circ$  human red blood cells) were employed in hemolytic assays.

<sup>b</sup> For SI and  $\text{RBC}_{50}$  determination a concentration range of 10.0–200.0  $\mu\text{g/mL}$  was employed for Fab4, Fab5 and the AbM groups. Amphotericin B (AmpB) was assayed at a concentration range of 0.1–10.0  $\mu\text{g/mL}$  for SI determination. For treatment of infected macrophages, cells were incubated with the Fab4, Fab5, AbM or AmpB (10.0, 10.0, 50.0 and 1.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectively).

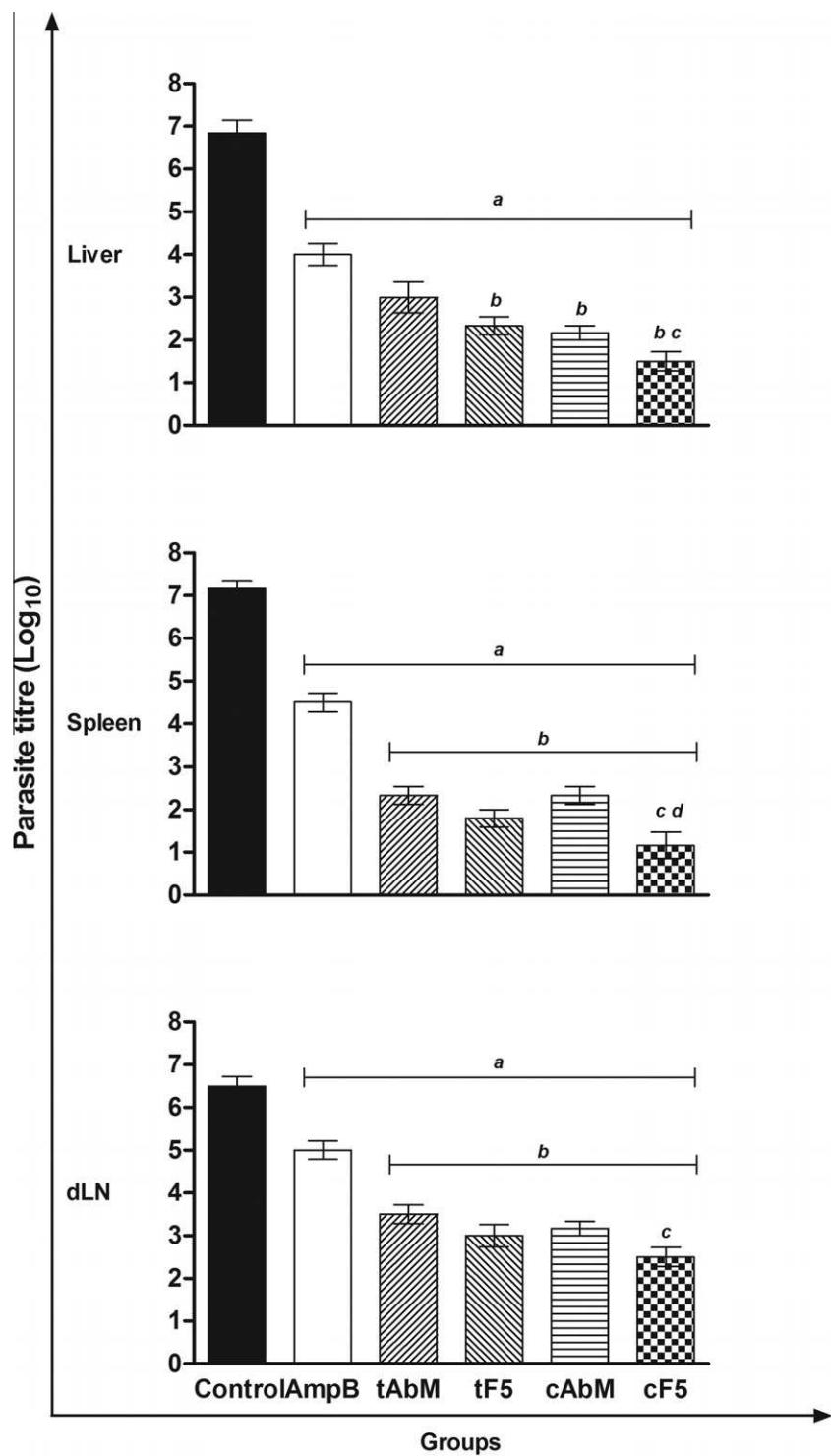
<sup>c</sup> The 50% inhibition of the macrophage viability ( $\text{CC}_{50}$ ) or red blood cell lysis ( $\text{RBC}_{50}$ ) were calculated by applying the sigmoidal regression of the concentration–inhibition curves.

<sup>d</sup> The percentage of infected macrophages and the number of amastigotes per cell were determined by counting 200 cell coverslips, in triplicate.

<sup>e</sup> N.D.: Not done.

in reducing the parasite load in the animals treated with AbM or Fab5, animals treated with the Fab5 fraction presented a lower number of parasites than did those treated with the entire extract, although differences were not statistically significant. Interestingly, Fab5 chemo-prophylactic administration proved to be more

effective than chemotherapeutic regimen, since mice included in the cF5 group showed lower parasite loads from all groups. This reduction is especially noticeable in the spleen, the internal organ that shows the chronic presence of the parasites after infection with viscerotropic *Leishmania* species, such as *L. chagasi*.

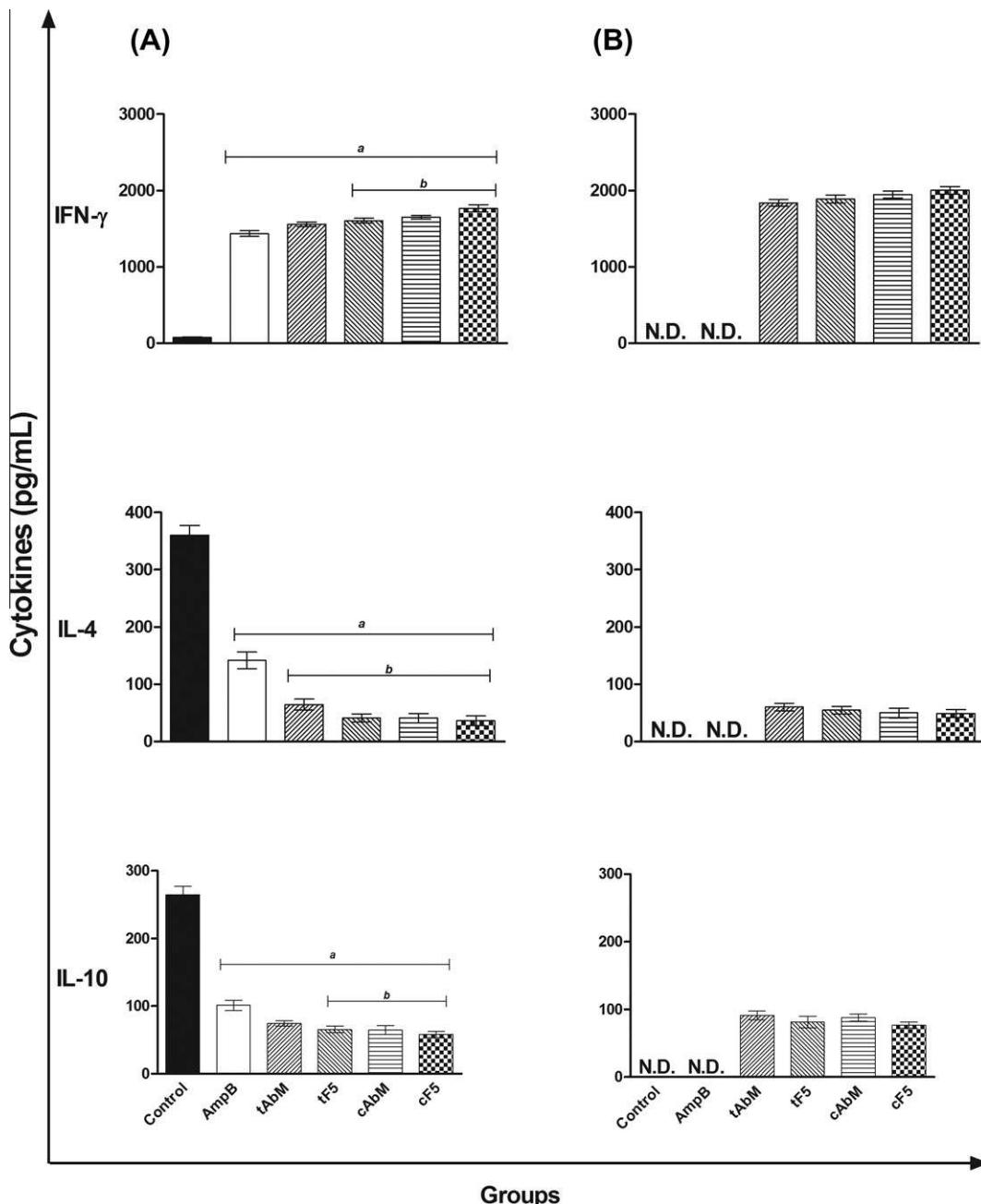


**Fig. 1.** Evaluation of the *in vivo* treatment against *L. chagasi*. BALB/c mice ( $n = 12$  per group) were infected in the right hind footpad with  $10^7$  stationary-phase promastigotes of *L. chagasi*. At week 10 post-infection, mice were euthanized, and the parasite load was determined in their livers, spleens, and dLN. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of the groups. Significant differences among the groups are indicated by letters in the graphs: "a" indicates significant difference between the control group (distilled water) and the others; "b" indicates significant difference between the AmpB group and tAbM (AbM treatment), tF5 (Fab5 treatment), cAbM (AbM chemoprophylaxis), or cF5 (Fab5 chemoprophylaxis) groups; "c" indicates significant difference between the indicated groups with respect the tAbM group, and "d" indicates significant difference between cF5 and tF5 groups ( $P < 0.05$ ).

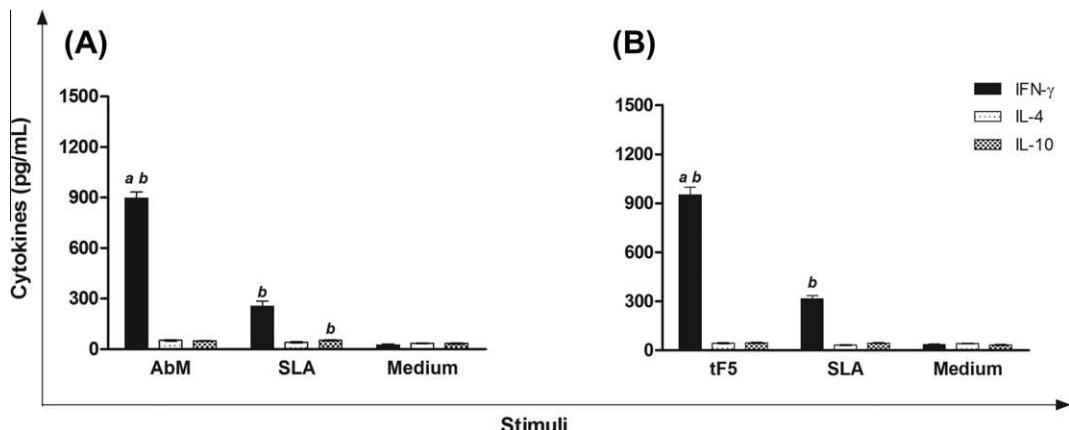
### 3.3. Cellular immune response elicited after Fab5, AbM or AmpB treatments

To analyze the immune state induced by the administration of the *Agaricus* preparations, the production of IFN- $\gamma$  (cytokine associated with protection) or IL-4 and IL-10 (cytokines associated with susceptibility) was determined in mice groups at 10 weeks post-infection. For this purpose, spleen cell cultures were stimulated with soluble *Leishmania* antigens (SLA, all groups), with AbM (for mice receiving AbM extract), or with Fab5 (for mice receiving the fraction).

Regarding the SLA induced production of cytokines, results from Fig. 2A shows that mice included in groups treated with the *Agaricus* preparations (AbM or Fab5) presented higher levels of IFN- $\gamma$ , and lower IL-4 and IL-10 levels than infected mice that received distilled water or that were treated with AmpB (except for the tAbM-treated mouse group, which displayed similar IFN- $\gamma$  and IL-10 levels). Thus, a relation between the induction of Th1 response against parasite proteins and treatment success could be observed. Interestingly, as shown in Fig. 2B, a specific-Th1 response for the *Agaricus* preparations (AbM or Fab) could also be observed in mice treated with the fungal preparations after parasite



**Fig. 2.** Production of cytokines by spleen cell cultures of treated and infected BALB/c mice. Single-cell suspensions were obtained from the spleens of non-treated or treated and infected mice, at 10 weeks post-infection. In panel A, cells were stimulated with SLA (50  $\mu$ g/mL). In panel B, cultures were stimulated with Fab5 or AbM (10  $\mu$ g/mL each), for 48 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 levels were measured in culture supernatants by ELISA. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of the groups. Non-stimulated spleen cell cultures (background control) represented the basal production of the cytokines. Significant differences among the groups are indicated by letters in the graphs: "a" indicates significant difference between the control group and the others; "b" indicates significant difference between the AmpB group and tAbM (AbM treatment), tF5 (Fab5 treatment), cAbM (AbM chemoprophylaxis), and cF5 (Fab5 chemoprophylaxis) groups ( $P < 0.05$ ). ND: not detected.



**Fig. 3.** Production of cytokines by spleen cell cultures of treated BALB/c mice. Single-cell suspensions were obtained from the spleens of mice treated with AbM (in A) or Fab5 (in B), at 0-day (before) infection. Cells were stimulated with SLA *L. chagasi* (50 µg/mL) (all groups), AbM, or Fab5 fraction (10 µg/mL each one) for 48 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 levels were measured in culture supernatants by ELISA. Bars indicate the mean ± standard deviation (SD) of the groups. Non-stimulated spleen cell cultures (background control) represented the basal production of the cytokines. Statistical difference among the groups is indicated by letters in the graphs ( $P < 0.05$ ). “a” indicates significant difference between the control group and the others; “b” indicates significant difference between the AmpB group and tAbM (AbM treatment), tFab5 (Fab5 treatment), cAbM (AbM chemoprophylaxis), and cFab5 (Fab5 chemoprophylaxis) groups.

infection, since the spleen cells from these mice were able to secrete high levels of IFN- $\gamma$  and moderate levels of IL-4 and IL-10 after stimulation with the respective *Agaricus* extracts. These data suggest that the administration of the *Agaricus* preparations induces a specific immune response with a Th1 profile.

To analyze the immune response elicited by the *Agaricus* preparations before infection, spleen cells from mice treated orally with AbM or Fab5 were *in vitro* cultured without stimulus or separately stimulated with the corresponding fungal product (AbM or Fab5), and the levels of IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 was monitored in the supernatants. As can be deduced from the cytokine profiles shown in Fig. 3A for mice treated with the AbM and Fig. 3B for mice treated with the Fab5 fraction, the oral administration of both *Agaricus* preparations was able to induce a Th1 immune response mediated by IFN- $\gamma$  production.

#### 3.4. Chemical analysis of AbM and Fab5

Phytochemical screening carried out for AbM and Fab5 indicated the presence of glycoproteins, carbohydrates and tannins. The AbM and Fab5 profile showed six major peaks with retention times around 1.131, 1.250, 1.672, 2.425, 4.425 and 7.082 min. The UV spectra recorded on line for these peaks indicated similar wavelength absorption around 260 and 280 nm. Gallic acid (GA), epigallocatechin, catechin, epicatechin, gallicatechin and epigallocatechin gallate solutions were also analyzed as reference compound, employing the same chromatographic conditions. A GA standard solution, produced a peak with identical retention time and UV spectrum, retention time 2.425 min and UV spectra with wavelength maximum 271 nm (data not shown).

#### 4. Discussion

The search for new products to treat VL has received considerable attention. Since in a previously published work it was described that an aqueous extract of the *A. blazei* mushroom (AbM) had antileishmanial properties when assayed *in vitro* (Valadares et al., 2011) we decided to investigate in more detail these properties using an *in vivo* model. Different fractions, segregated on the basis of their molecular weight were obtained and one of them, the Fab5 was selected for the *in vivo* studies on the basis on its *in vitro* characteristics: the highest selectivity index (SI), the lowest

cytotoxicity and the highest antileishmanial activity in cultured promastigotes and intracellular amastigotes from all studied fractions (Tables 1 and 2).

A highly stringent model for experimental chemotherapy was selected: BALB/c mice infected with a high infective inoculum (10<sup>7</sup> stationary promastigotes) of *L. chagasi* subcutaneously in the footpad. As it has been recently reported, this model of infection present an imbalance in their immune response that result in the establishment of the infection in the internal organs, including a chronic progressive parasite replication in the spleen (Oliveira et al., 2011b) which also occurs in classical VL models in which parasites were challenged intravenously (Carrión et al., 2006).

From the therapeutic regimen developed, in which a comparative evaluation of AbM or the F5b fraction and AmpB treatment was performed, Fab5 fraction and AbM were more effective, leading to significant reductions in the parasite burdens than treatment with AmpB. Moreover, hepatic damage that resulted in increase in the ALT and AST hepatic enzymes levels was only observed in AmpB treated mice (data not shown), correlating to the data reported by Croft and Coombs (2003) that observed hepatic damage in BALB/c mice when AmpB was used. Previously reported data demonstrated that treatment with AbM reduced ALT and AST levels in a model of hepatic fibrosis in rats (Wu et al., 2011).

By comparing both administration regimens – therapeutic *versus* chemo-prophylactic – it was observed that chemo-prophylactic therapeutic administration was more effective in reducing the degree of infection in the animals than therapeutics (Fig. 1). This higher efficacy can be related with the immune state induced by AbM or Fab5 administration, since these mice were able to mount an IFN- $\gamma$  specific response for the Fab5 or AbM, and low levels of IL-4 and IL-10, prior to infection. These observations are in agreement with previous reports showing that some components of the *Agaricus* mushroom are able to modulate the immune system inducing Th1 responses (Bouike et al., 2009; Tang et al., 2009). Thus, the Th1 response elicited by the pre-treatment may have helped to induce an non-specific cytokine milieu which is required to control of parasite replication in murine VL models, namely, induction of IFN- $\gamma$  and control of IL-4 and mainly IL-10 mediated responses (Stäger et al., 2010; Oliveira et al., 2011b).

After infection a correlation between the reduction of parasite burdens and the specific immune response elicited in the treated mice was found. Non-treated and infected BALB/c mice displayed IL-4 and IL-10 dependent responses against parasite proteins, the

profile of cytokines associated with susceptibility to cutaneous and visceral leishmaniasis (Rhodes and Graham, 2002; Coelho et al., 2003; Basu et al., 2007). By contrast, mice that received AbM, Fab5, or AmpB, were able to produce higher levels of specific IFN- $\gamma$  and lower levels of IL-4 and IL-10, although the more pronounced Th1 immune response could be observed in the animals treated with Fab5 and AbM. These findings correlate with the ability of the *Agaricus* extracts to generate strong immune-stimulating effect, based on the activation of bone marrow-derived macrophages (Sorimachi et al., 2001) and to induce the production of NO and inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ ), but not of the anti-inflammatory IL-10 in human monocytes (Bernardshaw et al., 2006) results in a reduction of the VL disease in this murine model.

Mushroom immune properties have been associated with polysaccharide fractions. Fungi  $\beta$ -glucans have been reported to activate leukocytes and can increase the phagocytic activity of the same cells, such as monocytes and granulocytes; the production of reactive oxygen intermediates; as well as the production of inflammatory mediators, such as cytokines and chemokines (Brown and Gordon, 2003; Bernardshaw et al., 2006; Bernardshaw et al., 2007). In this context, to provide additional information concerning the presence of chemical entities in the Fab5 fraction, a chemical characterization was performed, the results of which indicated the presence of polysaccharides, glycoproteins and tannins.

In relation to polysaccharide fractions, tannins represent a group of phenolic metabolites that exhibit a wide range of *in vitro* biochemical and pharmacological activities, including anti-viral and antimicrobial properties. Treatments of a broad spectrum of diseases with polyphenolic herbal medicines prompted interest in the evaluation of polyphenols as promising antileishmanial agents. Kolodziej and Kiderlen (2005) showed that infected macrophages augmented and prolonged activation of host defense mechanisms after incubation with different tannins classes and purposed that the effects of polyphenols can present beneficial effects in various infectious conditions, although *in vivo* experiments are essential to prove the therapeutic benefits of polyphenolic immunomodulators.

In conclusion, the data presented in this study showed the potential of the purified Fab5 fraction of AbM as a therapeutic alternative to treat visceral leishmaniasis. In addition, it can be suggested that Fab5 may be also employed in a chemo-prophylactic regimen.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Pró-Reitoria de Pesquisa from UFMG (Edital 08/2011), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; CBB-APQ-00496-11 and CBB-APQ-02364-08), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; APQ-472090/2011-9), the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica (INCT Nano-BIOFAR), and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Vacinas (INCT-V). This study was also, in part, supported in Spain by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación FIS/PI1100095. DGV and EAFC are grant recipient of CNPq, while MACF is a grant recipients of CAPES.

## References

- Aguiar, M.G., Pereira, A.M.M., Fernandes, A.P., Ferreira, L.A.M., 2010. Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 4699–4704.
- Basu, R., Bhaumik, S., Haldar, A.K., Naskar, K., De, T., Dana, S.K., Walden, P., Roy, S., 2007. Hybrid cell vaccination resolves *Leishmania donovani* infection by eliciting a strong CD8+ cytotoxic T-lymphocyte response with concomitant suppression of interleukin-10 (IL-10) but not IL-4 or IL-13. Infect. Immun. 75, 5956–5966.
- Berman, F., 2005. Clinical status of agents being developed for *Leishmaniasis*. Expert Opin. Invest. Drugs 14, 1337–1346.
- Bernardshaw, S., Johnson, E., Hetland, G., 2005. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill administered orally protects against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. Scand. J. Immunol. 62, 393–398.
- Bernardshaw, S., Hetland, G., Ellertsen, L.K., Tryggestad, A.M.A., Johnson, E., 2006. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill differentially stimulates production of pro-inflammatory cytokines in human monocytes and human vein endothelial cells *in vitro*. Inflammation 29, 147–153.
- Bernardshaw, S., Lyberg, T., Hetland, G., Johnson, E., 2007. Effect of an extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill on expression of adhesion molecules and production of reactive oxygen species in monocytes and granulocytes in human whole blood *ex vivo*. APMIS 115, 719–725.
- Brown, G.D., Gordon, S., 2003. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. Immunity 19, 311–315.
- Carneiro, G., Santos, D.C., Oliveira, M.C., Fernandes, A.P., Ferreira, L.S., Ramalde, G.A., Nunan, E.A., Ferreira, L.A., 2010. Topical delivery and *in vivo* antileishmanial activity of paromomycin-loaded liposomes for treatment of cutaneous leishmaniasis. J. Liposome Res. 20, 16–23.
- Carrión, J., Nieto, A., Iborra, S., Iniesta, V., Soto, M., Folgueira, C., Abanades, D.R., Requena, J.M., Alonso, C., 2006. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. Parasite Immunol. 28, 173–183.
- Coelho, E.A., Tavares, C.A., Carvalho, F.A., Chaves, K.F., Teixeira, K.N., Rodrigues, R.C., Matlasewski, G., Gazzinelli, R.T., Fernandes, A.P., 2003. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. Infect. Immun. 71, 3988–3994.
- Croft, S.L., Coombs, G.H., 2003. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends Parasitol. 19, 502–508.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350–356.
- Forland, D.T., Johnson, E., Tryggestad, A.M., Lyberg, T., Hetland, G., 2010. An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production *in vitro*. Cytokine 49, 245–250.
- Frézard, F., Demicheli, C., 2010. New delivery strategies for the old pentavalent antimonials drugs. Expert Opin. Drug Deliv. 7, 1343–1358.
- Garnier, T., Croft, S.L., 2002. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. Curr. Opin. Investig. Drugs 3, 538–544.
- Giudice, E.L., Campbell, J.D., 2006. Needle-free vaccine delivery. Adv. Drug Deliv. Rev. 58, 68–89.
- Grimaldi Jr., G., Tesh, R.B., 1993. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Rev. 6, 230–250.
- Kim, Y.W., Kim, K.H., Choi, H.J., Lee, D.S., 2005. Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. Biotechnol. Lett. 27, 483–487.
- Kim, C.F., Jiang, J.J., Leung, K.N., Fung, K.P., Lau, C.B., 2009. Inhibitory effects of *Agaricus blazei* Murill extracts on human myeloid leukemia cells. J. Ethnopharmacol. 122, 320–326.
- Kolodziej, H., Kiderlen, A.F., 2005. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitized RAW 264.7 cells. Phytochemistry 66, 2056–2071.
- Maia, C., Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine *Leishmaniasis* and immune response to infection. Vet. Parasitol. 158, 274–287.
- Minodier, P., Parola, P., 2007. Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Med. Infect. Dis. 5, 150–158.
- Mondal, S., Bhattacharya, P., Rahaman, M., Ali, N., Goswami, R.P., 2010. A curative immune profile one week after treatment of Indian kala-azar patients predicts success with a short-course liposomal amphotericin B therapy. PLoS Negl. Trop. Dis. 27, e764.
- Nwaka, S., Hudson, A., 2006. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 5, 941–955.
- Oliveira, L.F., Schubach, A.O., Martins, M.M., Passos, S.L., Oliveira, R.V., Marzochi, M.C., Andrade, C.A., 2011a. Systematic review of the adverse effects of cutaneous *Leishmaniasis* treatment in the New World. Acta Trop. 118, 87–96.
- Oliveira, D.M., Costa, M.A.F., Chavez-Fumagalli, M.A., Valadares, D.G., Duarte, M.C., Costa, L.E., Martins, V.T., Gomes, R., Melo, M.N., Soto, M., Tavares, C.A.P., Coelho, E.A.F., 2011b. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. Parasitol. Res. 107, 1277–1285.
- Rhodes, S.G., Graham, S.P., 2002. Is 'timing' important for cytokine polarization? Trends Immunol. 23, 246–249.
- Sorimachi, K., Akimoto, K., Ikehara, Y., Inafuku, K., Okubo, A., Yamazaki, S., 2001. Secretion TNF-, IL-12 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions *in vitro*. Cell Struct. Funct. 26, 103–108.
- Stäger, S., Joshi, T., Bankoti, R., 2010. Immune evasive mechanisms contributing to persistent *Leishmania donovani* infection. Immunol. Res. 47, 14–24.
- Talcott, J.A., Clark, J.A., Lee, I.P., 2007. Measuring perceived effects of drinking an extract of basidiomycetes *Agaricus blazei* Murill: a survey of Japanese consumers with cancer. BMC Complement Altern. Med. 29, 7–32.

- Tang, N.Y., Yang, J.S., Lin, J.P., Hsia, T.C., Fan, M.J., Lin, J.J., Weng, S.W., Ma, Y.S., Lu, H.F., Shen, J.J., Lin, J.G., Chung, J.G., 2009. Effects of *Agaricus blazei* Murill extract on immune responses in normal BALB/c mice. *In Vivo* (Athens, Greece) 23, 761–766.
- Tarascou, I., Souquet, J.M., Mazauric, J.P., Carrillo, S., Coq, S., Canon, F., Fulcrand, H., Cheynier, V., 2010. The hidden face of food phenolic composition. *Arch. Biochem. Biophys.* 501, 16–22.
- Valadares, D.G., Duarte, M.C., Oliveira, J.S., Chávez-Fumagalli, M.A., Martins, V.T., Costa, L.E., Leite, J.P.V., Santoro, M.M., Régis, W.C.B., Tavares, C.A.P., Coelho, E.A.F., 2011. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. *Parasitol. Int.* 60, 357–363.
- Vieira, L.Q., Goldschmidt, M., Nashleanas, M., Pfeffer, K., Mak, T., Scott, P., 1996. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J. Immunol.* 157, 827–835.
- Wagner, H., Bland, S., Zgainski, E.M., 1984. *Plant Drug Analysis*. Springer-Verlag, Berlin, 320 p.
- World Health Organization, 2009. The disease and its impact. <http://who.int/emc/disease/leish/index.html>.
- Wu, M.F., Hsu, Y.M., Tang, M.C., Chen, H.C., Chung, J.G., Lu, H.F., Lin, J.P., Tang, N.Y., Yeh, C., Yeh, M.Y., 2011. *Agaricus blazei* Murill extract abrogates CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *In Vivo* (Athens, Greece) 25, 35–40.