

Efectividad *in vitro* de extractos herbales de Samento y Banderol sobre diferentes formas morfológicas de *Borrelia burgdorferi*

By Akshita Datar, Navroop Kaur, Seema Patel, David F Luecke and Eva Sapi, Ph.D.

Lyme Disease Research Group, University of New Haven, West Haven, Connecticut, USA

Resumen

La borreliosis Lyme una enfermedad multisistémica de la garrapata causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* ha crecido hasta convertirse en un gran problema de salud pública durante los pasados 10 años. EL tratamiento primario de la enfermedad de Lyme crónica es la administración de varios antibióticos. Sin embargo, la recaída de la enfermedad usualmente ocurre cuando se deja el tratamiento con antibióticos. Una explicación posible es que la *Borrelia burgdorferi* se vuelve resistente al tratamiento antibiótico, convirtiéndose de una forma vegetativa de espiroqueta, hacia un grupo diferente de cocos y/o colonias de biofilm. Existe una necesidad urgente de encontrar nuevos agentes terapéuticos con la capacidad de eliminar estas variantes en la morfología de la *Borrelia burgdorferi*. En este estudio dos extractos herbales del Cowden Condensed Support Program llamadas Samento y Banderol así como la doxiciclina (uno de los principales antibióticos usados para el tratamiento de la enfermedad de Lyme) fueron probados para su efectividad *in vitro* en varias formas morfológicas de *Borrelia burgdorferi* (spiroquetas, cocos y colonias de biofilm) usando fluorescencia, microscopio de campo oscuro y métodos de tinción BaLight. Nuestros resultados demostraron que ambos agentes herbales, no la doxiciclina, tenían efectos significativos en todas las formas de *Borrelia burgdorferi* especialmente cuando se los utilizada combinados, sugiriendo que los agentes herbales podrían proporcionar una metodología terapéutica eficaz para los pacientes con enfermedad de Lyme.

Borrelia burgdorferi, es el principal agente causal de la enfermedad de Lyme, es una espiroqueta que tiene la habilidad de adoptar diferentes formas inactivas, tales como quistes y forma granular (cocos) así como agregados en forma de colonias *in vivo* e *in vitro*, en presencia de condiciones desfavorables tales como la exposición a antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de la borreliosis de Lyme. Desafortunadamente, cuando la *Borrelia burgdorferi* esta en estas formas inactivas, la terapia antibiótica convencional no destruye la bacteria. Hasta la fecha, la terapia de elección para el tratamiento de la enfermedad de Lyme es la administración de antibióticos farmacéuticos como doxiciclina, minociclina, claritromicina, penicilina G y ceftriaxona. Muchos estudios han demostrado que ha pesar de continuas y altas dosis de antibióticos, la enfermedad de Lyme crónica no es tratada de una manera eficaz en la mayoría de los casos. También, en ausencia de tratamientos antibióticos que funcionen, la recaída de la enfermedad es común. Esto significa que incluso después del tratamiento antibiótico el sistema inmunológico del huésped falla en prevenir la recurrencia. Una posible explicación para esta observación clínica es la presencia de diferentes morfotipos de *Borrelia burgdorferi*, lo que puede proteger a la bacteria contra la terapia antibiótica. Tan pronto el tratamiento termina, una recaída es observada, la mayoría debido a que la *Borrelia burgdorferi* puede revertir su forma espiroquetal. Además, el costo de la antibiótico terapia, especialmente cuando se lo administra de forma intravenosa es substancial. También la antibiótico terapia puede causar múltiples efectos indeseables. Así, hay una necesidad urgente de un tratamiento novel, más eficiente y mucho más rentable que pueda eliminar de manera eficiente todas las formas de *Borrelia burgdorferi*.

Hay una opción alternativa de tratamiento clínico que se está utilizando ampliamente llamando Cowden Condensed Support Program que utiliza varios extractos de hierbas destinada a eliminar los microorganismos en los pacientes con enfermedad de Lyme. Richard Horowitz, MD, Presidente de International Lyme and Associated Diseases Educational Foundation (ILADEF) ha prescrito el Cowden Condensed Support Program para más de 2000 de sus pacientes y reporta que es efectivo en un 70%. Los dos agentes herbales del Cowden Condensed Support Program seleccionados para este estudio son Samento (un quimiotipo pentacíclico de uña de gato – *Uncaria tomentosa* que no contiene alcaloides oxindoles tetracíclicos), que ha reportado propiedades antibacterianas y antivirales y Banderol (*Otoba sp.*) conocido por tener efectos antibacterianos, anti protozoos y anti inflamatorios. Ambos agentes herbales son utilizados durante los primeros 2 meses del Cowden Condensed Support Program luego en rotación con otros agentes antimicrobianos durante la duración de este protocolo de 6 meses.

En este estudio, evaluamos estos extractos naturales antimicrobianos así como doxiciclina (uno de los principales antibióticos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Lyme) y sus potenciales efectos sobre las diferentes formas de *Borrelia burgdorferi*.

La cepa infecciosa de *Borrelia burgdorferi* utilizada en este estudio, fue obtenida de Colector de Tejido Tipo Americano (ATCC#35210) fue cultivada en CO₂ al 5% a 34°C, en Barbour–Stoener–Kelly H (BSK H) medio suplementado con 6% de suero de conejo (Sigma, St. Louis MO, USA) a mediados de fase logarítmica (2×10^7 células/ml). Samento y Banderol fueron obtenidos de Nutramedix LLC (Jupiter, FL, USA). Doxiciclina fue obtenida de Sigma. Un amplio rango de concentraciones de Samento y Banderol fueron inicialmente probadas para determinar las concentraciones efectivas (diluciones 1:100 – 1:1000). De doxiciclina, fue utilizada una concentración 10x más alta que la mínima reportada con efecto bactericida. Tubos de ensayo que contengan BSK H medio triplicado, con o sin agentes antimicrobianos adecuadamente diluidos, fueron inoculados con una densidad final de 5×10^6 células/ml del organismo probado.

Métodos continuos directo a la célula con cámara continua Petroff-Hausser y estudios morfológicos usando fluorescencia y microscopio de campo oscuro así como LIVE/DEAD BacLight Prueba de Viabilidad Bacteriana (Life Technologies Corp, Carlsbad, CA, USA), fueron utilizados para valorar el efecto de los agentes antimicrobianos. Para análisis estadísticos, se realizó una muestra de pares T-test utilizando el programa de estadísticas NCSS (NCSS LLC, Kaysville, UT).

En el primer grupo de experimentos, se probaron susceptibilidad in vitro de espiroquetas y bacilos de la cepa B3a de *Borrelia burgdorferi* a un amplio rango de concentraciones de extracto de Samento y Banderol (de diluciones de 1:100 a 1:1000). Las células fueron tratadas por 96 horas, luego se utilizaron el conteo directo y el microscopio de campo oscuro como métodos de evaluación del efecto antimicrobiano de los agentes. Para ambos agentes herbales la dilución 1:400 fue la más efectiva eliminando espiroquetas y bacilos (Figura 1A y 1B). Sin embargo, cuando se utilizó la combinación de extractos de Samento y Banderol, la dilución 1:300 mostró la mayor eficacia, y esta concentración fue escogida para estudios posteriores (Figura 1C). Como control negativo, se incluyó en todos los experimentos el tratamiento con 0.25% de etanol, debido a que todos los extractos herbales contienen ~25% de etanol para transportar los nutrientes hacia las células y para estabilidad.

En estos experimentos, también se comparó el efecto de los extractos herbales de Samento y Banderol con la doxiciclina, el antibiótico más utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Lyme en un

periodo de tratamiento de 96H. Nuestros resultados muestran que la doxiciclina (250µg/ml) fue muy efectiva en la eliminación de la forma espiroquetal de la Borrelia burgdorferi significativamente las formas coloides de esta bacteria. Comparando estos datos de la doxiciclina a de los extractos herbales, Banderol, y la combinación de Samento y Banderol (1:300), fueron más efectivos en la eliminación de ambas formas de la Borrelia burgdorferi espiroquetal y cocoide in vitro (Figura 1 Pane A-C).

En el segundo set de experimento, se evaluó el efecto de los diferentes agentes antimicrobianos en colonias tipo biofilm de Borrelia burgdorferi. Estos cultivos fueron tratados como se describe arriba por 96H y marcado con manchas fluorescentes de viabilidad, lo que ayudó a visualizar los efectos de los agentes antimicrobianos sobre las células bacterianas (Figura 2). La tinción fluorescente verde ((SYTO[®] 9, con la excitación / máximos de emisión de alrededor de 480/500 nm) mancha bacterias sanas con membranas intactas (células vivas) y el tinte rojo (yoduro de propidio con excitación / máximos de emisión de alrededor de 490/635 nm) mancha bacterias con membranas dañadas, desplazando el tinte verde (células muertas). En ausencia de agentes antimicrobianos, Borrelia burgdorferi esta forma colonias de biofilm (figura 2) compuestas mayormente de bacterias vivas. En presencia de extracto de Samento (1:300), las colonias fueron significativamente más pequeñas y menos organizadas (Figura 2B), pero se mantenían teñidas con el colorante verde lo que indicaba que había células vivas. En presencia de Banderol, el tamaño de las colonias no mostró ninguna reducción, sin embargo las células dentro de las colonias estaban >90% muertas. En presencia de ambos extractos herbales (Banderol y Samento, 1:300), no se observaron signos de formación de colonias en los cultivos, pero se encontró evidencia de algunos individuos no móviles pero verdes espiroquetas y cocos. En presencia de doxiciclina (250µg/ml) el tamaño promedio de las colonias fue incrementado y contenía mayormente cocos vivos.

En este estudio, nuestra hipótesis fue que para una terapia eficaz, tenemos que encontrar los agentes antimicrobianos que sean capaces de eliminar todas las formas de la Borrelia burgdorferi. Durante el curso de la infección por Borrelia, la bacteria puede cambiar de forma, de espiroqueta a otras cuando se les presenta un entorno desfavorable y puede volver a espiroqueta cuando la condición es más favorable para su crecimiento. Para poder erradicar la Borrelia burgdorferi, los agentes antimicrobianos deben eliminar todas las formas, las espiroquetas, cocos y colonias como biofilm.

Aquí se han aportado pruebas de que dos agentes antimicrobianos naturales (extractos Samento y Banderol), tuvieron efecto significativo contra las tres formas conocidas de Borrelia burgdorferi in vitro. También hemos demostrado que la doxiciclina, uno de los principales antibióticos que se utiliza para tratar la enfermedad de Lyme, sólo tuvo un efecto significativo en la forma espiroquetal de Borrelia burgdorferi.

Nuestros resultados podrían proporcionar una explicación por qué es tan común la recaída después de suspender la terapia con antibióticos. Por ejemplo, algunos de los informes recientes sobre los experimentos con animales demostraron que a pesar de que los antibióticos farmacéuticos son eficaces en el alivio de la enfermedad, la infección puede persistir incluso después de una terapia aparentemente eficaz, lo cual sugiere que Borrelia pueden permanecer viable incluso después de la administración de antibióticos. Si los antibióticos farmacéuticos sólo eliminan una forma de esta bacteria, las otras formas podrían haber sido la fuente de la persistencia de la enfermedad.

El otro hecho muy importante ha ser considerado para un tratamiento eficaz contra la infección por *Borrelia*, es que esta bacteria suele tener esperanza de vida que van desde varias semanas hasta seis a ocho meses, por lo que pueden pasar de seis a ocho meses, incluso para que una generación de *Borrelia* este expuesta a los antibióticos para su eliminación. Dado que se informa que los extractos de hierbas como Samento no son tóxicos y se pueden tomar de manera segura diariamente durante un largo período de tiempo necesario para erradicar totalmente *Borrelia* de un organismo infectado.

En resumen, nuestro estudio ha proporcionado nuevos datos en la investigación *in vitro* de un tratamiento novedoso utilizando agentes antimicrobianos herbales para erradicar de manera eficiente la *Borrelia burgdorferi*, la bacteria de la enfermedad de Lyme.

Corresponding author; Eva Sapi Ph.D. University of New Haven, Department of Biology and Environmental Sciences, 300 Boston Post Road West Haven, CT 06516 USA; email: esapi@newhaven.edu

Notes:

1. Gruntar I, Malovrh T, Murgia R, Cinco M. Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes *in vivo*. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 2001;109:383–388.
2. Brorson Ø, Brorson SH. *In vitro* conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium. *Infection*. 1998; 26:44–50.
3. Miklossy J, Kasas S, Zurn AD, McCall S, Yu S, McGeer PL. Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *Journal of Neuroinflammation*. 2008; 25:5-40.
4. Brorson Ø, Brorson SH, Scythes J, MacAllister J, Wier A, Margulis L. Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic tigecycline. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov; 106(44):18656-18661.
5. Burrascano J: Advanced Topics in Lyme Disease. *Managing Lyme Disease*. 2005; 15th edition, 1-33.
6. Krause PJ, Foley DT, Burke GS, Christianson D, Closter L, Spielman A. Reinfection and relapse in early Lyme disease. *Am Trop Med Hyg*. 2006; 75(6):1090-1094.

7. Klempner M, Linden MD, Hu T, J Evans J et al. Two controlled trials of antibiotic treatment in patients with persistent symptoms and a history of Lyme disease. *The New England Journal of Medicine*. 2001; 345:85-92.
8. Horowitz R. Classical and Integrative Medical Approaches in Chronic Lyme Disease: New Paradigms in Diagnosis & Treatment. *8th Annual International Lyme and Associated Diseases Society (ILADS) Conference 2007 October*.
9. Matsuura T, Shimizu Y, Fujimoto H, et al. Minocycline-related lupus. *Lancet* 1992; 340:1553.
10. Ccahuana-Vasquez RA, Santos SS, Koga-Ito CY, Jorge AO. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. *Braz Oral Res*; 2007 Jan-Mar; 21(1): 46-50.
11. Valerio LG Jr, Gonzales GF. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*): a critical synopsis. *Toxicol Rev*. 2005; 24(1):11-35.
12. Weniger B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragón R, Muñoz V, Callapa J, Lobstein A, Anton R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol*. 2001 Dec; 78(2-3):193-200.
13. Baradaran-Dilmaghani R, Stanek G. *In vitro* susceptibility of thirty *Borrelia* strains from various sources against eight antimicrobial chemotherapeutics. *Infection*. 1996 Jan-Feb; 24(1):60-63.
14. Bockenstedt LK, Mao J, Hodzic E, et al. Detection of attenuated, noninfectious spirochetes in *Borrelia burgdorferi*-infected mice after antibiotic treatment. *J Infect Dis*. 2002; 186:1430–1437.
15. Barthold SW, Hodzic E, Imai DM, Feng S, Yang X, Luft BJ. Ineffectiveness of tigecycline against persistent *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb; 54(2):643-51.
16. Samuels DS and Radolf JD. *Borrelia*: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis. *Caister Academic Press*, 2010 March.
17. Reinhard, K-H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.: Cat's claw, Una de Gato, or Saventaro. *J Alt Comp Med*. 1999; 5:143-51.

Figura 1A

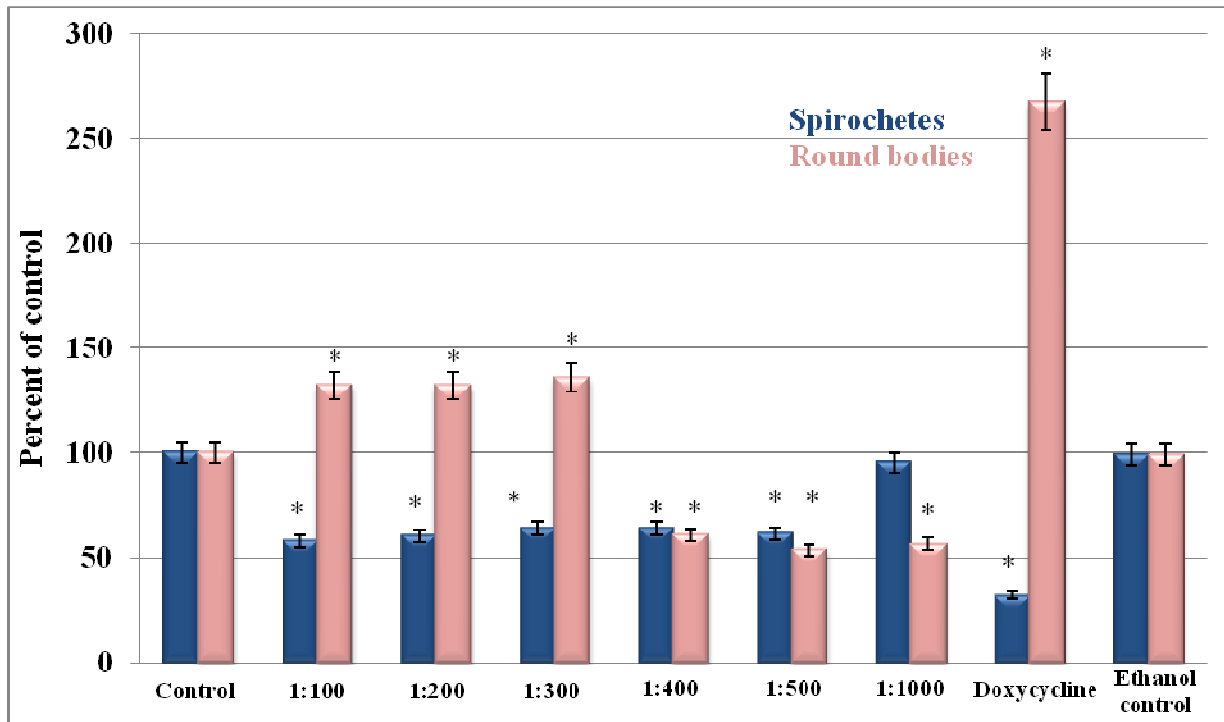


Figura 1B

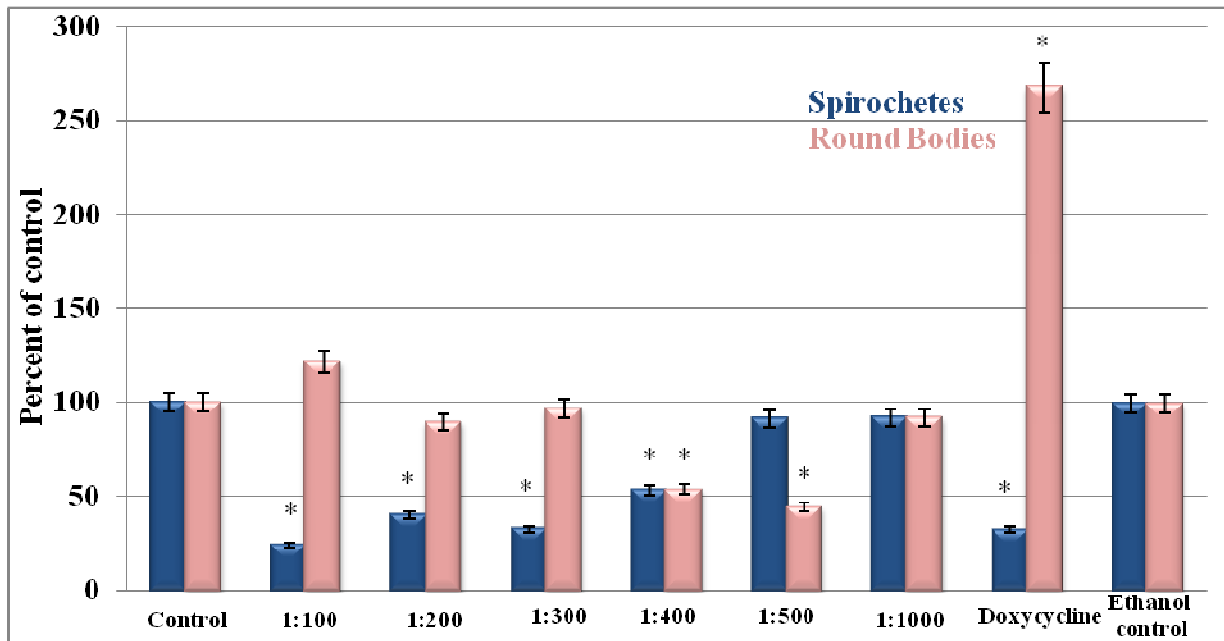


Figura 1C

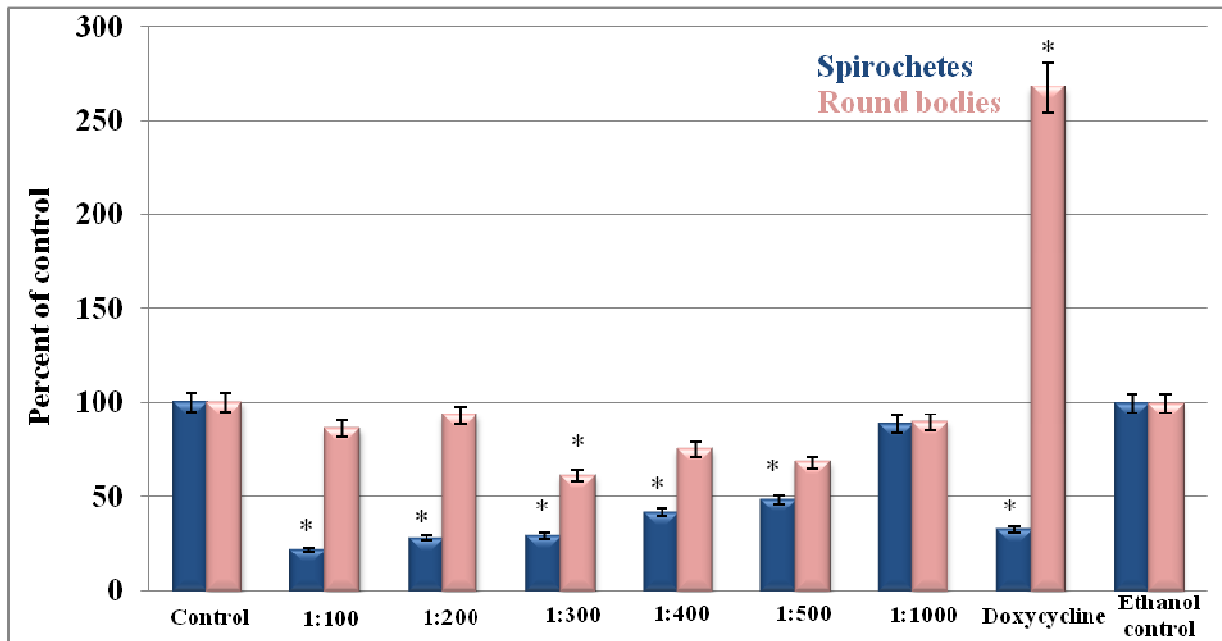


Figura 1:

Susceptibilidad in vitro de la forma espiroquetal y cocoide de la *Borrelia burgdorferi* B31 a extractos de Samento y Banderol y Doxiciclina (250µg/ml) por 96 horas de tratamiento periódico utilizando como conteo celular directo y morfología de campo oscuro como métodos de evaluación. Panel A: Extracto de Samento; Panel B. Extracto de Banderol; y panel C: extractos de Samento + Banderol. Como control negativo, se utilizó etanol al 0.25%. Valor $P > 0.05$ indica significancia estadística.

Figura 2

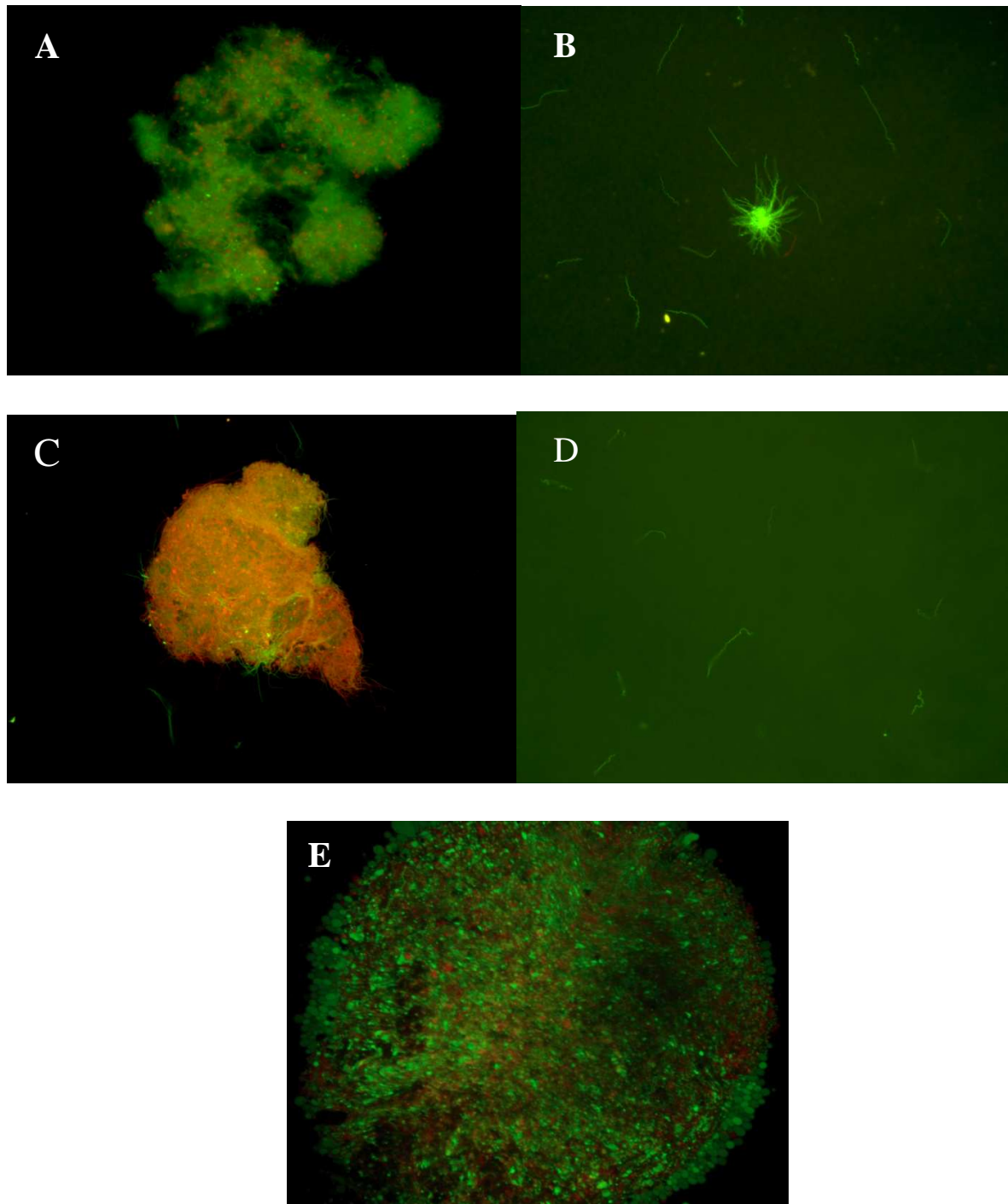


Figura 2:

Viabilidad de tinción BaCLight de la cepa B31 de *Borrelia burgdorferi* después de 96 horas de tratamiento usando SYTO® 9 ácido nucleico de tinción verde fluorescente (CÉLULAS VIVAS) yoduro de propicio, y mancha roja sobre núcleo fluorescente (CÉLULAS MUERTAS). A: Control; B: Samento (dilución 1:300); C: Banderol (dilución 1:300); D: Samento + Banderol (dilución 1:300); E: Doxyciclina (250 µg/ml). Todas las imágenes fueron tomadas con una magnificación de 40X.