

Estudios de Seguridad Preclínica del extracto hidroalcohólico de semillas de *Opuntia soehrensii*, una especie alto-andina con actividad anti-Herpes Virus, en ratas Sprague Dawley

Preclinical safety of the hydroalcoholic extract of *Opuntia soehrensii* seeds with anti-herpes virus activity, in SD rats.

^{1*} Magali Solares-Espinoza, <https://orcid.org/0000-0001-5063-6697>

² Yeshika Lopez Gavincha, <https://orcid.org/0000-0002-6470-1223>

¹ Gabriela Villalpando Ameller, <https://orcid.org/0000-0002-2921-3830>

² Esther Casablanca Alarcón, <https://orcid.org/0000-0002-8751-7568>

¹ Ivonne Contreras Tapia, <https://orcid.org/0000-0001-7884-9790>

² Raquel Calderón Morales <https://orcid.org/0000-0001-6862-4467>

³ Curcuy Lanza Milet, <https://orcid.org/0000-0002-9312-7830>

² Katty Terrazas Aranda, <https://orcid.org/0000-0001-5487-7121>

² Roger Carvajal Saravia, <https://orcid.org/0000-0003-3998-6658>

¹Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés
La Paz – Bolivia

²Instituto de Servicios de Diagnóstico e Investigación en Salud (I. SELADIS) – Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UMSA. La Paz – Bolivia.

³Hospital COSSMIL. La Paz – Bolivia.

*Autor de correspondencia: mfsolares@umsa.bo

FECHA DE RECEPCIÓN: 7 Noviembre 2022

FECHA DE ACEPTACIÓN: 14 Noviembre 2023

Resumen

Introducción. Alrededor de 3700 millones menores de 50 años con infección por VHS-1 y 491 millones de personas de 15 a 49 años cursan con infección por VHS-2 en el mundo; sus síntomas, vesículas o úlceras dolorosas reaparecen periódicamente. El tratamiento convencional disminuyó su efectividad en cepas resistentes e inmunodeprimidos. Alternativas terapéuticas con extractos de plantas medicinales y potencial antiviral, como *Opuntia soehrensii* Brito conocida como “ayrampù” en Bolivia, utiliza infusión de sus semillas como analgésico, antidiabético, hipotensor y febrífugo.

En vapores por inhalación para afecciones respiratorias; como tintura tópica en lesiones dérmicas de viruela, sarampión y herpes labial.

Objetivo. Evaluar la seguridad preclínica de un gel que contiene el extracto hidro-alcohólico de semillas de *Opuntia soehrensii* en diferentes dosis, aplicado en la mucosa vaginal de ratas Sprague Dawley.

Material y métodos. Se ejecutaron protocolos de toxicidad aguda y subaguda para evaluar la respuesta sistémica, a través de marcadores bioquímicos y de comportamiento, y la respuesta local en mucosa vaginal, mediante estudios histopatológicos, en grupos de animales a los que se aplicó el gel con diferentes concentraciones del extracto de *Opuntia soehrensii*, comparados con un grupo control y otro que recibió solo el vehículo.

Resultados. Se encontró que los indicadores sistémicos de comportamiento y ganancia de peso no mostraron diferencias entre grupos. Los indicadores hematológicos y bioquímicos mostraron resultados fisiológicamente esperados y sin cambios en los grupos de estudio. La citología expuso conservación del fenotipo celular para las fases del ciclo estral en todos los grupos. Los indicadores histológicos de reacción local e integridad celular se distribuyeron de igual manera en los todos los grupos.

Conclusión. La aplicación de un gel de *Opuntia soehrensii* no muestra niveles apreciables de toxicidad local y sistémica, lo que permite recomendar la iniciación de estudios de aplicación clínica.

Palabras clave: *Opuntia* sp., herpes virus, antiviral, ratas Sprague Dawley, Toxicidad aguda y subaguda

Abstract

Introduction. Around 3.7 billion people under 50 years of age are infected with HSV-1 and 491 million people between the ages of 15 and 49 are infected with HSV-2 in the world; his symptoms, vesicles or painful ulcers recur periodically. Conventional treatment decreased its effectiveness in resistant and immunosuppressed strains. Therapeutic alternatives with extracts of medicinal plants and antiviral potential, such as *Opuntia soehrensii* Brito known as "ayrampù" in Bolivia, uses infusion of its seeds as an analgesic, antidiabetic, hypotensive and febrifuge. In vapors by inhalation for respiratory conditions; as a topical tincture in skin lesions of smallpox, measles and cold sores.

Objectives. To evaluate the preclinical safety of a gel containing the hydroalcoholic extract of *Opuntia soehrensii* seeds in different doses, applied to the vaginal mucosa of Sprague Dawley rats.

Material and Methods. Acute and sub-acute toxicity protocols were carried out to evaluate local response in the vaginal mucosa, through histo pathological studies, and systemic responses, through biochemical and behavioral markers, in groups of animals to which the gel with different

concentrations of the extract of *Opuntia soehrensii* was applied, compared with a control group and another that received only the vehicle.

Results. It was found that the histological indicators of local reaction and cell integrity were equally distributed in all groups. Cytology showed conservation of the cell phenotype for the phases of the estrous cycle in all groups. The systemic indicators of behavior and weight gain did not show differences between groups. Hematological and biochemical indicators showed results ranged in physiologic parameters, without changes in the study groups.

Conclusion. The application of a gel from *Opuntia soehrensii* does not show appreciable levels of local and systemic toxicity, which makes it possible to recommend the initiation of clinical application studies.

Keywords: *Opuntia* sp., antiviral, Herpesviridae, Sprague Dawley rats, sub-acute toxicity.

INTRODUCCIÓN

Se estima que en todo el mundo hay 3700 millones de personas menores de 50 años (67%) con infección por VHS-1 y 491 millones de personas de 15 a 49 años (13%) cursan con infección por VHS-2. La mayoría de las infecciones por VHS son asintomáticas, pero entre los síntomas del herpes se incluyen vesículas o úlceras dolorosas que pueden reaparecer periódicamente al cabo de un tiempo (OMS, 2023), (Berger Stephen, 2022). El uso constante del tratamiento convencional con base en Aciclovir, Famciclovir y otros, ha disminuido la efectividad del tratamiento por la aparición de cepas resistentes, particularmente en sujetos inmunodeprimidos. Este panorama evidencia la necesidad de búsqueda de alternativas en los productos naturales. Los extractos de plantas medicinales con potencial terapéutico antiviral son una opción que contribuye al tratamiento de este tipo de enfermedades, mediante diferentes mecanismos. (Mårten Strand, 2014), (Ariza-Heredia et al., 2018), (Álvarez et al., 2020), (Majewska & Mlynarczyk-Bonikowska, 2022), (Garber et al., 2021), (Lin et al., 2022).

Entre los recursos fito terapéuticos utilizados para este tipo de patologías, se encuentra *Opuntia soehrensii* Brito, también conocida como “ayrampù”, que es una Cactaceae de los valles andinos secos en Bolivia, ampliamente empleada por la medicina tradicional. Se utiliza infusión de sus semillas como analgésica, antidiabética, hipotensor y febrífugo. En forma de vapores por inhalación son aplicadas para afecciones del tracto respiratorio; asimismo, la solución concentrada como tintura se aplica de forma tópica para el control

de las lesiones dérmicas de la viruela, sarampión y en el herpes labial. La solución acuosa de este producto también se emplea como bebida refrescante y el extracto como colorante para la repostería. (Camaqui Mendoza Alberto, 2009).

En nuestro laboratorio se estudió las potencialidades terapéuticas del extracto hidroalcohólico de las semillas de *O. soehrensii* in vitro. Se demostró la actividad antiviral protectora in vitro antes de la infección celular (Mamani V. Gaby, 2004). A tiempo de estudiar la actividad antiviral, se estudió el efecto cito-tóxico en células BHK-21 evaluando la concentración del producto, el tiempo de exposición y la densidad celular puesta en cultivo. Se observó efecto tóxico en concentraciones mayores a 0.21mg/dL en cultivos con menor densidad celular y en concentración de 42 mg/dL con mayor densidad celular. La concentración cito-tóxica media (CC₅₀) del producto en estudio, en células BHK-21 con una densidad celular de 3x10⁵/mL, hasta las 72 horas de cultivo fue de 21 mg/dL (Mamani V. Gaby, 2004), (Zambrana Santander Silvia T., 2006, 2007). El objetivo del presente estudio fue, evaluar la seguridad preclínica de un gel que contiene el extracto hidroalcohólico de semillas de *Opuntia soehrensii* en diferentes dosis, aplicado en la mucosa vaginal de ratas Sprague Dawley, para lo cual se realizó ensayos de toxicidad aguda y subaguda a dosis repetidas.

MATERIAL Y METODOS

Extracto vegetal: Los especímenes de *Opuntia soehrensii* fueron autenticada por el Herbario Nacional (Instituto de Ecología, Carrera de Biología) Facultad de Ciencias Puras de la Universidad Mayor de San Andrés, con el número de registro 3 (Carvajal R. y López Y. 2014); estos provenían de las cercanías de la ciudad de Tupiza Departamento de Potosí. La recolección de los frutos se realizó en horas de la mañana; las semillas fueron inmediatamente separadas, desecadas a temperatura ambiente, al abrigo de la luz por 14 días, para luego proceder a su trituración a polvo fino en mortero de porcelana. 40 g de este material fueron suspendidos en 1 litro de agua bidestilada y desionizada, esta suspensión se agitó por 2 horas a 50° C para su posterior maceración durante 48 horas. Luego de eliminar las sustancias insolubles por filtración con papel Whatman No1, alícuotas del extracto acuoso fueron concentradas por liofilización (Labconco, Freeze Dry System).

Preparación del gel: En 500 mL de agua destilada des ionizada se vertió 5 g de Carbopol U 10% (Sigma) y se homogeneizó en licuadora, después de lo cual se añadió 6 gotas de Trietilamina (TEA), para polimerizar el Carbopol y dar lugar al gel. Este producto con un pH de 4.2 fue conservado a 4°C en condiciones estériles. Para la incorporación del extracto vegetal en el gel, el material liofilizado fue reconstituido en solución salina, a diferentes concentraciones, partiendo de una solución stock de 100 mg/mL del extracto el cual se esterilizó por filtración en membranas de millipore de 0.45µm. Las concentraciones obtenidas fueron añadidas al gel con agitación constante a temperatura ambiente.

Tratamiento de los animales: Se emplearon 58 ratas Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*) hembras, de 240 a 280 g de peso, reproducidas y criadas en el Bioterio de la Unidad Fisiología Experimental del Instituto Boliviano de Biología de la Altura de la Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés. Estas, fueron alojadas en cajas individuales de policarbonato con cama de viruta de madera estéril. Todas recibieron alimento estándar (Pellets elaborados por la Empresa SFIDA S. R. L. de Ferrari Ghezzi Oruro Bolivia) y agua tratada por osmosis inversa y esterilizada por acidificación (pH 3.5). Agua y alimentos fueron administrados ad libitum. Diariamente se controló la temperatura ambiente mantenida en 22°C como promedio, humedad del 45% y el ciclo luz-oscuridad 12 x 12, con focos de luz blanca fría de 14 watts. Desde el inicio de los experimentos, cada animal fue identificado mediante tarjetas adheridas a la caja, que incluían los datos individuales y de grupo. Los procedimientos experimentales se diseñaron de acuerdo con normas de bioética internacionales, consignadas en "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" y OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Los estudios de toxicidad aguda y subaguda como respuesta local, se diseñaron como un test en mucosa vaginal, basado en los protocolos de prueba en piel OECD TG 404 (OECD Paris, 2015).

Administración del producto: La administración del producto se realizó según la técnica de frotis vaginal en ratas, validada por el Centre de Recherche du CHUQ, 2009 (Centre de Recherche du CHUQ, 2009); que consiste en la inmovilización del animal para exposición de la región ano genital. El procedimiento se realizó utilizando jeringas descartables de 1 mL (sin aguja); se administró 200 microlitros del gel con diferentes concentraciones del extracto y vehículo (Carbopol U10% de Sigma Aldrich).

Evaluación del comportamiento: El test de Irwin permitió la evaluación de 34 variables, como respuesta de tres áreas del SNC: área motora, efectos generales y efectos subjetivos. El procedimiento consistió en técnicas observacionales y maniobras específicas para obtener respuestas reflejas (Moscardo et al., 2007), (Lazo R., 2022). También se evaluó la ganancia de peso (balanza marca "OHAUS"), el consumo de alimento, de agua, y la temperatura corporal (termómetro "Physitemp" TCAT-2AC). Los procedimientos fueron realizados manualmente por el mismo personal (capacitado y adiestrado previamente) y a la misma hora. (Zúñiga J. M., 2001).

Evaluación de parámetros hematológicos: Se realizó punción cardiaca post eutanasia, por inhalación de halotano, para la obtención de ± 5 mL de sangre que fueron depositadas en tubos de hemolisis con anticoagulante (EDTA-K3) y homogeneizadas por agitación. Para determinar el micro hematocrito las muestras fueron incorporadas en capilares sin anticoagulante. Para el conteo diferencial de glóbulos blancos y plaquetas, se realizó un extendido de gota fresca sobre portaobjetos y se utilizó la tinción de Wright, lectura al microscopio con aceite de inmersión, y clasificación de las células según patrones morfológicos (Harstad Eric, 2016). Los parámetros hematológicos determinados fueron: hemoglobina, mediante espectrofotometría a partir de una solución preparada con 5 mL de Drabkin + 20 μ L de muestra (lectura de DO longitud de onda de 540 nm), hematocrito, por el método de micro hematocrito mediante centrifugación del capilar a 1300 rpm; recuento manual de glóbulos blancos y plaquetas utilizando una cámara de conteo de Malassez y tampón específico.

Determinaciones de Química Clínica: Las muestras fueron depositadas en tubos de hemolisis y sometidas a centrifugación (3000 rpm) durante 10 minutos; las alícuotas de sueros se depositaron en tubos Eppendorf ± 500 μ L y congelados a -80°C para realizar las determinaciones en un mismo momento. Las pruebas fueron colorimétricas y enzimáticas de acuerdo con estándares. Se utilizaron reactivos específicos para espectrofotometría (Labkit Erba Mannheim) en un equipo automatizado para el cálculo de la absorbancia (Erba diagnostics Mannheim GMBH biochemistry analyzer Chem5V3). Los indicadores bioquímicos evaluados fueron: glucosa, colesterol, triglicéridos, proteínas totales, GOT, GPT, urea y creatinina, (Zúñiga J. M., 2001). (Salvador et al., 2008)

Evaluación de microbiota vaginal: Se realizó mediante la técnica de frotis vaginal en ratas; la toma de muestra fue por hisopado y colectados en tubos de ensayo que contenían caldo enriquecido con tioglicolato. El recuento e identificación de colonias permitió evaluar cocos y bacilos Gram (+) y (-), como microbiota general.

Evaluación del fenotipo celular vaginal: Se aplicó la técnica de lavado vaginal en ratas con 500 µL de solución fisiológica cargada en una pipeta Pasteur; se realizó el lavado-aspirado en el mismo momento y la acción fue realizada por la misma persona. El producto obtenido fue depositado en tubos Eppendorf y fijado con una gota de formol. La siguiente fase fue de extendido sobre un portaobjetos con fijación por desecación y tinción Papanicolaou. La observación se realizó en microscopio óptico en 10X y 40X (Marcondes, F. K., 2002), (Gomes Vilela Marcio, 2007), (Paccola C.C., 2013), (Cora Michelle C., 2015).

Evaluación histológica: Se obtuvieron por ectomía post mortem útero y vagina, región perineal, hígado y riñones. Después de su valoración macroscópica fueron fijados en formol al 40%. Se realizó cortes sagitales en la pieza anatómica correspondiente a la vagina que se colocaron en cassettes para su fijación en parafina y posterior deshidratación por alcoholes durante 16 horas en un equipo automatizado Histokinet modelo 48XHK. Luego se hicieron cortes de 3 micras y tinciones por inmersión y tinción universal hematoxilina-eosina. La lectura se hizo en un microscopio óptico Olympus BX43F, en 10X y 40X. (Crum C.P., 2000), (Tomlinson L., 2016), (Ramaiah S.K., 2016).

Análisis estadístico: Los resultados fueron sometidos a contrastes de normalidad mediante pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Para el análisis de significancia se aplicaron pruebas no paramétricas como U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis y pruebas paramétricas como ANOVA, aceptando $p < 0.05$ como valor de diferencia estadísticamente significativa. Se aplicó la prueba de correlación de Pearson ® para mostrar la ganancia de peso en cada grupo y en el tiempo que duró el estudio. Los datos cualitativos fueron matematizados a partir de la asignación de scores de Likert para valores ordinales (1=ausente, 2=escaso, 3=moderados y 4= abundantes) y sometidos a pruebas de significancia estadística. En general los resultados se expresan como medias \pm SD. Para todo el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS V19.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Toxicidad Aguda: Se establecieron dos grupos (n=5): control, que no recibió el producto, y experimental que recibió una dosis única del gel con el extracto vegetal de *Opuntia soehrensii* (2.1 mg/mL dosis máxima, según equivalencia con los estudios previos *in vitro* (Zambrana Santander Silvia Tatiana, 2007), por aplicación vaginal. Los criterios de cambios en el comportamiento se evaluaron a las 1, 2, 4, 8 y 24 horas, mediante Test de Irwin (Moscardo et al., 2007). La citología vaginal fue examinada en estado basal y postratamiento. La eutanasia química con halotano y la obtención de muestras se efectuó después de tres días de observación.

El Test de Irwin, la evaluación del peso corporal, consumo de alimento y agua mostraron valores dentro de los rangos fisiológicos y no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio (U de Mann-Whitney $p < 0.05$). Los parámetros hematológicos y bioquímicos mostraron valores fisiológicamente estables y no se observaron diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p < 0.05$). No hubo necesidad de aplicar el punto final humanitario y el índice de mortalidad fue nulo.

El microbiota vaginal mostró presencia moderada de bacilos Gram (-) seguida de la categoría “abundantes” en ambos grupos. Al contrario, se observó predominio de “ausencia” de Cocos Gram (+), seguido de algunos casos “escasos” y “moderados”. La tabla 1, muestra estas características.

Tabla 1. Microbiota vaginal durante toxicidad aguda

| Parámetros | Control (n=5) | | p | Experimental (n=5) | | p |
|-------------------------|----------------|----------------|-----|--------------------|----------------|-----|
| | Basal | Postratamiento | | Basal | Postratamiento | |
| Bacilos Gram (-) | 1.2 \pm 0.28 | 1.2 \pm 0.28 | NS | 1.1 \pm 0.14 | 1.2 \pm 0.28 | NS |
| Bacilos Gram (+) | 0.8 \pm 0.0 | 1.2 \pm 0.0 | NS | 0.8 \pm 0.28 | 0.8 \pm 0.28 | NS |

*Los valores muestran las medias \pm 1 SD. La significancia fue determinada mediante la prueba U de Mann-Whitney. NS: no significativo

La citología vaginal evaluó la fenotipificación celular durante el ciclo estral de cada ejemplar, la respuesta fue fisiológica en ambos grupos. También se examinó la presencia de neutrófilos como expresión de las células inmunitarias *in situ*: las respuestas fueron similares en estado basal y post tratamiento en ambos grupos de estudio. La integridad celular fue evaluada mediante la presencia de restos celulares, los resultados mostraron predominio de la categoría “ausentes”, seguida de “escasos” en ambos grupos de estudio. La evaluación histológica local mediante parámetros como necrosis tipo apoptosis, halo claro perinuclear, núcleos claros y vacuolizaciones no mostró diferencias entre los grupos experimental y control (tabla 2).

Tabla 2. Parámetros histológicos de integridad celular

| Parámetros | Control (n=5) | Experimental (n=5) | p |
|--------------------------------|---------------|--------------------|----|
| Necrosis tipo apoptosis | 0.8 ±0.3 | 0.8 ±0.3 | NS |
| Halo Claro Perinuclear | 0.8 ±0.3 | 0.8 ±0.0 | NS |
| Núcleos Claros | 0.8 ±0.0 | 0.8 ±0.3 | NS |
| Vacuolizaciones | 0.73 ±0.30 | 0.9 ±0.14 | NS |

*Los valores muestran medias ±1SD. $p < 0.05$, mediante prueba U de Mann-Whitney.

NS: no significativo

Estos parámetros de integridad celular fueron complementados por la evaluación histológica de células inmunitarias *in situ*. No se observaron diferencias significativas en la presencia de neutrófilos en el plano superficial ni en el plano del corion del epitelio vaginal; los linfocitos en el plano superficial mostraron discretas diferencias, en cambio, en el plano del corion no mostraron ninguna diferencia. A nivel del epitelio de transición no se observaron diferencias importantes que impliquen toxicidad del producto.

Toxicidad subaguda: Se establecieron cinco grupos de ratas hembra Sprague Dawley sin contacto previo con ejemplares macho: grupo vehículo (n=10), grupo dosis mínima (n=10), grupo dosis media (n=10), grupo dosis máxima (n=10) y grupo control (n=8). Durante 14 días recibieron diariamente por vía vaginal el gel con extracto de *Opuntia soehrensii*, en tres concentraciones (dosis mínima 0.21 mg/dL, dosis media 0.66 mg/dL y dosis máxima 2.1 mg/dL), un grupo recibió gel sin extracto vegetal (grupo vehículo) y otro no recibió ningún producto, pero fue sometido a la maniobra de administración (grupo

control). En todos los grupos se distribuyeron los animales al azar y de acuerdo con los diferentes pesos (240-280 g).

El comportamiento de los animales fue evaluado mediante el test de Irwin en tres áreas del SNC: (área motora, efectos generales y efectos subjetivos). Los resultados de los diferentes parámetros mostraron similitudes entre todos los grupos, con ausencia de mortalidad y morbilidad.

La ganancia de peso a lo largo de los 14 días mostró los incrementos fisiológicamente esperados (Tabla 3), no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados. Los consumos de alimento y agua no fueron diferentes entre los grupos. La tabla 3, muestra los valores encontrados.

Tabla 3. Parámetros generales evaluados en la toxicidad subaguda, en los diferentes grupos

| Parámetros | Control | Vehículo | DOSIS | | | <i>p</i> |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------|
| | | | Mínima | Media | Máxima | |
| Incremento de pesos a lo largo de 14 días (r)* | 0.87 | 0.94 | 0.94 | 0.94 | 0.87 | 0.406 |
| Consumo de alimento g/24 horas** | 15.92 ±1.19 | 15.53 ±2.13 | 16.31 ±3.08 | 17.5 ±4.59 | 16.19 ±2.86 | 0.658 |
| Consumo de agua mL/100g/día** | 33.92 ±5.85 | 34.49 ±5.44 | 36.44 ±3.41 | 33.79 ±3.08 | 32.69 ±3.34 | 0.407 |

**r* valor obtenido por regresión lineal que muestra la ganancia de peso durante el tiempo de estudio. La significancia ($p < 0.05$) se exploró aplicando la prueba de Kruskal-Wallis.

**Muestran promedios $\pm 1SD$. La significancia de $p < 0.05$ se determinó mediante ANOVA.

Los valores hematológicos en los diferentes grupos de estudio fueron similares para todos los parámetros examinados. La Tabla 4, muestra los resultados obtenidos.

Tabla 4. Parámetros hematológicos

| Parámetros | Control | Vehículo | DOSIS | | | <i>p</i> |
|------------|---------|----------|--------|-------|--------|----------|
| | | | Mínima | Media | Máxima | |
| | | | | | | |

| | | | | | | |
|--|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------|
| Hemoglobina g/dL | 15.84 ±1.5 | 15.6 ±0.95 | 16.34 ±1.9 | 15.6 ±0.8 | 15.2 ±0.8 | 0.358 |
| Plaquetas /mm³ | 547500 ±130623.8 | 616600 ±97384.9 | 657000 ±55425.6 | 585800 ±141824.5 | 566600 ±87515.3 | 0.203 |
| Glóbulos blancos/mm³ | 7507 ±1705.9 | 7370 ±2051.4 | 7876 ±1534.0 | 7996 ±2030.4 | 7790 ±2347.5 | 0.952 |
| Neutrófilos/mm³ | 1627.2 ±580.2 | 1452.2 ±473.9 | 1708.3 ±460.5 | 1880.0 ±879.2 | 1653.8 ±700.8 | 0.675 |
| Linfocitos/mm³ | 5435.27 ±1134.9 | 5505.06 ±1591.1 | 5495.9 ±1033.7 | 5701.0 ±1352.7 | 5713.22 ±1608.2 | 0.977 |
| Monocitos/mm³ | 386.9 ±133.9 | 341.4 ±175.8 | 318.12 ±146.9 | 365.2 ±145.2 | 332.1 ±157.7 | 0.885 |

*Los valores representan promedios ±1SD. La p (con significancia <0.05) fue determinada utilizando la prueba de ANOVA.

La química clínica evaluó nueve marcadores de rutina, cuyos resultados se muestran en la Tabla 5. La significancia ($p < 0.05$) fue determinada mediante la prueba ANOVA para diversos grupos.

Se aprecia que las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas y los rangos encontrados permanecieron entre los rangos fisiológicos.

Tabla 5. Marcadores bioquímicos

| Parámetros | Control | Vehículo | DOSIS | | | P |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-------|
| | | | Mínima | Media | Máxima | |
| Triglicéridos mg/dL | 76.04 ±20.53 | 75.33 ±21.84 | 79.12 ±13.21 | 75.14 ±18.08 | 78.96 ±38.9 | 0.994 |
| Colesterol mg/100mL | 46.68 ±12.54 | 47.7 ±9.96 | 49.8 ±9.6 | 50.3 ±11.6 | 46.6 ±12.9 | 0.918 |
| Urea mg/100mL | 77.67 ±5.01 | 75.56 ±7.8 | 81.69 ±12.85 | 77.1 ±7.7 | 78.6 ±14.4 | 0.894 |
| Creatinina mg/dL | 0.81 ±0.9 | 0.80 ±0.07 | 0.80 ±0.11 | 0.79 ±0.10 | 0.80 ±0.14 | 0.992 |

| | | | | | | |
|--------------------------------|---------------|-------------|---------------|---------------|---------------|-------|
| Proteínas totales g/dL | 5.24 ±1.01 | 5.3 ±0.97 | 5.3 ±1.2 | 5.13 ±1.2 | 5.2 ±1.5 | 0.998 |
| GPT UI/L | 40.62 ±4.20 | 39.43 ±4.4 | 38.45 ±7.64 | 40.46 ±6.24 | 37.59 ±5.35 | 0.754 |
| GOT UI/L | 87.67 ±6.74 | 80.39 ±9.03 | 77.16 ±14.14 | 80.11 ±10.26 | 80.89 ±12.17 | 0.654 |
| Bilirrubina total mg/dL | 0.15 ±0.4 | 0.15 ±0.09 | 0.16 ±0.04 | 0.15 ±0.05 | 0.14 ±0.07 | 0.940 |
| Glucosa mg/dL | 152.98 ±34.02 | 149.3 ±34.6 | 152.98 ±34.02 | 137.25 ±28.87 | 149.20 ±44.98 | 0.854 |

*Los valores muestran promedios ±1SD. La significancia ($p < 0.05$) fue determinada mediante la prueba ANOVA.

La evaluación del microbiota vaginal mostró presencia de bacilos Gram (-) a predominio de *E. coli* entre moderados y abundantes en los cinco grupos estudiados. La figura 1, muestra estas características. No se identificaron bacilos Gram (+) en ninguno de los casos. Por otro lado, se evaluó la presencia de cocos Gram (+) y (-).

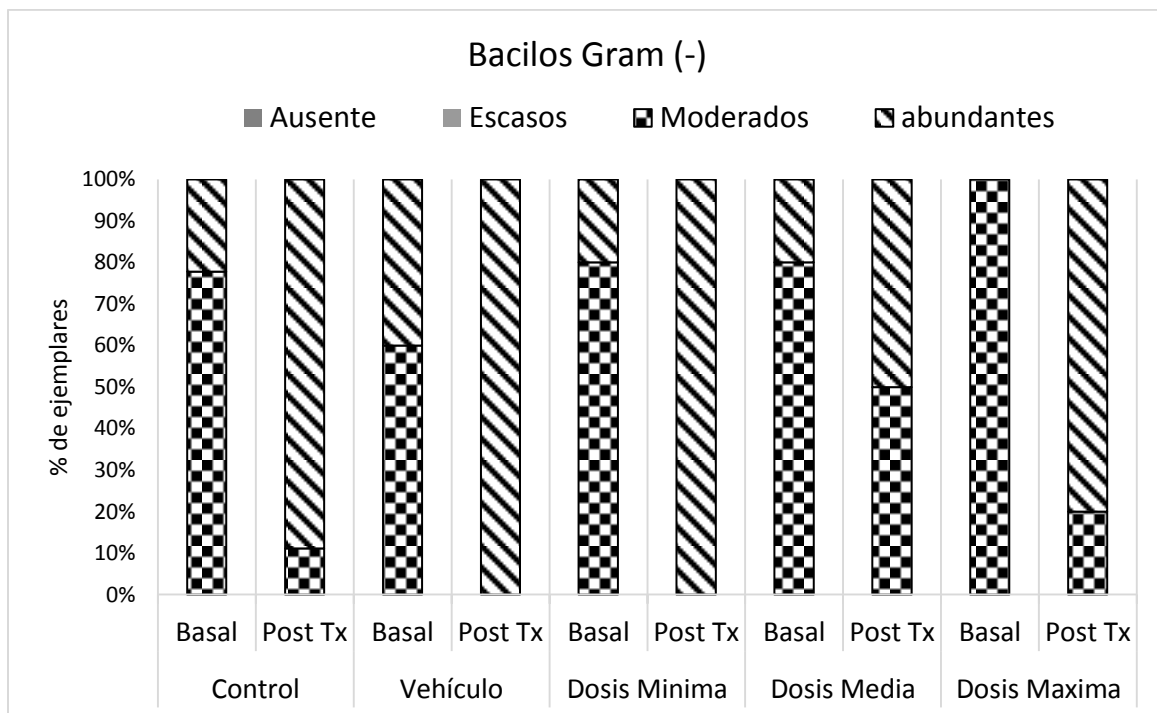


Figura 1. Distribución de bacilos Gram (-) microbiota vaginal, en ratas Sprague Dawley hembras que recibieron aplicación vaginal del extracto de *Opuntia soehrensii* en gel.

Respecto a los Cocos Gram (+), predominó la ausencia de estos en todos los grupos. La presencia de cocos Gram (-) fue menor en estado basal que en el post tratamiento en los grupos control, vehículo y dosis mínima, a diferencia de los grupos media y máxima en los que, los casos abundantes fue menor; esto podría estar relacionado con los hábitos de limpieza de la zona ano-genital en los roedores, la misma que se realiza mediante el lamido; en ese orden, se podría asumir que una mayor concentración del producto alteró la palatabilidad en la zona, provocando ausencia de lamido de limpieza a mayores concentraciones del gel de *Opuntia*.

En la citología vaginal por frotis se observó que el fenotipo celular conservó sus características fisiológicas para cada fase del ciclo estral y en cada uno de los ejemplares, tanto en estado basal como post tratamiento. Las células inmunitarias y restos celulares *in situ* mostraron similitudes, con predominio de ausencia de neutrófilos en estado basal y post tratamiento en todos los grupos; en similar proporción fue seguido de presencia escasa y moderada también en todos los grupos. Los restos celulares, estuvieron entre ausentes y presencia escasa en todos los grupos, en ningún caso se observaron diferencias significativas.

La histología *in situ*, evaluó la probable reacción inflamatoria mediante la presencia o ausencia de neutrófilos y de linfocitos (Crum, 2000), en dos planos celulares: a) plano celular superficial y corión de epitelio vaginal y b) plano superficial y dermis en epitelio de escamoso del área de unión con piel. En plano superficial de epitelio vaginal, la proporción de neutrófilos se distribuyó entre ausentes y presencia escasa, para todos los grupos; a nivel del plano profundo o corion todos los grupos fueron predominantemente escasos, seguidos de presencia moderada para todos los grupos, no se observaron diferencias significativas.

En el área de unión de epitelio escamoso con piel, a nivel del plano superficial se observó ausencia de neutrófilos en alta proporción. En el plano profundo o dermis se observó igual proporción entre ausencia y presencia escasa en todos los grupos. La cuantificación de estos valores se muestra en la tabla 6, en la que se observa la inexistencia de diferencias estadísticas entre los grupos estudiados, estableciendo que no hubo reactividad inflamatoria aguda al gel en el nivel local.

Los Linfocitos en epitelio vaginal en el plano superficial fueron ausentes o escasos en todos los grupos; en el nivel del plano profundo la respuesta se distribuyó entre escasos,

ausentes y moderados de manera similar en todos los grupos, En el área de unión del epitelio escamoso con la piel de la región vulvar, las características en el plano superficial fueron de ausencia total en todos los grupos. En el plano profundo, en todos los grupos se observó distribución proporcional entre ausencias y presencia escasa, con un ejemplar que mostró presencia moderada en el grupo vehículo. Lo anterior muestra que tampoco hubo reactividad inflamatoria de tipo crónico en los tejidos genitales de los animales tratados con el gel.

También evaluamos cuatro parámetros de integridad celular: necrosis tipo apoptosis, halo claro perinuclear, núcleos claros y vacuolizaciones. La necrosis tipo apoptosis (NTA), es un tipo de muerte celular producido por estímulos nocivos administrados en dosis bajas, como fármacos cito tóxicos anticancerosos o inclusive la hipoxia. En todos los grupos hubo ausencia de esta variable de forma predominante, seguida de presencia escasa en todos los grupos.

El halo claro perinuclear (HCP), se describe a nivel de células superficiales e intermedias, (llamadas precancerosas y conocidas como coilocitos), que muestran la presencia de una vacuola alrededor del núcleo. Es un indicador de respuesta inflamatoria. La proporción dominante fue ausencia de este parámetro en todos los grupos, observándose solo un ejemplar con presencia escasa por grupo en vehículo, dosis mínima y dosis máxima. Los núcleos claros (NC), son característicos de las células del epitelio cilíndrico endocervical que tienen marcada fragilidad citoplasmática, lo que lleva a observar núcleos desnudos o claros, enmarcados por un anillo nuclear condensado hacia la periferia (Rodríguez Costa, 2018). Estos núcleos claros o en vidrio esmerilado se observan de manera abundante en los casos de *Herpes virus* en humanos (García Bermejo, 2018). Los resultados mostraron distribución entre ausencia y presencia escasa en todos los grupos. Las vacuolizaciones (Vac), en las células del epitelio vaginal son parte de la expresión de los mecanismos de modulación del pH como protector contra agentes patógenos externos (Gartner & Hiatt, 1997). De forma patológica estas imágenes se pueden observar cómo acumulación anormal de agua en el citoplasma celular en forma de pequeñas vacuolas, denominada degeneración hidrópica o vacuolar (Ríos Dalenz J., et al., 1998). Los resultados mostraron ausencia en elevada proporción en todos los grupos, con algunos casos de presencia escasa y moderada en todos los grupos con excepción del grupo control. La tabla 6, muestra los resultados, y la ausencia de diferencias significativas entre los grupos control

y los experimentales. Se establece así que la aplicación del gel de manera diaria a lo largo de 14 días en el tracto genital no genera cambios que sean expresión de reactividad inducida por irritación o efecto toxico.

Tabla 6. Marcadores de integridad celular y células de respuesta inmunitaria

| Parámetros | Control | Vehículo | DOSIS | | | p1 | p2 | p3 | p4 |
|---|------------|------------|-----------|------------|------------|-------|-------|-------|-------|
| | | | Mínima | Media | Máxima | | | | |
| Necrosis Tipo Apoptosis | 0.8 ±0.3 | 0.5 ±0.06 | 0.7 ±0.14 | 0.7 ±0.10 | 0.55 ±0.25 | 0.128 | 0.683 | 0.683 | 0.248 |
| Halo Claro Perinuclear | 1.12 ±0.0 | 0.65 ±0.5 | 0.7 ±0.40 | 1.12 ±0.0 | 0.7 ±0.5 | 0.221 | 0.221 | 1.00 | 0.221 |
| Núcleos Claros | 0.7 ±0.09 | 0.65 ±0.21 | 0.71 ±0.0 | 0.6 ±0.2 | 0.7 ±0.14 | 1.00 | 1.00 | 0.543 | 1.00 |
| Vacuolizaciones | 1.12 ±0.0 | 0.5 ±0.3 | 0.6 ±0.13 | 0.6 ±0.14 | 0.6 ±0.13 | 0.180 | 0.147 | 0.157 | 0.180 |
| Neutrófilos en plano superficial | 0.7 ±0.3 | 0.5 ±0.15 | 0.7 ±0.14 | 0.65 ±0.07 | 0.7 ±0.14 | 0.374 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Neutrófilos en corion | 0.8 ±0.3 | 0.5 ±0.2 | 0.6 ±0.06 | 0.95 ±0.07 | 0.53 ±0.30 | 0.374 | 0.519 | 0.683 | 0.374 |
| Linfocitos en plano superficial | 0.65 ±0.07 | 0.65 ±0.21 | 0.7 ±0.42 | 0.8 ±0.60 | 0.65 ±0.21 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Linfocitos en corion | 0.6 ±0.4 | 0.6 ±0.45 | 0.6 ±0.22 | 0.8 ±0.42 | 0.6 ±0.42 | 1.00 | 0.724 | 0.374 | 1.00 |

*Los valores centrales muestran medias ±1SD. La significancia estadística para $p < 0.05$ se determinó mediante la prueba U de Mann-Whitney. p1 diferencias, entre grupos control y vehículo, p2 entre grupo control y dosis mínima, p3 entre grupo control y dosis media, p4 entre grupo control y dosis máxima.

CONCLUSIONES

La evaluación sistémica de los marcadores de afectación toxica evidenció el estado saludable de los ejemplares estudiados mediante parámetros de comportamiento y marcadores hematológicos y bioquímicos. La identificación de la microbiota, no mostró variaciones significativas en post administración del producto, por lo que asumimos no existir efectos negativos a ese nivel. La citología evidenció conservación de: el fenotipo celular durante las fases del ciclo estral, los neutrófilos y restos celulares *in situ*, ya que se

mantuvieron constantes en todos los grupos tanto en el estudio agudo como en el subagudo. Los hallazgos histológicos de integridad celular, como NTA, NC mostraron distribuciones similares en todos los grupos. Otros parámetros como HCP y Vac mostraron leves diferencias entre los grupos que podrían explicarse por una coincidente mayor actividad estrogénica en algunos de los ejemplares. Finalmente, la histología de hígado y riñones mostró integridad celular y funcional. Concluimos que *Opuntia soehrensii* no muestra indicadores de toxicidad significativos.

AGRADECIMIENTOS: Proyecto desarrollado con fondos de la Cooperación Sueca ASDI-SAREC. Al personal del bioterio del IBBA: Sra. H. Mamani, Sra. R. Sandoval y Sr. J. Condo. A Belizabeth Cárdenas Miranda, Lic. Lab. Clin.

REFERENCIAS

Álvarez, D. M., Castillo, E., Duarte, L. F., Arriagada, J., Corrales, N., Farías, M. A., Henríquez, A., Agurto-Muñoz, C., & González, P. A. (2020). Current Antivirals and Novel Botanical Molecules Interfering With Herpes Simplex Virus Infection. *Frontiers in Microbiology*, 11(139), 1-19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00139>

Ariza-Heredia, E. J., Chemaly, R. F., Shahani, L. R., Jang, Y., Champlin, R., & Mulanovich, V. E. (2018). Delay of Alternative Antiviral Therapy and Poor Outcomes of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Infections in Recipients of Allogeneic Stem Cell Transplant. *Transpl Int.*, 31(6), 639-648. <https://doi.org/doi:10.1111/tri.13142>.

Berger Stephen. (2022). *Infectious diseases of Bolivia*. Gideon. https://books.google.com.bo/books?id=7mxkEAAAQBAJ&newbks=1&newbks_redir=0&printsec=frontcover&dq=Infectious+diseases+of+Bolivia+Berger+S&hl=es&redir_esc=y#v=onepage&q=Infectious%20diseases%20of%20Bolivia%20Berger%20S&f=false

Camaqui Mendoza Alberto. (2009). *Plantas medicinales La experiencia de Tinguipaya* (Alberto Camaqui Mendoza © Cooperación Italiana © Embajada de Italia en Bolivia © Editorial Gente Común). Editorial Gente Común.

Carvajal R. y López Y. 2014. Autenticación Herbario Nacional. Instituto de Ecología. Carrera de Biología. Facultad de Ciencias Puras de la Universidad Mayor de San Andrés.

Centre de Recherche du CHUQ. (2009). *Frottis vaginale chez la rate*. Centre Hospitalier Universitaire de Quebec.

Cora Michelle C. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, 43, 776-793.

Crum, C. P. (2000). Aparato genital femenino. En *Patología Estructural y Funcional Robbins* (Sexta, Vol. 1, pp. 1079-1136). McGraw-Hill Interamericana Editores S.A.

Garber, A., Barnard, L., & Pickrell, C. (2021). Review of Whole Plant Extracts With Activity Against Herpes Simplex Viruses In Vitro and In Vivo. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 26, 1-57. <https://doi.org/10.1177/2515690X20978394>

Gomes Vilela Marcio. (2007). Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina*, 35(10), 667-670.

Lin, X., Xuan-Lei, Z., Zhi-Chao, X., Yang, L., & Hong-Xi, X. (2022). Medicinal plants and natural compounds against acyclovir-resistant HSV infections. *Frontiers in Microbiology, Review*, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1025605>

Majewska, A., & Mlynarczyk-Bonikowska, B. (2022). 40 years after Registration of Acyclovir: Do we need new anti-herpetic drugs? *International Journal of Molecular Science*, 23, 3431-3464.

Mamani V. Gaby. (2004). Actividad Antiviral anti-Herpes simplex de Opuntia spp., un producto natural Andino. *Biofarbo*, 12, 21-26.

Marcondes, F. K. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, 62(4A), 609-614.

Mårten Strand. (2014). *The Discovery of Antiviral Compounds Targeting Adenovirus and Herpes Simplex Virus Assessment of Synthetic Compounds and Natural Products* [Doctoral thesis, Umeå University Clinical Microbiology, Virology]. <http://umu.diva-portal.org/>

Moscardo, E., Maurin, A., Dorigatti, R., Champeroux, P., & Serge, R. (2007). An optimized methodology for the neurobehavioural assessment in rodents. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 56(2), 239-255. <https://doi.org/doi:10.1016/j.vascn.2007.03.007>. Epub 2007 May 24.

OECD Paris. (2015). *OECD Guideline for testing of chemicals Acute Dermal Irritation/Corrosion*.

OMS. (2023). Virus del herpes simple [Institucional]. *Centro de prensa -Notas descriptivas-Virus del herpes simple*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>

Paccola C.C. (2013). The rat estrous cycle revisited: A quantitative and qualitative analysis. *Anim. Reprod*, 10(4), 677-683.

Ricardo Lazo (2022) *Práctica n° 03 test de Irwin - Informes—Ricardolazo*. (s. f.). Recuperado 3 de junio de 2022, de <https://www.clubensayos.com/Psicolog%C3%ADa/PR%C3%81ctica-n-03-test-de-irwin/3472856.html>

Ramaiah, S. K. (2016). Regulatory Forum Opinion Piece*: Veterinary Pathologists in Translational Pharmacology and Biomarker Integration in Drug Discovery and Development. *Toxicologic Pathology*, 44(2), 137-146.

Ríos Dalenz, J., Wayllace G. L., Panozo M. W., Serrano C. R., Sangüeza P. V., Trujillo C. M. (1998). *Patología General*. Editorial Juventud.

Rodríguez Costa, J., De Agustín V. D., Torres G. F. J., Mayayo A. E., Alameda Q. F., Lloveras R. B., et al. (2018). *Cuadernos de Cito patología. Citología ginecológica* (Vol. 14). Díaz de Santos.
<https://books.google.com.bo/books?id=reludwaaqbaj&pg=pa14&lpg=pa14&dq=n%c3%bacleos+claros+epitelio+cilindrico+endocervical+herpes&source=bl&ots=-vyc2cqs52&sig=acfu3u1h4tqohbfc4hmshbuej0laaddtjw&hl=es-419&sa=x&ved=2ahukewio2dtgm6h4ahxyerkghddkblm4kbdoaxoeccgqaw#v=onepage&q=n%c3%bacleos%20claros%20epitelio%20cilindrico%20endocervical%20herpes&f=false>

Salvador, N., Guillen, J., & Peralta, J. M. (2008). Variables condicionantes. Parámetros fisiológicos, hemáticos, bioquímicos y otros Capítulo 6. En *Ciencia y tecnología del animal de laboratorio: Vol. Volumen I* (Universidad de Alcalá-Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), pp. 151-182).

Tomlinson, L. (2016). STP Best Practices for Evaluating Clinical Pathology in Pharmaceutical Recovery Studies. *Toxicologic Pathology*, 44(2), 163-172.

Zambrana Santander Silvia Tatiana. (2006). Estudios sobre la acción antiviral de *Opuntia soehrensii*. ¿Actividad protectora de la infección por HSV? *Biofarbo*, XIV, 51-56.

Zambrana Santander Silvia Tatiana. (2007). *Caracterización de la actividad biológica de Opuntia soehrensii empleando como modelo la infección in vitro del Herpes virus simplex*. [Magister Scientiarum tesis]. Universidad Mayor de San Andrés.

Zúñiga J. M. (2001). Procedimientos experimentales en farmacología y toxicología. En *Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal* (pp. 499-503). Mc Graw Hill.