

Método para evaluar la eficacia *in vitro* de formulaciones contra el Herpes simple tipo I

Method to evaluate the *in vitro* efficacy of formulations against Herpes simplex type I

Maria Paz Cáceres Villalba¹, Gladys Mabel Maidana de Larroza¹, Pablo Hernán Sotelo Torres^{1*}

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas. San Lorenzo, Paraguay

Cómo citar/How cite:

Cáceres Villalba MP, Maidana de Larroza GM, Sotelo Torres PH. Método para evaluar la eficacia *in vitro* de formulaciones contra el Herpes simple tipo I. Rev. cient. cienc. salud. 2025; 7: e7116. [10.53732/rccsalud/2025.e7116](https://doi.org/10.53732/rccsalud/2025.e7116)

Fecha de recepción:

03/05/2025

Fecha de revisión:

10/06/2025

Fecha de aceptación:

29/07/2025

Autor correspondiente:

Pablo Hernán Sotelo Torres

e-mail:

phsotelo@qui.una.py

Editor responsable:

Margarita Samudio

Universidad del Pacífico.

Dirección de Investigación.

Asunción, Paraguay

e-mail:

margarita.samudio@upacifico.edu.py



Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una [Licencia Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

RESUMEN

Introducción. El Virus del Herpes Simple tipo I (VHS-1) presenta alta prevalencia, incidencia y morbilidad a nivel mundial. El tratamiento habitual emplea análogos de nucleósidos, sin embargo, su uso prolongado ha generado resistencia viral, impulsando la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. En este contexto, en los procesos de formulación, los ensayos preclínicos *in vitro* ofrecen ventajas como control de variables, estandarización y simplicidad frente a estudios *in vivo*, aunque existen pocas evidencias sobre su uso en la evaluación de formulaciones tópicas antivirales.

Objetivo. Evaluar un método para determinar la eficacia *in vitro* de formulaciones contra el VHS-1. **Materiales y Métodos.** Se formularon cremas, geles y pomadas con aciclovir al 5% como principio activo de referencia. Se evaluaron la citotoxicidad mediante Resazurina y la actividad antiviral mediante la cuantificación de genoma viral por qPCR. **Resultados.** La pomada presentó concentración citotóxica 50 de 495 µg/mL, Concentración Inhibitoria 50 de 3,6 µg/mL e Índice de Selectividad de 137,5. El gel mostró una concentración citotóxica 50 de 582,4 µg/mL, una concentración inhibitoria 50 <1,2 µg/mL y un índice de selectividad >465. **Conclusión.** El sistema *in vitro* basado en citotoxicidad y cuantificación viral por qPCR resultó eficaz para la evaluación de formulaciones tópicas. Los valores obtenidos estuvieron dentro de los rangos esperados, lo que resalta el potencial del método como herramienta preliminar que permite optimizar y simplificar el diseño de estudios *in vivo* posteriores.

Palabras clave: Herpes simplex 1; antivirales; evaluación preclínica de medicamentos; aciclovir

ABSTRACT

Introduction. Herpes Simplex Virus type I (HSV-1) has a high prevalence, incidence, and morbidity worldwide. The usual treatment employs nucleoside analogues; however, its prolonged use has led to viral resistance, prompting the search for new therapeutic alternatives. In this context, *in vitro* preclinical assays in the formulation processes offer advantages such as variable control, standardization, and simplicity compared to *in vivo* studies, although there is limited evidence regarding their use in the evaluation of topical antiviral formulations. **Objective.** To evaluate a method for determining the *in vitro* safety and efficacy of formulations against HSV-1. **Materials and Methods.** Creams, gels, and ointments were formulated with 5% acyclovir as the reference active ingredient. Cytotoxicity was assessed using Resazurin, and antiviral activity was evaluated by quantifying the viral genome through qPCR. **Results.** The ointment showed a CC₅₀ of 495 µg/mL, IC₅₀ of 3.6 µg/mL, and an SI of 137.5. The gel showed a CC₅₀ of 582.4 µg/mL, an inhibitory concentration 50 <1.2 µg/mL, and a selectivity index SI >465. **Conclusion.** The *in vitro* system based on cytotoxicity and viral quantification by qPCR was effective for evaluating topical formulations. The values obtained were within expected ranges, highlighting the method's potential as a preliminary tool to optimize and simplify the design of subsequent *in vivo* studies.

Key words: Herpes simplex 1; antivirals; preclinical evaluation of drugs; acyclovir

INTRODUCCIÓN

El Virus del Herpes Simple tipo I (VHS-1) es un virus de ADN de doble cadena, perteneciente a la familia *Herpesviridae*, género *simplexvirus*⁽¹⁾. Las infecciones causadas por este virus son un problema de salud a nivel mundial, con altas tasas de prevalencia e incidencia, donde se estima que más del 50% de la población mundial está infectada con este virus. En Latinoamérica, la prevalencia del HSV-1 también es alta, con estudios que reportan tasas de seropositividad que van desde el 60% hasta el 90% en algunas poblaciones⁽²⁾. Entre las manifestaciones clínicas más comunes se destaca la aparición de lesiones mucocutáneas a nivel orobucal pudiendo incluso manifestarse en la zona genital⁽³⁾. Además, el VHS-1 es una de las causas más comunes de encefalitis esporádica en adultos y niños, con altas tasas de mortalidad en el caso de los neonatos y pacientes inmunodeprimidos como portadores del VIH^(4,5).

Considerando que el virus infecta de manera latente a neuronas, actualmente no existe forma de eliminar el virus por completo del organismo, pudiendo causar infecciones recurrentes a lo largo de toda la vida de las personas. Entre los fármacos más utilizados para el tratamiento de las lesiones causadas por esta infección encontramos a los análogos de nucleósidos como el aciclovir, valaciclovir, famciclovir y penciclovir, con buenas tasas de eficacia en la reducción de lesiones y sintomatología, además de ser bien tolerados^(6,7). Sin embargo, uno de los inconvenientes principales con estos medicamentos es el incremento de la aparición de resistencias a los mismos, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos⁽⁸⁾, por lo que nos lleva a la necesidad de búsqueda de nuevos activos y formulaciones para el tratamiento de estas afecciones.

Los estudios preclínicos *in vitro* son una parte esencial dentro del proceso de desarrollo de nuevos fármacos, ya que brindan información relevante sobre la eficacia y seguridad de estos⁽⁹⁾. Estos ensayos tienen algunas ventajas, como velocidad del ensayo, reducción de costos y su potencial de automatización, siendo fundamental para reducir u optimizar los ensayos basados en animales de experimentación^(10,11). Es por ello, que través de la evaluación de la citotoxicidad y actividad antiviral de bases tópicas conteniendo activos de interés a través de cuantificación de genoma viral por qPCR, se buscó generar una técnica que permita evaluar la eficacia *in vitro* de formulaciones tópicas con distintos excipientes y propiedades fisicoquímicas. Esto permitiría la selección de las formulaciones más adecuadas según estos parámetros que permitan simplificar ensayos posteriores como los ensayos *in vivo*, disminuyendo los animales a utilizar y lograr así la reducción de costos y tiempo de ensayo. Para ello, se utilizó como activo a evaluar el aciclovir, de actividad antiviral reportada y ampliamente descrita contra el VHS-1 de manera a utilizarlo como referencia para evaluar la eficacia del sistema.

METODOLOGIA

Virus y células

Las células Vero CCL81 (células de riñón de mono verde africano) fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, EE.UU) suplementado con 7,5% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco, EE.UU), aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomycin, a 37°C en una atmósfera humedecida con CO₂ al 5%. La cepa F de HSV-1 se cultivó en células Vero y el stock viral fue cuantificado mediante un ensayo en placas.

Drogas

El Acyclovir (9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]guanine) (Sinoway industrial Co.,Ltd, China) fue adquirido a través de un proveedor local, con su certificado de calidad correspondiente y almacenado según sus especificaciones técnicas.

Preparación de bases tópicas, formulaciones tópicas y controles

El desarrollo de todas las formulaciones fue realizado con excipientes consideradas seguras para uso farmacéutico y cuyos proveedores fueron autorizados por la autoridad sanitaria correspondiente. Además, fueron realizados controles básicos de calidad en base a monografías oficiales.

Fórmulas de bases tópicas

Crema base: Ceral-10 (Fabriquímica, Argentina) 10%, vaselina líquida (Arrowchem, China) 5%, propilparabeno (Gemini exports, India) 0,02%, metilparabeno (Gemini exports, India) 0,1%, Glicerina (Arrowchem, China) y agua destilada csp 100 g

Gel base: Carbopol 940 (BTP Pharm, China) 1%, metilparabeno (Gemini exports, India) 0,1%, glicerina Arrowchem, China) 4%, trietanolamina (Arrowchem, China) 0,05% y agua destilada csp 100 g.

Pomada: Vaselina líquida (Arrowchem, China) 20% y vaselina sólida (Arrowchem, China) csp. 100 g.

Una vez obtenidas las bases tópicas, se elaboraron formulaciones incorporando a este aciclovir al 5%.

Ensayo de citotoxicidad *in vitro* de bases y formulaciones tópicas

El ensayo se llevó a cabo como fue descrito por Cantero-González et al⁽¹²⁾ Para evaluar la toxicidad celular, se sembraron células Vero en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas, se eliminó el sobrenadante, se agregaron las muestras disueltas previamente a diferentes concentraciones en medio DMEM (GIBCO, EE.UU) con un 7,5% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO, EE.UU). A las 72 horas, se agregaron 20 µL de Resazurina (Alfa Aesar, China) y se incubó durante 3 horas a 37°C en un ambiente con un 5% de CO₂. Posteriormente, se midió la absorbancia de la placa a 570 y 630 nm.

Primeramente, se evaluó la citotoxicidad de las distintas bases tópicas (crema, gel y pomada) sin activo, de manera a evaluar la citotoxicidad propia de los excipientes sobre el sistema. En una segunda etapa, se evaluó la citotoxicidad de las formulaciones con el activo de interés (aciclovir al 5%). Como control, se utilizaron pocillos con células sin tratamiento.

Ensayo de actividad antiviral *in vitro* de bases y formulaciones tópicas

El ensayo se llevó a cabo como fue descrito por Gabaglio et al⁽¹³⁾. Brevemente, se sembraron células VERO en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ utilizando un medio DMEM con un 7,5% SFB. Luego, se procedió a la infección con el VHS-1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1,5, incubando durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, el medio con el virus fue reemplazado por las formulaciones a diferentes concentraciones previamente disueltas en medio DMEM 7,5% SFB, y se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂.

En una primera etapa, se evaluó la actividad de las distintas bases tópicas (gel y pomada) sin activo, de manera a evaluar la influencia de los excipientes sobre el sistema. En una segunda etapa, se evaluó la actividad antiviral de las formulaciones con el activo de interés (aciclovir al 5%). Como normalizador se utilizaron células infectadas con el virus y como grupo de control células que no fueron infectadas con el virus ni tratadas con la formulación, realizando únicamente la sustitución del medio.

Después de la incubación, se recolectaron los sobrenadantes de los pocillos para cuantificar el genoma viral mediante qPCR utilizando SYBR[®]Green (Bio-Rad, EEUU) como fluoróforo y un cebador para el gen ICP0⁽¹³⁾.

Determinación de la concentración citotóxica 50 (CC₅₀), concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) y el índice de selectividad (IS).

Para la determinación de IC₅₀ y CC₅₀ se ensayaron diferentes concentraciones (500, 400, 200, 250, 200, 100, 40, 20 µg/mL) de formulaciones con los activos de estudio para obtener curvas de dosis-respuesta.

La efectividad relativa del producto en investigación para inhibir la replicación viral en comparación con la inducción de la muerte celular se define como el índice terapéutico o de selectividad (IS) (es decir, CC₅₀ / IC₅₀). Fue realizado el cálculo del IS para las formulaciones de pomada y gel de Aciclovir.

RESULTADOS

Citotoxicidad de las bases tópicas y determinación de CC₅₀

Primeramente, se evaluó la toxicidad que las bases tópicas podían ejercer sobre el cultivo de manera a determinar si las mismas son aptas para ser evaluadas en este modelo. Para ello se procedió a realizar curvas de citotoxicidad y calcular la CC₅₀. Las concentraciones utilizadas para el análisis fueron de 5000, 2500, 1200, 1000, 500, 320, 160 y 80 µg/mL.

La crema base mostró una citotoxicidad elevada (>60%) en todas las concentraciones ensayadas. El gel y la pomada base en cambio, mostraron valores de CC₅₀ de 873,8 µg/mL ($r^2=0,9732$) (Figura 1A) y 797,2 µg/mL ($r^2=0,976$) (Figura 1B) respectivamente, siendo considerados aptos para ser utilizados en ensayos posteriores debido a su baja toxicidad.

Actividad antiviral de las bases tópicas y determinación de IC₅₀

A fin de determinar si las bases podrían ejercer algún efecto sobre el virus o procesos relacionados con la infección, se procedió a evaluar el efecto de las bases sobre modelo de infección *in vitro*. Para ello, se procedió a infectar células en presencia o ausencia de las bases tópicas para posteriormente proceder a la cuantificación de genoma viral de VHS-1 por qPCR. Como normalizador se realizaron infecciones ausencia de las de formulaciones de gel base y pomada base. Las concentraciones utilizadas para el análisis fueron de 2000, 500, 400, 300, 250, 200, 125 y 62,5 µg/mL. Tanto para el gel base como la pomada base se observó una acción inhibitoria sobre la infección a altas concentraciones, igual o mayores 200 µg/mL. Es por ello, que esta concentración fue considerada como la concentración máxima de base a utilizar para la medición de actividad antiviral de ensayos posteriores con los activos. Los valores de IC₅₀ obtenidas fueron de 224,6 µg/mL ($r^2=0,984$) para el Gel base (Figura 1C) y 196,1 µg/mL ($r^2=0,995$) para la Pomada base (Figura 1D).

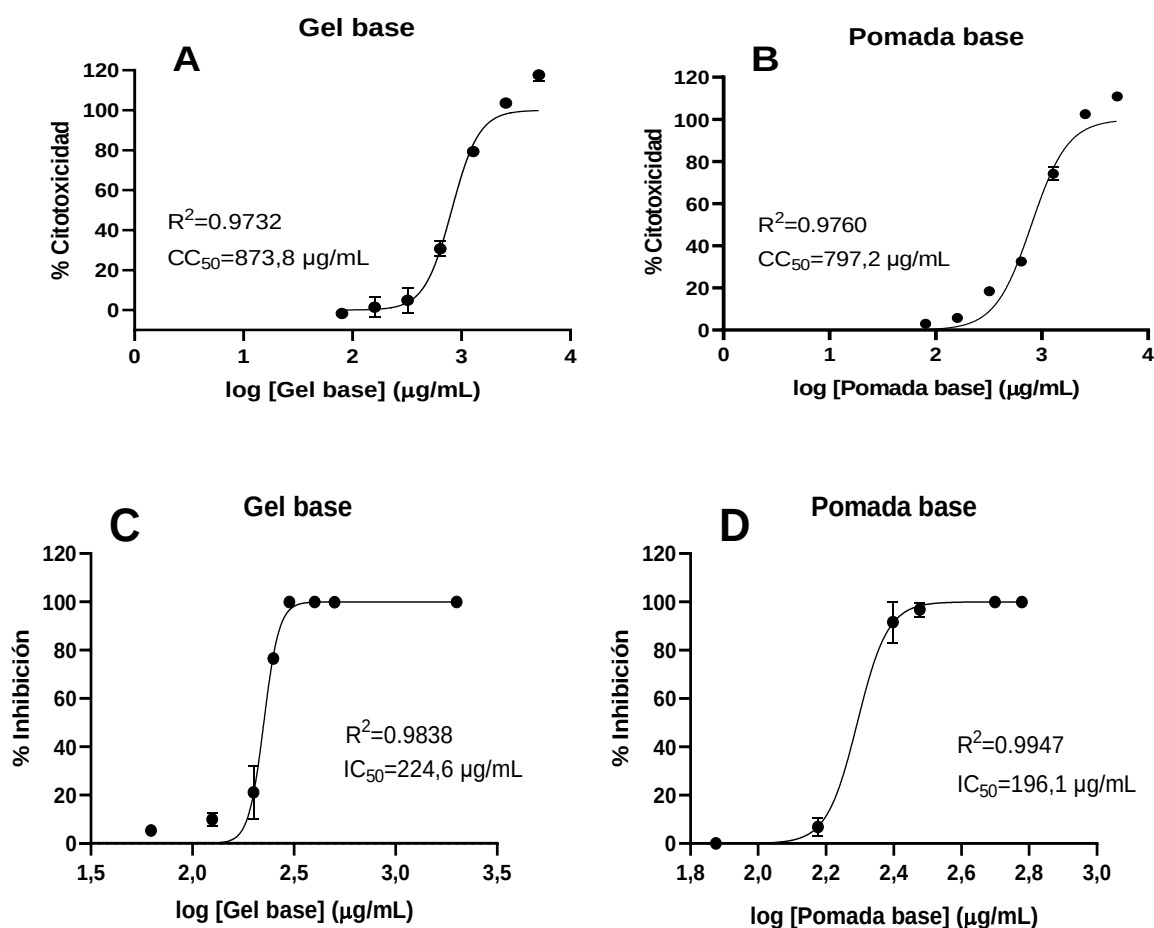


Figura 1. A Porcentaje de Citotoxicidad vs Concentración [$\log(\mu\text{g/mL})$] del Gel de Aciclovir. B Porcentaje de Citotoxicidad vs Concentración [$\log(\mu\text{g/mL})$] de la Pomada de Aciclovir. C Porcentaje de Actividad antiviral (Expresada en % de Inhibición viral) vs Concentración [$\log(\mu\text{g/mL})$] del Gel de Aciclovir. D Porcentaje de Actividad antiviral (Expresada en % de Inhibición viral) vs Concentración [$\log(\mu\text{g/mL})$] de la Pomada de Aciclovir 5%. En los gráficos los puntos indican el promedio de las mediciones ($n=2$), el r^2 , con la desviación estándar.

Citotoxicidad de las formulaciones de Aciclovir 5%

Al analizar la citotoxicidad de las formulaciones con aciclovir 5% se obtuvieron valores de CC_{50} de 582,4 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2=0,9634$) (Figura 2A) y 495,0 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2=0,8889$) (Figura 2B) para el Gel de Aciclovir y la Pomada de Aciclovir respectivamente, siendo estos valores un poco mayores a los CC_{50} obtenidos de las bases, comprobando así, una ligera influencia del activo sobre la toxicidad del sistema en estudio. Las concentraciones utilizadas para el análisis fueron de 500, 400, 250, 200, 100, 40 y 20 $\mu\text{g/mL}$.

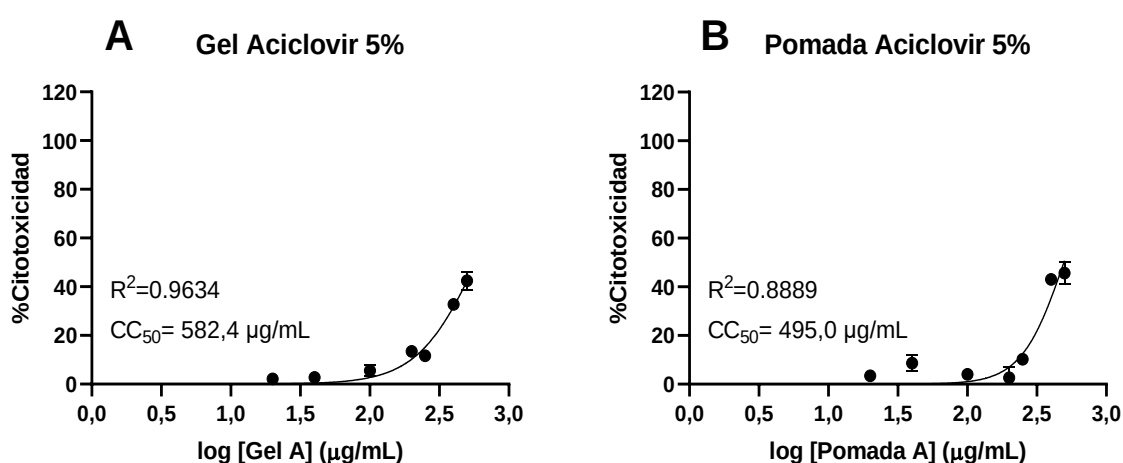


Figura 2. A Porcentaje de Citotoxicidad vs Concentración [$\log(\mu\text{g/mL})$] de Gel de Aciclovir 5%. B Porcentaje de Citotoxicidad vs Concentración [$\log(\mu\text{g/mL})$] de Pomada de Aciclovir 5%. En los gráficos los puntos indican el promedio de las mediciones ($n=2$) con la desviación estándar.

Actividad antiviral de formulaciones de aciclovir 5%

Posteriormente, se procedió a evaluar la actividad antiviral contra el HSV-1 de las formulaciones utilizando el método de cuantificación de genoma viral por qPCR, pudiendo así obtener el valor de IC_{50} de formulaciones de gel de aciclovir 5% y pomada de aciclovir 5%. Las concentraciones utilizadas para el análisis fueron de 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 y 1,25 $\mu\text{g/mL}$.

Para el caso del gel de aciclovir, se obtuvieron valores de $\text{IC}_{50} < 1,25 \mu\text{g/mL}$ ($r^2=0,908$), ya que se observaba un fenómeno de inhibición viral mayor al 70% incluso en la menor concentración de ensayo (Figura 3A). En el caso de la Pomada de Aciclovir se obtuvo un valor de IC_{50} de 3,6 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2=0,889$) (Figura 3B). El Gel presentó mejores valores de IC_{50} en comparación a la Pomada que puede deberse a la naturaleza hidrofílica y polimérica del gel, que permite un mejor contacto con el sistema de ensayo.

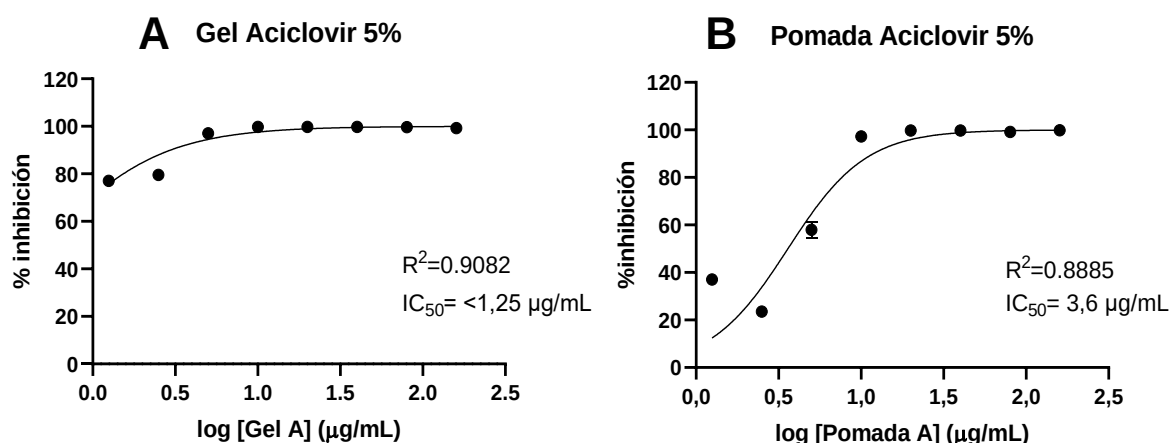


Figura 3. A Porcentaje de Actividad antiviral (expresada en % de Inhibición viral) vs Concentración [$\log(\mu\text{g/mL})$] de Gel de aciclovir 5%. B Porcentaje de Actividad antiviral (expresada en % de Inhibición viral) vs Concentración [$\log(\mu\text{g/mL})$] de Pomada de aciclovir 5%. En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ($n=2$) con la desviación estándar.

Cálculo del Índice de Selectividad de las formulaciones

Por último, se procedió a calcular el valor de Índice de Selectividad (IS) para las formulaciones evaluadas (Tabla 1).

Tabla 1. Índice de Selectividad de distintas formulaciones de Aciclovir 5%

Formulación	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	IS (CC ₅₀ /IC ₅₀)
Gel Aciclovir 5%	582,4	<1,25	>465,92
Pomada Aciclovir 5%	495,0	3,6	137,5

DISCUSIÓN

El aumento de la morbilidad a nivel mundial de las infecciones por VHS-1 y la aparición de cepas resistentes al aciclovir sobre todo en pacientes inmunocomprometidos, ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antiviral frente a este virus. Dentro del proceso de desarrollo de nuevas formulaciones, los estudios *in vitro* nos pueden brindar información preliminar muy valiosa sobre la seguridad y efectividad de un medicamento. Este proyecto tuvo el fin de desarrollar una técnica de evaluación de formulaciones tópicas *in vitro* contra el VHS-1 de manera de brindar más información acerca del comportamiento de estas formulaciones en términos de toxicidad e inhibición viral.

Para analizar el método de análisis de actividad antiviral *in vitro* de formulaciones tópicas contra el VHS-1, fueron seleccionadas tres formas farmacéuticas semisólidas de uso tópico ampliamente utilizadas en tratamiento de afecciones de la piel: cremas, geles y pomadas. Estas bases tópicas presentan características fisicoquímicas distintas entre ellas, respecto a la rapidez de la absorción o propiedades de hidratación o emoliencia, y cada una presentando ciertas ventajas y desventajas respecto a las demás⁽¹⁴⁾.

El método de evaluación de actividad antiviral *in vitro* de formulaciones tópicas contra el VHS-1 consistió en la realización de dos ensayos principales: El ensayo de citotoxicidad y el ensayo de actividad antiviral⁽¹²⁾. A través de estas se obtuvieron los resultados de CC₅₀ e IC₅₀, que permitieron calcular el IS como una medida de eficiencia y seguridad de estas formulaciones

Inicialmente, se buscó evaluar una posible influencia de las bases tópicas sobre el sistema (crema, gel, pomada), realizando los ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de los mismos, previa a la incorporación del de interés. Respecto a la citotoxicidad, en el

caso de la crema base, se observó una alta citotoxicidad en este estudio a todas las concentraciones utilizadas, aunque se han observado estudios *in vitro* hechos con bases de emulsiones con una baja citotoxicidad. Esto podría estar influenciado por la composición de la crema y sus componentes emulsificantes, pudiendo complementar estos estudios con la utilización de otros agentes tensoactivos como el tween 80 con bajas tasas de citotoxicidad reportadas⁽¹⁵⁾. Esto demuestra que nuestro sistema no es aplicable a todas las formulaciones y es dependiente del tipo y concentración de excipientes.

Tanto el gel base como la pomada base mostraron valores altos de CC₅₀ (>700 µg/mL). Estos resultados que coinciden con estudios previos donde se evaluaron la baja citotoxicidad de los componentes tanto de geles como de pomadas^(16,17). En cuanto a la actividad antiviral de las bases tópicas, cabe destacar que tanto para el gel y la pomada base, presentaron un fenómeno de inhibición viral a concentraciones igual o mayores a 200 µg/mL, pero cuya actividad descendía drásticamente a concentraciones menores a estas. Mishra et al estudiaron la actividad antiviral de un gel base para la incorporación de extractos naturales y encontraron una inhibición de la actividad de HSV-2 en un 5,88% a una concentración de 125 µg/mL, siendo ésta la concentración máxima de estudio. Sin embargo, no se han reportado otros estudios de actividad antiviral u de otro tipo de bases tópicas a concentraciones mayores, por lo que este proyecto aporta un dato importante todavía no descrito en el comportamiento de las bases tópicas en un modelo *in vitro*⁽¹⁸⁾.

El aciclovir es el fármaco de primera instancia utilizado para el tratamiento de las infecciones por VHS-1, siendo ampliamente utilizado por vía intravenosa, oral y tópica, con un comportamiento ampliamente descrito^(4,19). Esto llevó a la incorporación de este activo de manera a utilizarlo como referencia para el sistema en estudio, de manera a poder verificar los resultados con estudios previos realizados con el mismo. Primeramente, se realizó el ensayo de citotoxicidad de las formulaciones de gel y pomada de aciclovir al 5%, obteniendo valores de CC₅₀ de 582,4 µg/mL y 495 µg/mL respectivamente, siendo valores menores a los CC₅₀ de sus respectivas bases, pudiendo observarse un efecto del aciclovir en la citotoxicidad. En el ensayo de actividad antiviral de estas formulaciones, se obtuvieron valores de IC₅₀ de <1,25 µg/mL para el gel de aciclovir al 5% y 3,6 µg/mL para la pomada base. Estos valores son comparables con estudios previos de actividad antiviral *in vitro* utilizando células Vero, que van desde 0,03 a 5,32 µg/mL⁽²⁰⁻²²⁾. En cuanto a los índices de selectividad, se obtuvieron valores de >465,92 y 137,5 para el Gel y la Pomada respectivamente. Estos valores son los esperados para este activo debido a la baja citotoxicidad y la buena actividad antiviral presentada de este activo, destacando la eficiencia del método implementado para la medición de seguridad y eficacia de formulaciones antivirales.

En conclusión, se logró establecer y evaluar un método que permitió determinar la eficacia *in vitro* de formulaciones contra el VHS-1. Con base en los resultados, la combinación de la determinación de citotoxicidad con la evaluación de la actividad antiviral mediante cuantificación del genoma viral por qPCR representa un modelo adecuado para el análisis de formulaciones tópicas con principios activos de interés, especialmente en bases hidrofílicas como geles y bases hidrofóbicas como pomadas. Este enfoque también podría aplicarse a formulaciones que incluyan otros activos relevantes, aportando información preliminar valiosa sobre seguridad, eficacia y la influencia de las bases utilizadas, lo cual puede complementar y simplificar etapas posteriores en estudios preclínicos en animales o seres humanos.

Declaración de los autores: Los autores aprueban la versión final del artículo.

Declaración de conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Contribución de los autores:

Conceptualización: Pablo Hernán Sotelo Torres, Maria Paz Cáceres Villalba, Gladys Mabel Maidana

Curación de datos: María Paz Cáceres Villalba

Análisis formal: Pablo Hernán Sotelo Torres, Maria Paz Cáceres Villalba

Investigación: María Paz Cáceres Villalba

Metodología: Pablo Hernán Sotelo Torres, Maria Paz Cáceres Villalba

Redacción – borrador original: María Paz Cáceres Villalba

Redacción – revisión y edición: Pablo Hernán Sotelo Torres, Maria Paz Cáceres Villalba, Gladys Mabel Maidana

Financiamiento: El proyecto ha sido cofinanciado por CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) a través del programa PROCIENCIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Petti S, Lodi G. The controversial natural history of oral herpes simplex virus type 1 infection. *Oral Dis.* 2019;25(8):1850–65. <https://doi.org/10.1111/odi.13234>
- Mustafa M, Illzam E, Muniandy R, Sharifah A, Nang M, Ramesh B. Herpes simplex virus infections, Pathophysiology and Management. *IOSR J Dent Med Sci.* 2016;15(07):85–91: <https://doi.org/10.9790/0853-150738591>
- James C, Harfouche M, Welton NJ, Turner KME, Abu-Raddad LJ, Gottlieb SL, et al. Herpes simplex virus: Global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ.* 2020;98(5):315–29. <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.19.237149>
- Klysik K, Pietraszek A, Karewicz A, Nowakowska M. Acyclovir in the treatment of herpes viruses—a review. *Curr Med Chem.* 2020;27(24):4118–37. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867325666180309105519>
- Stahl JP, Mailles A. Herpes simplex virus encephalitis update. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(3):239–43. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000554>
- Morales-Alvarez MC. Nephrotoxicity of Antimicrobials and Antibiotics. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2020;27(1):31–7. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2019.08.001>
- Richelsen RKB, Jensen SB, Nielsen H. Incidence and predictors of intravenous acyclovir-induced nephrotoxicity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(10):1965–71. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3332-5>
- Burrell S, Topalis D, Boutolleau D. Herpes simplex virus resistance to antivirals. *Virologie.* 2020;24(5):325–42. <https://doi.org/10.1684/vir.2020.0864>
- Langhans SA. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front Pharmacol.* 2018;9(JAN):1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>
- Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: Larramendy ML, Soloneski S, editors. *Genotoxicity.* Rijeka: IntechOpen; 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
- Singh S, Khanna VK, Pant AB. Development of In Vitro Toxicology: A Historic Story. *In Vitro Toxicol.* 2018;1–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804667-8.00001-8>
- Cantero-González G, Alvarenga N, Florentín-Pavía MM, Gonzalez-Maldonado P, Sotelo PH. Antiviral activity of two *Acanthospermum* species against herpes simplex virus 1. *J Ethnopharmacol.* 2023;303(December 2022):115958. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2022.115958>
- Gabaglio S, Alvarenga N, Cantero-González G, Degen R, Ferro EA, Langjahr P, et al. A quantitative PCR assay for antiviral activity screening of medicinal plants against Herpes simplex 1. *Nat Prod Res.* 2019;35(17):2926–2930. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1675064>
- Singh S, Dash AK, Agrawal S. *Semisolid Dosage Forms.* Pharm Basic Princ Appl to Pharm Pract Second Ed. 2024;341–91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99796-6.00019-9>
- Roacho-Pérez JA, Ruiz-Hernandez FG, Chapa-Gonzalez C, Martínez-Rodríguez HG, Flores-Urquiza IA, Pedroza-Montoya FE, et al. Magnetite nanoparticles coated

- with PEG 3350-Tween 80: In vitro characterization using primary cell cultures. *Polymers (Basel)*. 2020;12(2). <https://doi.org/10.3390/polym12020300>
16. Müller G, Kramer A. Comparative study of in vitro cytotoxicity of povidone-iodine in solution, in ointment or in a liposomal formulation (Repithel®) and selected antiseptics. *Dermatology*. 2006;212(SUPPL.1):91–3. <https://doi.org/10.1159/000090102>
17. Suhail M, Liu JY, Hung MC, Chiu IH, Minhas MU, Wu PC. Preparation, In Vitro Characterization, and Cytotoxicity Evaluation of Polymeric pH-Responsive Hydrogels for Controlled Drug Release. *Pharmaceutics*. 2022;14(9). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091864>
18. Mishra NN, Kesharwani A, Agarwal A, Polachira SK, Nair R, Gupta SK. Herbal gel formulation developed for anti-human immunodeficiency virus (HIV)-1 activity also inhibits in vitro HSV-2 infection. *Viruses*. 2018;10(11):1–18. <https://doi.org/10.3390/v10110580>
19. Salvaggio MR, Gnann JW. *Drugs for Herpesvirus Infections*. Fourth Edition. Infectious Diseases. Elsevier Ltd; 2017;2:1309–1317.e1. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00153-2>
20. Collins P. The spectrum of antiviral activities of acyclovir in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother*. 1983;12(SUPPL. B):19–27. https://doi.org/10.1093/jac/12.suppl_b.19
21. Lipipun V, Sasivimolphan P, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Ritthidej G, et al. Topical cream-based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res*. 2011;91(2):154–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.05.013>
22. Neyts J, Andrei G, De Clercq E. The novel immunosuppressive agent mycophenolate mofetil markedly potentiates the antiherpesvirus activities of acyclovir, ganciclovir, and penciclovir in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(2):216–22. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.2.216>