



**Evaluación de la viabilidad celular del ácido gálico sobre fibroblastos del ligamento
periodontal. Estudio *in vitro***

Valentina Garibello Cubillos

10571727330

Sergio Luis Rodríguez Moreno

10571729995

Ana Cristina Romero Rodríguez

10571725427

Juan Sebastián Villamarín Márquez

10571728175

Universidad Antonio Nariño

Programa Odontología General

Facultad de Odontología

Bogotá D.C, Colombia

2022

**Evaluación de la viabilidad celular del ácido gálico sobre fibroblastos del ligamento
periodontal. Estudio *in vitro***

Valentina Garibello Cubillos

Sergio Luis Rodríguez Moreno

Ana Cristina Romero Rodríguez

Juan Sebastián Villamarín Márquez

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Odontólogo

Director (a)

Hernán Santiago Garzón Vergara

Mg. en Bioingeniería y especialista en Periodoncia

Yeily Isabel Thomas Alvarado

Mg. Salud Pública y desarrollo social y especialista en epidemiología

Línea de Investigación en Ingeniería Tisular

Grupo de Investigación en Salud Oral

Universidad Antonio Nariño

Programa Odontología

Facultad de odontología

Bogotá D.C, Colombia

2022

Nota de Aceptación

El trabajo de grado titulado “Evaluación de la citotoxicidad del ácido gálico en fibroblastos del ligamento periodontal. Estudio *in vitro*”, elaborado por: Valentina Garibello Cubillos, Sergio Luis Rodríguez Moreno, Ana Cristina Romero Rodríguez y Juan Sebastián Villamarín Márquez, ha sido aprobado como requisito parcial para optar al título de Odontólogo General.

Firma del Tutor

Firma del Tutor

Firma Jurado

Firma Jurado

Bogotá, Mayo de 2022

Contenido

Resumen.....	11
Abstract.....	12
Introducción	13
1 Planteamiento del problema.....	15
1.1 Pregunta de investigación	17
2 Objetivos	18
2.1 General	18
2.2 Específicos	18
3 Justificación	19
4 Marco Teórico.....	21
4.1 Flavonoides	21
<i>4.1.1 Definición</i>	21
<i>4.1.2 Características</i>	22
<i>4.1.3 Propiedades</i>	22
4.2 Ácido Gálico	23
<i>4.2.1 Definición</i>	23
<i>4.2.2 Composición y propiedades químicas</i>	23
<i>4.2.3 Funciones y usos</i>	25
4.3 Fibroblastos Periodontales	25
<i>4.3.1. Definición</i>	25
<i>4.3.2. Poblaciones y especies</i>	27
<i>4.3.3 Estructura del fibroblasto</i>	27
<i>4.3.4 Funciones de los fibroblastos gingivales</i>	27
4.4 Citometría de Flujo	28
4.5 Antecedentes de investigación	29
<i>4.5.1 Concentraciones y viabilidad celular</i>	29
5. Diseño Metodologico.....	33

5.1 Tipo de estudio	33
5.2 Población	33
5.3 Operalización de las variables	33
5.4 Procedimiento	34
5.4.1 Descripción del procedimiento:	34
5.4.2 Paso a paso (ejecución del procedimiento):	34
5.5. Análisis de los datos	36
5.6 Aspectos Éticos de la Investigación	36
6. Resultados y Análisis de Resultados	38
6.1 Descripción de la muestra	38
6.2 Control positivo y negativo	38
6.2.1. Control negativo con Peróxido de Hidrógeno	38
6.2.2 Control positivo con Dimetil Sulfoxido (DMSO)	39
6.3 Viabilidad celular en ácido gálico	39
6.3.1 Aplicación de ácido gálico con tiempo de exposición de 12 horas	39
6.3.2 Aplicación de ácido gálico con tiempo de exposición de 24 horas	41
6.3.3 Aplicación de ácido gálico con tiempo de exposición de 48 horas	42
7 Discusión	45
8 Conclusiones	49
9 Recomendaciones	50
Referencias Bibliográficas	51

Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de los flavonoides y subfamilias.

Figura 2. Estructura química de flavona y flavonol.

Figura 3. Estructura química básica del ácido gálico y sus metabolitos.

Figura 4. Viabilidad celular en fibroblastos periodontales al aplicar ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μ M durante 12 horas

Figura 5. Viabilidad celular en fibroblastos periodontales al aplicar ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μ M durante 24 horas.

Figura 6. Viabilidad celular en fibroblastos periodontales al aplicar ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μ M durante 48 horas

Lista de tablas

Tabla 1. Esquema ensayo de citotoxicidad

Tabla 2. Viabilidad celular en fibroblastos periodontales al aplicar peróxido de hidrógeno como control de muerte celular

Tabla 3. Viabilidad celular en fibroblastos periodontales al aplicar Dimetil sulfóxido y promedio por tiempos de exposición

Tabla 4. Resultado de ensayo por triplicado durante 12 horas, aplicando ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μM y promedio por concentración.

Tabla 5. Resultado de ensayo por triplicado durante 24 horas, aplicando ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μM y promedio por concentración.

Tabla 6. Resultado de ensayo por triplicado durante 48 horas, aplicando ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μM y promedio por concentración.

Lista de símbolos y abreviaturas

μM Micromolar

μL Microlitos

YP Yoduro de Propidio

H₂O₂ Peróxido de Hidrógeno

DMSO Dimetil sulfóxido

AG Ácido Gálico

NF-κB Factor Nuclear Kappa B

AP1 Proteína Activadora 1

(Dedicatoria)

A Dios por las bendiciones recibidas a lo largo de nuestro proceso académico y personal de la vida. A nuestros padres por el esfuerzo, el trabajo arduo y el apoyo incondicional otorgado para lograr culminar todos nuestros proyectos y metas en la vida.

Agradecimientos

Agradecimientos en primera instancia a Dios por guiarnos por la senda correcta hacia el éxito, por la sabiduría, la fortaleza y demás bienaventuranzas otorgadas en el transcurso de nuestro proyecto de vida. A nuestros padres por el esfuerzo mancomunado, el amor y el apoyo incondicional que nos han brindado, con el objetivo de vernos triunfar en la vida y lograr nuestras metas.

A nuestros mentores Dr. Santiago Garzón y Dra. Yeily Thomas por la dedicación y el trabajo que realizaron durante el desarrollo de esta investigación, y por seguir transmitiendo de generación en generación sus conocimientos y experiencia para formar excelentes profesionales en pro del desarrollo de la sociedad.

Resumen

El ácido gálico, o ácido 3,4,5 trihidroxibenzoico, es un compuesto polifenolico de origen natural empleado para el tratamiento de enfermedades sistémicas, incluidas las inflamatorias, pero con la probabilidad de generar citotoxicidad en microorganismos no patógenos al ser administrado en altas concentraciones. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto citotóxico del ácido gálico en fibroblastos del ligamento periodontal. Se realizó un estudio experimental *in vitro*, empleando concentraciones de ácido gálico de 1, 5, 10 y 20 μ M, con unos tiempos de exposición de 12, 24 y 48 horas, implementando la técnica de citometría de flujo con yoduro de propidio y realizando controles positivo y negativo de muerte celular con peróxido de hidrógeno y DMSO. El control negativo de muerte celular tuvo un promedio de 95,47% a las 12 horas y 93,83% a las 48 horas. Se efectúan ensayos por triplicado en cada tiempo de exposición y concentración del ácido gálico, donde la viabilidad celular permaneció en un intervalo del 90-98,4%, con un comportamiento proporcional al incrementar la concentración. En conclusión, el ácido gálico tuvo un mínimo efecto citotóxico en los fibroblastos del ligamento periodontal, abriendo la puerta para su uso en la terapéutica periodontal.

Palabras clave: Ácido gálico, Fibroblastos, citotoxicidad.

Abstract

Gallic acid, or 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, is a naturally derived polyphenolic compound used for the treatment of systemic diseases, including inflammatory diseases, but with the probability of generating cytotoxicity in non-pathogenic microorganisms when administered in high concentrations. The aim of the present investigation was to evaluate the cytotoxic effect of gallic acid on periodontal ligament fibroblasts. An experimental in vitro study was carried out using gallic acid concentrations of 1, 5, 10 and 20 μ M, with exposure times of 12, 24 and 48 hours, implementing the flow cytometry technique with propidium iodide and performing positive and negative controls of cell death with hydrogen peroxide and DMSO. The negative cell death control averaged 95.47% at 12 hours and 93.83% at 48 hours. Triplicate assays were performed at each exposure time and concentration of gallic acid, where cell viability remained in a range of 90-98.4%, with a proportional behavior with increasing concentration. In conclusion, gallic acid had a few cytotoxic effect on periodontal ligament fibroblasts, opening the door for its use in periodontal therapeutics.

Key words: Gallic acid, Fibroblasts, cytotoxicity.

Introducción

Los recientes avances científicos en materia de salud oral sugieren el uso y desarrollo de compuestos químicos que permitan generar un impacto positivo en el tratamiento de patologías asociadas a procesos inflamatorios. Dada la novedad hoy en día del uso de elementos de origen natural, marcan el inicio de una ideología ambiental y menos riesgosa de intervenir de manera más eficaz en patologías como la enfermedad periodontal, caries dental y otras de gran importancia, sin generar daño alguno en microorganismos no patógenos o del microbiota normal.

Dentro de la amplia gama de compuestos con propiedades prometedoras, y sintetizados a partir de plantas y demás material orgánico aprovechable, se puede hacer alusión al ácido gálico, un agregado con una compleja estructura de anillos bencénicos y ácido carboxílico y con una apariencia física cristalina. Descubierta en el año 1786 empleada desde entonces en la industria alimentaria, cosmética y principalmente en la industria farmacéutica para la elaboración de productos medicinales. (Fernandes & Salgado, 2016)

Dado lo anterior, el ácido gálico, un polifenol de amplio espectro perteneciente a la familia de los flavonoides, se ha convertido en una opción muy factible para el tratamiento de enfermedades sistémicas relacionadas con procesos bacterianos y virales, oncológicos, cardiovasculares, metabólicos e inflamatorios, como por ejemplo afecciones inducidas por *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, cáncer, diabetes e hipertensión. (Lima et al., 2016)

Si se toma en cuenta la acción del ácido gálico en microorganismos patógenos y no patógenos, se puede hacer referencia a la citotoxicidad que puede generar al aplicarlo en determinadas colonias. Este evento adverso a nivel celular, y como es el caso de esta investigación, permite ser estudiado mediante la citometría de flujo con yoduro de propidio, un método de laboratorio con medidas multiparamétricas, una amplia sensibilidad, objetividad y

rapidez analítica, que permite determinar la cantidad de células vivas de manera porcentual, y en cierta manera sus características morfológicas por la tinción que se realiza. (Parra, 1997)

Estudios similares sobre la citotoxicidad del ácido gálico se han realizado en colonias celulares provenientes de tejido intestinal, pulmonar y asociado a cicatrices hipertróficas, cuyos resultados evidencian que, al aplicar este compuesto en concentraciones moderadas o bajas, no genera un efecto indeseado sobre las colonias celulares, pero, al aplicarlo en concentraciones promedio de 40 μM a 100 μM , da paso a procesos de apoptosis celular y, por consiguiente, a una disminución significativa de la viabilidad celular de estos microorganismos de la microbiota normal.

En consecuencia, la presente investigación marca una pauta y el inicio de un análisis riguroso sobre la posible aplicación del ácido gálico en diferentes productos de la terapéutica periodontal, dando parámetros sobre la posible afección de éste compuesto, no solo a microorganismos patógenos, sino también a células que se encuentran comúnmente en los tejidos de soporte dental, principalmente el ligamento periodontal, tales como los fibroblastos periodontales.

1 Planteamiento del problema

Los flavonoides son compuestos polifenólicos derivados de las plantas, caracterizados por ser metabolitos secundarios de bajo peso molecular transportados de esta forma a diversas ubicaciones extracelulares o intracelulares. Los polifenoles naturales presentan innumerables actividades biológicas, siendo destacadas su función antimicrobiana, antiinflamatoria e inmunomoduladora. Debido a que los flavonoides no son sintetizados en primera instancia en el cuerpo humano, es necesario su consumo ya sea mediante la ingesta de frutas, verduras, nueces, semillas, o administrado en forma de compuesto químico procesado (Fernández et al., 2018).

Algunos estudios han indicado que los flavonoides son eficientes para el abordaje clínico de enfermedades agudas o crónicas de tipo inflamatorio, cancerígeno, infeccioso, tales como diabetes mellitus, endocarditis infecciosa, periodontitis y en otros casos funciona como antioxidante. Se ha demostrado que su acción sobre células orales como los fibroblastos gingivales y células epiteliales redundan en su estimulación y activación mediando posibles procesos antiinflamatorios y por otro lado, genera alteraciones en algunos microorganismos, como por ejemplo determinadas especies de *Streptococcus mutans* y *S. salivarius* (Fernández et al., 2018).

Dentro de la amplia gama de polifenoles uno de los más destacados es el ácido gálico, ya que ha demostrado su acción inhibitoria en la proliferación de microorganismos patógenos, por ejemplo, *Streptococcus sobrinus*, *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros, y disminuye la posibilidad de aparición de enfermedades agudas o crónicas, tales como: hepatotoxicidad, dislipidemia, endocarditis bacteriana, e incluso solo o en combinación ha demostrado reducir la liberación de radicales libres. El ácido gálico se encuentra fácilmente en plantas, tales como gayuba (*Arctostaphylos*), mora, *Caesalpinia Mimosoideae*, así como en nueces, zumaque,

hamamelis, berros, corteza de roble, hojas de té, nueces de areca, entre otros. (AL Zahrani et al., 2020).

El ácido gálico, un polifenol reconocido por su abundancia en el reino vegetal y su aplicabilidad en la industria alimentaria y la medicina, ha sido objeto de estudios *in vivo* e *in vitro* por parte de la comunidad científica, debido a que ha presentado en las últimas investigaciones propiedades que, de una u otra forma, han permitido abordar de manera eficaz alteraciones sistémicas, tales como enfermedades relacionadas con procesos oncológicos y del metabolismo. Su efecto antioxidante, gastroprotector, neuroprotector, y no menos su propiedad antiinflamatoria, lo posicionan como un compuesto estrella capaz de inhibir la funcionabilidad de mediadores celulares, como por ejemplo, las prostaglandinas, interleucinas y el factor de crecimiento tumoral TNF- α (Kahkeshani et al., 2019).

Con respecto a su toxicidad, diversas investigaciones han mostrado que el ácido gálico a pesar de ser catalogado como un compuesto de origen natural empleado con fines clínicos, puede generar una respuesta no correspondiente al objetivo terapéutico, en algunos sitios, microorganismos o complejos celulares presentes en el individuo donde es aplicado, como cualquier biomaterial. Han observado que la citotoxicidad del ácido gálico varía dependiendo de la concentración a ser administrada. Haute et al. encontraron que una concentración de 1000 μM de ácido gálico no generó algún efecto sobre la viabilidad celular de los neutrófilos. Por otro lado, Truzzi y cols. demostraron que concentraciones de 235,13 μM producía una citotoxicidad significativa en tres líneas celulares diferentes e ilustraron que el ácido gálico, a una concentración de 117,57 μM era citotóxico en un modelo intestinal con presencia de capas mucosas, fibroblastos intestinales y monocitos. Finalmente, Jinrong Bai et al, en el año 2021, indicaron en su investigación que el suministro de ácido gálico en bajas concentraciones es

seguro y eficaz para un número significativo de células, pero, en concentraciones relativamente altas ejercían un efecto negativo en las mismas (Bai et al., 2021).

Los fibroblastos son células polimórficas con un gran potencial tanto clínico como investigativo. Estas células son las principales del ligamento periodontal, el cual rodea la porción radicular del diente, y es el encargado de producir y mantener la inserción del tejido conectivo que provee anclaje firme del diente dentro del alvéolo, siendo así uno de los tejidos más afectados con secuelas dejadas por la enfermedad periodontal (Acosta, 2006).

Hasta ahora se han realizado estudios que permiten establecer posibles alteraciones o efectos citotóxicos en fibroblastos, no propios del ligamento periodontal, al ser expuestos al ácido gálico en elevadas concentraciones. Los resultados son prometedores en estos tipos celulares. Sin embargo, en fibroblastos derivados de ligamento periodontal no ha sido estudiado. Teniendo en cuenta el potencial terapéutico de este medicamento, vale la pena estudiar la citotoxicidad relacionada con esta línea celular, con posibilidades terapéuticas para enfermedad gingival o periodontal.

1.1 Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto del ácido gálico en la viabilidad celular de los fibroblastos del ligamento periodontal, al ser estimulados, en diferentes concentraciones y tiempos?

2 Objetivos

2.1 General

Evaluar la viabilidad celular del ácido gálico sobre fibroblastos gingivales ATCC CRL-2014 mediante citometría de flujo con yoduro de propidio *in vitro*.

2.2 Específicos

Determinar si las concentraciones y tiempos de ácido gálico generan viabilidad en los fibroblastos gingivales ATCC CRL-2014.

3 Justificación

Esta investigación se enmarca en la línea de Ingeniería tisular, del grupo de investigación en Salud Oral de la Facultad de Odontología, que busca hacer énfasis en todos los eventos microbiológicos y/o bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos que integra el complejo dento-maxilo-facial, mediante el uso de nuevas tecnologías e ideas innovadoras, así como su implementación a largo plazo y su aporte significativo a los avances médico-científicos del momento.

A lo largo de la historia, el hombre ha generado a partir de su capacidad cognoscitiva diferentes alternativas medicinales que, teniendo en cuenta sus fines terapéuticos, han permitido contrarrestar un sin fin de alteraciones que afectan de una forma objetiva la función fisiológica del ser humano (AL Zahrani et al., 2020).

Con el pasar del tiempo, éstas alternativas han venido evolucionando de una manera exponencial, adaptándose a las circunstancias de los posibles sucesos epidemiológicos y cambios en los procesos infecciosos de los microorganismos patógenos; pero, dicha adaptación ha estado acompañada de alteraciones en la actividad farmacocinética de estos compuestos con fines medicinales (Fernández et al., 2018).

Debido a lo anterior, surge la necesidad de hacer un abordaje, por medio de la aplicación de métodos experimentales, acerca de la posible aparición de efectos adversos a partir del consumo de compuestos de origen natural, en este caso, la administración del ácido gálico y su posible inferencia en la función normal de los fibroblastos periodontales. Es importante resaltar que, esta idea de investigación hace un aporte significativo debido a que, a pesar de que la variable y/o compuesto de interés es sintetizado a partir de productos naturales, se ha aplicado para el tratamiento oportuno de un grupo significativo de afecciones sistémicas y ha generado

citotoxicidad en un número determinado de células y en concentraciones elevadas, la ausencia de información con relación a los fibroblastos periodontales genera una motivación a profundizar en éste aspecto y a dar un fundamento científico con base a estudios experimentales con el ácido gálico y éstas células de interés, para un futuro uso terapéutico periodontal. (Bai et al., 2021).

4 Marco Teórico

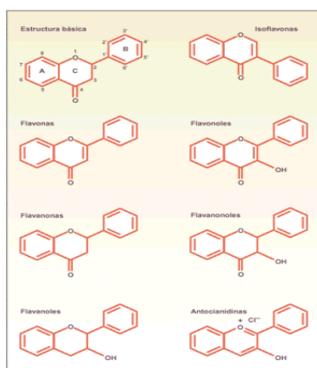
4.1 Flavonoides

4.1.1 Definición

Existe un proceso paralelo durante la sucesión de la fotosíntesis en las plantas, donde allí se producen compuestos llamados metabolitos secundarios o también conocidos como: flavonoides, taninos, líganos, cumarinas, alcaloides, terpenos y saponinas entre otros. Estos metabolitos secundarios tal vez no son tan esenciales en función nutricional, pero si importantes en función de supervivencia, ya que estos ayudan a las plantas a protegerse de factores externos. (Carlos et al., 2012)

Principalmente los flavonoides se encuentran en plantas superiores y algunas veces en hongos, helechos y también en la dieta alimenticia humana como en: té verde, té negro, frutas y vinos. Los flavonoides presentes en verduras producen un efecto bactericida y virucida. Es de importancia mencionar que los flavonoides no están presentes en bacterias y algas (Osmany et al., 2015).

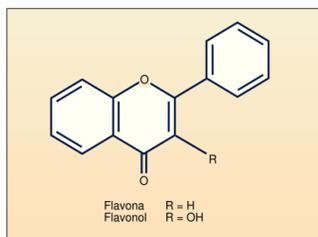
Figura 1.
Estructura química de los flavonoides y subfamilias.



Fuente: Álvarez et al., 2003.

Básicamente los flavonoides se clasifican a partir de su estructura bioquímica, teniendo en cuenta el grado de oxidación y saturación de la estructura del anillo C en el heterocíclico; con base en esto, se determinan principales clases de flavonoides tales como: flavanoles, flavanonas, flavanonol, entre otros (Álvarez et al., 2003).

Figura 2
Estructura química
de flavona y flavonol.



Fuente: López Luengo (2002).

4.1.2 Características

Los flavonoides se destacan por ser compuestos polifenólicos con bajo peso molecular, una estructura molecular del tipo C6 -C3 - C6, más dos anillos bencénicos unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos y ciclada a través de un oxígeno, y se sintetizan principalmente a partir de las plantas (López Luengo, 2002). Los flavonoides se transportan a ubicaciones subcelulares y

extracelulares de la planta, y se localiza en la pared o el citoplasma en forma de agliconas; debido a que los flavonoides no se sintetizan en el cuerpo, se pueden obtener a través del consumo de vegetales, frutas, semillas, tallos, entre otros compuestos orgánicos (Fernández et al., 2018).

4.1.3 Propiedades

Los flavonoides son compuestos con un gran potencial terapéutico, definidas por algunas propiedades demostradas:

Propiedades antioxidantes: tienen la capacidad de retrasar la oxidación dependiendo de su configuración, debido a la captación de reactivos de oxígeno y nitrógeno (Jiménez et al., 2009)

Propiedades antiinflamatorias: los flavonoides se derivan de actividades antioxidantes, las cuales han proporcionado información de inhibición de factores de transcripción, tales como el NF-kB y la AP1, así como la activación del factor nuclear 2 relacionado con el factor eritroide 2 (Pérez Trueba, 2003).

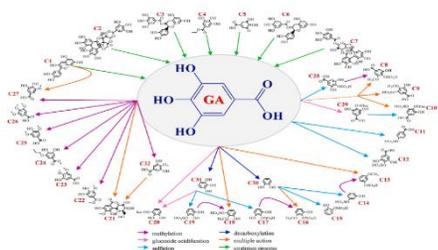
Propiedades anticancerígenas: los flavonoides han demostrado que inhiben la isoenzimas P450 responsable de la producción de carcinógenos y modulan el metabolismo de los mismos (Fernández et al, 2018).

Propiedades antibacterianas: la quercetina y apigenea son agentes antibacterianos que actúan en la lisis o apoptosis de diversos entes patógenos, además, se han utilizado como una opción alternativa para terapias antibacterianas por su capacidad de impedir la síntesis de ácidos nucleicos y de la membrana citoplasmática (Fernández et al. 2018).

4.2 Ácido Gálico

Figura 3.

Estructura química básica del ácido gálico y sus metabolitos.



Fuente: Bai et al. (2021).

4.2.1 Definición

El ácido gálico o ácido 3,4,5- trihidroxibenzoico, es un compuesto que fue identificado por el científico Carl Wilhelm Scheele en el año 1786 durante un estudio en plantas medicinales; desde ese entonces, se han realizado diversas investigaciones para identificar posibles

aplicaciones de este compuesto en diferentes campos de la ciencia y la industria alimentaria. Inicialmente, el ácido gálico fue empleado como quelante en la confección de pieles y cuero, como agente revelador de fotografías y, también, en la elaboración de medicamentos como el trimetopim y como conservante de alimentos, dada su amplia capacidad antimicrobiana y de captación de radicales libres (Fernandes & Salgado, 2016).

Según AL Zahani et al. (2020), realizaron una revisión de la literatura sobre el desarrollo reciente de los derivados del ácido gálico y sus híbridos a nivel bioquímico, donde se evidenció que los derivados galato y galoílo del ácido gálico son compuestos de origen natural y se incluyen entre muchos aditivos alimentarios y bebidas, por lo que la práctica común demuestra su seguridad y bioactividad.

4.2.2 Composición y propiedades químicas

Dadas sus propiedades como fenol y ácido carboxílico, el ácido gálico se caracteriza por ser un ácido orgánico con presencia de un anillo bencénico en su estructura. Dependiendo de su

pureza, varía su apariencia física: el ácido gálico puro presenta una apariencia totalmente cristalina, o incluso se presenta en polvos con forma de agujas de color, que varían desde el blanco hasta el marrón claro, y con puntos de fusión de 235 a 240 °C (Bai et al., 2021).

La consistencia sólida granular y su tonalidad blanca-amarillenta, hacen que el ácido gálico sea un elemento soluble en agua o en solventes como el DMSO (Dimetil Sulfóxido), generando un pigmento de color azul al contacto con trazas de hierro. Esta combinación al ser sometida al calor, forma dióxido o monóxido de carbono, y emite una reacción incompatible al contacto con sales de plata, cloratos y permanganato (Alvarez et al. 2004).

Haciendo un paréntesis sobre el Dimetil Sulfóxido, la literatura reporta que este compuesto fue hallado inicialmente en el año 1953, y desde entonces se ha caracterizado por ser un solvente con excelentes propiedades, permitiéndole penetrar de manera satisfactoria en tejidos animales y vegetales. Ésta habilidad de penetración en tejidos sin generar afección alguna, según lo reportado por la literatura, podría estar vinculado a la formación de enlaces de hidrógeno y su asociación mediante estos con moléculas, proteínas, ácidos nucleicos, sustancias iónicas y otro tipo de compuestos que están correlacionados con tejidos de seres vivos (Alvarez et al. 2004).

El ácido gálico tiene su origen en una gran variedad de especies vegetales; varios estudios han determinado que el AG se sintetiza a partir de plantas medicinales tales como *Phyllanthus A.*, *Momordica C.*, *Achillea S.*, entre otros. Sin embargo, Jinrong Bai y Colaboradores determinan que la concentración de ácido gálico presente en estas plantas varía en un rango desde los 0,001 y los 135,08 mg/g, lo que evidencia la factibilidad de poder extraer este compuesto en grandes cantidades (Bai et al., 2021).

4.2.3 Funciones y usos

- Ha contribuido al mundo de la medicina en el tratamiento de patologías de base, destacándose aquellas ligadas a procesos oncológicos, tumorales e inflamatorios.
- Su propiedad antioxidante genera protección al hígado de alteraciones producidas por los radicales libres.
- Es un mediador en el tratamiento de la diabetes, promoviendo la producción de insulina en el páncreas.
- Su propiedad antiinflamatoria inhibe la producción de mediadores pro inflamatorios como las histaminas y las citoquinas.
- Tiene la capacidad de inhibir las partículas o mediadores de la producción de hongos, donde se destaca su acción contra *Cándida albicans*.
- Permite identificar la cantidad de fenoles de diferentes compuestos.

4.3 Fibroblastos Periodontales

4.3.1. Definición

Los fibroblastos son considerados células predominantes en los tejidos conectivos e importantes para el recambio celular, teniendo en disposición una heterogeneidad en el periodonto, destacándose la presencia de fibroblastos del ligamento periodontal y fibroblastos gingivales. El fibroblasto periodontal propiamente dicho es una célula principal presente en el tejido conectivo que produce inserción y anclaje del diente en el alveolo. Por otro lado, los fibroblastos gingivales constituyen el tejido conectivo que rodea la periferia de las piezas dentales (encía), produciendo y conservando los componentes extracelulares que mantienen la integridad del tejido periodontal (Ucero et al., 2016).

Dentro las funciones del fibroblasto periodontal se encuentran principalmente el producir, mantener y remodelar el ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Los fibroblastos del ligamento periodontal tienen dos funciones específicas que pueden ser mencionadas y es la producción de sustancias que funcionan como marcadores de identificación la célula, donde se encuentra la fosfatasa alcalina, factor inhibidor de reabsorción ósea, proteína no colágena 15k, colágeno 95%, bialvcan y la prostaglandina E2, complementada por la función de mantener integro el espacio del ligamento periodontal. En estudios previos se evidenció que los fibroblastos periodontales expresaban receptores relacionados con el mecanismo de contractilidad celular, movimientos dentales y reparación de tejidos periodontales (Gómez, 2006).

Se ha demostrado que los fibroblastos del ligamento periodontal presentan una serie de características comunes a las células mesenquimales indiferenciadas de la medula ósea. Entre su gran desempeño, los fibroblastos del ligamento periodontal sintetizan la matriz extracelular que constituyen la función de adhesión, el transporte y la mineralización de las células. Los fibroblastos son capaces de percibir señales mecánicas que contienen unas características fenotípicas de los osteoblastos, bajo estimulación por estrés. Por otra parte, los fibroblastos son osteogénicos, debido a que se puede derivar una formación de nuevas células gracias a las propiedades previamente dichas como lo son el adherirse, transportarse y mineralizar; se pueden diferenciarse en los osteoblastos (García Ballesta et al. 2003).

Los fibroblastos contribuyen en procesos como embriogénesis, organogénesis, homeostasis y remodelación de tejidos del ser humano. Los fibroblastos se pueden distinguir a partir de su origen embriológico o de origen mesénquimal, que son los fibroblastos de otro tejido

del cuerpo o de origen de cresta pleural que se le atribuyen a fibroblastos gingivales (Víctor & Antonio, 2019).

4.3.2. Poblaciones y especies

En la literatura se han descrito subpoblaciones a partir de los fibroblastos periodontales; según Roberts y Chamberlain, en el año 1989, se identificaron 4 clases de fibroblastos de ligamento periodontal pero, una clase en particular tenía pseudópodos, los cuales le atribuían capacidad de migración a las células de ligamento periodontal. En cuanto a las subpoblaciones de fibroblastos gingivales, Hakkinene y Larjava encontraron 3 morfotipos distintos en fibroblastos de tejido sano, donde las células presentaban formas de espiral, epiteliales y estrelladas (Gómez, 2006).

4.3.3 Estructura del fibroblasto

Principalmente los fibroblastos se caracterizan por tener un núcleo de gran tamaño, su citoplasma contiene gran cantidad de mitocondrias y vacuolas, y se caracteriza por tener aparato de Golgi y retículo endoplasmático pronunciado, dada su actividad metabólica (Víctor & Antonio, 2019).

El fibroblasto está compuesto por microfilamentos de actina que le sirven en función de movilidad y contracción celular. Bajo estudios de estos fibroblastos en microscopios apuntan a que estas células pocas veces se encuentran en unión, por el contrario, los fibroblastos tienden a ser apartados entre sí. Sin embargo, acompañados de matriz colágena y glicoproteínas

(Rodríguez Hinoshita, 2014).

4.3.4 Funciones de los fibroblastos gingivales

Los fibroblastos gingivales son células dinámicas que constituyen el tejido conjuntivo gingival, representando más del 50% de células que ejercen una función tisular local y a nivel

sistema inmune. Los fibroblastos gingivales son heterogéneos que presentan diferencias en su morfología dependiendo de su localización. El fibroblasto gingival constituye el tejido conectivo blando que rodea la periferia de las piezas dentales, es decir, lo que se conoce comúnmente como encía, produciendo y conservando los componentes que mantienen la integridad del tejido. Dentro de las funciones más importantes de los fibroblastos gingivales se encuentra la síntesis, remodelado, homeostasis y cicatrización del tejido gingival (Gómez, 2006).

4.3.4.1 Síntesis y remodelaje de células madre embrionaria gingival

Los fibroblastos gingivales producen glicoproteínas de estructura, fibronectina, vitronectina y otras proteínas, que son las encargadas en este proceso de unir las diferentes moléculas de las células madre embrionarias gingivales y las células que la integran, participando en adherencia tisular e hidratación celular (Víctor & Antonio, 2019).

4.4 Citometría de Flujo

De acuerdo con Stetler-Stevenson et al., la citometría de flujo se define como un método analítico que permite medir, de manera rápida y eficaz, determinadas características físicas y químicas de células o partículas que se encuentran inmersas en un líquido, generando señales individualizadas al incidir una fuente de luz. Esta técnica brinda información estadística de carácter cuantitativo sobre cada célula, e identifica posibles colonias de células distintas en una muestra específica, incluso cuando se presentan en pequeñas cantidades (Barrera Ramírez et al., 2004).

El fundamento científico de este método se sustenta en el traspaso de células estudio u otras partículas suspendidas y alineadas de manera individual a través de un haz luminoso, con el fin de recolectar información a partir de la luz emitida por fluoruros al contacto con el haz de luz; esta información es amplificada y procesada por un computador (Barrera Ramírez et al., 2004).

4.5 Antecedentes de investigación

En esta revisión, la importancia del ácido gálico, los derivados y los híbridos, son aspectos de gran relevancia que han permitido aumentar exponencialmente la comprensión y el descubrimiento de un producto natural bioactivo de este tipo. Se mostró que un gran número de derivados e híbridos del ácido gálico, desde el punto de vista farmacocinética, presentan un grado importante de viabilidad, lo que insta a los científicos a realizar más ensayos clínicos, con el objetivo de revelar el efecto mecanicista de estos materiales bioactivos en el tratamiento de diferentes enfermedades, y su aporte para el desarrollo y/o descubrimiento de nuevos fármacos (AL Zahrani et al., 2020).

Cabe destacar que, Francesca et al. (2020) realizaron un estudio *in vivo* en donde se evaluaron los efectos citotóxicos del ácido gálico y ferúlico en las células de la pared intestinal, y las concentraciones consumidas normalmente en la dieta, haciendo énfasis en el aloe vera y el jugo de arándano. Dado lo anterior, encontraron que los dos suplementos analizados, disponibles comercialmente, presentaban concentraciones de ácidos gálico y ferúlico significativamente más altas que las cantidades presentes en las respectivas fuentes de harina o frutas consecuentemente, los resultados sugieren la idea de que una alta ingestión de polifenoles, en concentraciones de 117,57 μM y 235,13 μM aproximadamente, podría inducir efectos negativos sobre la integridad de la pared intestinal, afectando específicamente capas mucosas, fibroblastos submucosos y monocitos.

4.5.1 Concentraciones y viabilidad celular

- Abnosi & Yari,(2018) realizaron un ensayo de viabilidad celular con células mesenquimales de la médula ósea, donde emplearon concentraciones de ácido gálico de 1.87, 3.75, 7.50, 15, 30, 60 y 120 μM y tiempos de incubación de 12, 24 y 36 horas. Como resultado

de la investigación encontraron que las células con AG durante 12 h provocaron una reducción significativa de la viabilidad celular al aplicar una concentración de 3,75 μM , en comparación con un grupo de control. Por otra parte, a las 24 y 36 h la reducción de la viabilidad celular comenzó significativamente desde 1.87 μM . La reducción de la viabilidad en todos los casos fue dependiente de la dosis.

- Wang et al. (2018) realizaron un ensayo CCK-8 con fibroblastos queloides, empleando concentraciones de 50, 100 y 200 μM . Como resultado encontraron que el ácido gálico inhibió la proliferación de los fibroblastos queloides, con una inhibición de dicha proliferación observada al aplicar una concentración de 50 y 100 μM . Sin embargo, el tratamiento con ácido gálico a una concentración de 200 μM , generó una citotoxicidad en los fibroblastos. Por lo tanto, ellos como investigadores emplearon 100 μM de AG como concentración óptima para aplicarlo en los experimentos posteriores.

- Yoon et al. (2018) realizaron un ensayo MTT con Sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS), de pacientes con artritis reumatoide, aplicando concentraciones de ácido gálico de 0, 1.1, 10, 50 y 100 μM . En los resultados se evidenció que no hubo una supresión significativa de la viabilidad celular al aplicar concentraciones de 0,1 y 1 μM de ácido gálico, en comparación con células de control tratadas con otro compuesto. Sin embargo, al aplicar ácido gálico en concentraciones de 10, 50 y 100 μM , se presencié una reducción significativa de la viabilidad celular de los sinoviocitos, en formas dependientes del tiempo y de la dosis. Por otra parte, el tratamiento con 10, 50 y 100 μM de ácido gálico disminuyó la supervivencia de las células en un 87%, 78% y 61% respectivamente, después de 24 h, y en un 85%, 78% y 48% del nivel de viabilidad del control después de 48 h, respectivamente.

- Abarikwu et al. (2020) realizaron un estudio *in vitro* con células HEK-293, empleando ácido gálico en concentraciones de 25,49, 147 y 294 μM . En los resultados evidenciaron que las concentraciones de 49 y 294 μM , aplicadas en las células objetivo, generaron citotoxicidad en las mismas, y la concentración de 49 μM disminuyó la viabilidad celular en aproximadamente un 50%. Por lo tanto, en los estudios posteriores se utilizaron las concentraciones de Ácido Gálico de 49 y 25 μM , las cuales no eran citotóxicas para las células.

- Lu et al. (2010), realizaron una investigación en células del glioma U87 y U251n, aplicando 150 μL de ácido gálico e incubando las células con éste compuesto durante 12, 24 y 36 horas. Los resultados indicaron que el ácido gálico disminuyó significativamente la proliferación de células de glioma y la formación de tubos en las células endoteliales del cerebro de ratón.

- Kang et al. (2018), realizaron una estudio con bacterias de la especie *Shigella Flexneri*, utilizando concentraciones de ácido gálico de 0.25, 0.5, 1, 2, 4,8 y 16 mg/mL. En el estudio se encontró que el ácido gálico tuvo un efecto inhibitor sobre la *Shigella Flexneri*, lo que redujo de manera significativa el número de bacterias viables al aplicar este ácido gálico en las diferentes concentraciones.

- Bhavesh et al., realizaron un estudio de toxicidad aguda y subaguda con dosis repetidas de 28 días de ácido gálico en ratones albinos, con el fin de comprobar el efecto citotóxico de este ácido sobre la estructura celular, y buscar una reacción favorable que se pueda implementar en el tratamiento de ciertas patologías, tales como la diabetes y la hiperlipidemia. Se utilizaron ratones albinos suizos machos y hembras de tres meses de edad, dividiendo el grupo de ratones albinos en 4 grupos de 10 animales, de 5 hembras y 5 machos cada uno, con pesos entre 25 y 30 kg y se manejaron dosis de 100, 300 y 900 mg/kg/día. El tratamiento se inició con 900 mg / kg de ácido gálico, que fue la dosis más alta de ácido gálico según las directrices. En el análisis de resultados

concluyeron que la ingestión de ácido gálico no tuvo ninguna reacción adversa o toxicidad aguda o subaguda en los animales objeto de estudio (Variya et al., 2019).

5. Diseño Metodológico

5.1 Tipo de estudio

Experimental o de Intervención (Estudio *In vitro*)

5.2 Población

Fibroblastos gingivales ATCC CRL-2014

5.3 Operalización de las variables

Relación de la variable	Nombre	Escala	Definición conceptual	Definición operativa
Independiente	Concentración	Cuantitativa continua	“cantidad de soluto disuelta en una cantidad dada de disolvente o de solución” (IBERO, 2014)	Concentraciones de 1,5,10 y 20 μM de ácido gálico, aplicadas en colonias de fibroblastos periodontales
Independiente	Tiempo	Cuantitativa continua	La dimensión del universo físico que, en un lugar determinado, ordena la secuencia de eventos. (“Diccionario McGraw-Hill de términos científicos y técnicos, 6a ed.”)	Tiempos de exposición de 12,24 y 48 horas
Dependiente	Citotoxicidad	Cualitativa nominal	Se usa con medicamentos y productos químicos para estudios experimentales en humanos y animales	Número de células viables posteriores a la exposición al medicamento.

5.4 Procedimiento

5.4.1 Descripción del procedimiento:

Para el ensayo de viabilidad celular se utilizó el protocolo de Riccardi y Nicoletti (2016). El yoduro de propidio (YP) es una molécula fluorescente que se une al ADN, pero no puede atravesar pasivamente las células que poseen una membrana plasmática intacta. La captación de YP se puede utilizar para discriminar las células muertas, en las que las membranas plasmáticas se vuelven permeables independientemente del mecanismo de muerte, de las células vivas con membranas intactas. El YP es excitado por longitudes de onda entre 400 y 600 nm y emite luz entre 600 y 700 nm, por lo que es compatible con láseres y fotodetectores disponibles en citómetros de flujo.

Tabla 1. Esquema ensayo de citotoxicidad

Modelo celular:	Fibroblastos del ligamento periodontal.	
Compuestos (1)	Ácido gálico	Control positivo de muerte celular (Peróxido de Hidrógeno) y control negativo de muerte celular (DMSO).
Concentraciones (3)	1,5,10, 20 μ M	
Tiempos de tratamiento	24,48,72 horas	
Número de veces	Ensayo por triplicado	

Tabla 1. Modelo experimental. Modelo experimental planteado de acuerdo con las variables a tener en cuenta.

5.4.2 Paso a paso (ejecución del procedimiento):

1. Se suspendieron las células de 1 a 2×10^6 en 1 ml de PBS en tubos de 12 x 75.
2. Se centrifugaron a 200g por 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se retiró el PBS.

Se sigue el método A para timocitos y células mononucleares no adherentes y el método B estándar para células multinucleares que crecen en suspensión y para células adherentes.

5.4.2.1 Método A: Método rápido (tinción directa de ADN en solución hipotónica de YP)

A. Se resuspendió suavemente el sedimento celular en 1 ml de solución de fluorocromo.

A tener en cuenta: Se resuspendieron las células con precaución para evitar la fragmentación del núcleo y la separación de cuerpos apoptóticos de núcleos apoptóticos, ya que el choque hipotónico elimina la mayor parte del ARN, no se requiere tratamiento con ARNasa.

B. Se colocaron los tubos en la oscuridad a 4°C, antes de la citometría de flujo durante al menos 1 hora y no más de 24 horas.

A tener en cuenta: Fue necesario una hora para la tinción adecuada de los núcleos: las células se pueden mantener durante 24 horas a oscuridad y a 4°C sin ningún cambio sustancial en el perfil de ADN.

5.4.2.2 Método B: Estándar (tinción con YP después de la fijación alcohólica).

A. Se resuspendió el sedimento celular en 500 ml de PBS.

B. Se fijaron las células agregando 4,5 ml de etanol frío al 70% (v/v) a la suspensión celular manteniendo los tubos en hielo.

A tener en cuenta: Las células se pueden almacenar en una solución de etanol a -20°C durante varias semanas.

C. Se centrifugaron a 400g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante (solución de etanol).

D. Se lavaron las células en 5 ml de PBS y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos.

A tener en cuenta: Las células con una degradación extensa del ADN se pueden resuspender directamente en una solución de tinción de ADN sin cualquier tratamiento posterior.

A tener en cuenta: Si el ADN no está muy degradado, resuspender las células en 0,5 ml de PBS y agregar 0,5 ml de buffer de extracción de ADN.

E. Se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos.

F. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de solución de tinción de ADN.

G. Se incubaron las células resuspendidas durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

1. Se analizaron las células por citometría de flujo. Se utilizó una línea láser de 488 nm para la excitación. Se midió la fluorescencia roja (>600 nm) y la dispersión. Se recolectaron al menos 20.000 eventos. Se retiraron los residuos y se midieron los picos de ADN hipodiploide y diploide.

5.5. Análisis de los datos

El análisis estadístico se realizó mediante tabulaciones en Excel y gráficos de líneas. Para cada concentración y los datos se expresaron como media \pm desviación estándar.

5.6 Aspectos Éticos de la Investigación

Según Resolución 8430 de 1993, que establece las normas éticas para los estudios de investigación, el artículo 11 define que esta investigación es de **riesgo mínimo** debido a que es una investigación donde se realiza la extracción de fibroblastos periodontales en una persona, sin ejecutar alguna acción que pueda causar daños irreversibles en dicho sujeto. A la vez, en el

presente estudio se emplean medicamentos de uso común, en indicaciones y dosis previamente establecidas. (Ministerio de Salud Nacional, 1993)

6. Resultados y Análisis de Resultados

6.1 Descripción de la muestra

Se emplearon colonias de Fibroblastos periodontales ATCC-CRL 2014 y se aplicaron concentraciones de ácido gálico de 1,5,10 y 20 μM a tiempos de 12,24 y 48 horas. Se realizaron ensayos por triplicado y controles positivo y negativo, con el fin de determinar la eficacia de la investigación.

6.2 Control positivo y negativo

Previo a realizar la aplicación de ácido gálico sobre los fibroblastos periodontales, se sometieron muestras de estas células a compuestos como el peróxido de hidrógeno y el Dimetil sulfóxido, como control de muerte celular y reacción de los fibroblastos al solvente, respectivamente.

6.2.1. Control positivo de muerte celular con Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

Tabla 2. Viabilidad celular en fibroblastos periodontales al aplicar peróxido de hidrógeno como control de muerte celular

COMPUESTO	ENSAYO	TIEMPO	VIABILIDAD
H2O2	A1	12 HORAS	11,5
		24 HORAS	19,5
		48 HORAS	17,5

Fuente: autoría propia

Se observa que, al aplicar el peróxido de hidrógeno como control de muerte celular en intervalos de tiempo de 12,24 y 48 horas, la muerte celular se da de manera significativa, con un valor promedio de viabilidad celular de $16,2 \pm 4,2\%$ y manteniéndose siempre por debajo del 20%. Lo anterior se da debido a que el peróxido de hidrógeno es altamente citotóxico al aplicarlo en células vitales.

6.2.2 Control negativo de muerte celular con Dimetil Sulfoxido (DMSO)

Tabla 3. Viabilidad celular en fibroblastos periodontales al aplicar Dimetil sulfóxido y promedio por tiempos de exposición

COMPUESTO	TIEMPO	ENSAYO	VIABILIDAD	PROMEDIO
DMSO	12 HORAS	B1	95,5	95,47
		B2	95,2	
		B3	95,7	
	24 HORAS	B1	95,5	96,20
		B2	95,9	
		B3	97,2	
	48 HORAS	B1	93,8	93,83
		B2	93,6	
		B3	94,1	

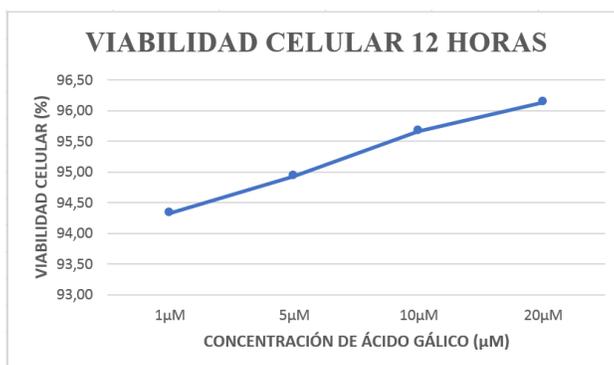
Fuente: autoría propia

En el momento de que se expone los fibroblastos periodontales al solvente de elección, que este caso fue el Dimetil Sulfoxido, la viabilidad celular se mantiene en un valor porcentual considerable en cada uno de los ensayos por triplicado, con porcentajes promedio de $95,47 \pm 0,25\%$ a las 12 horas, $96,2 \pm 0,89\%$ a las 24 horas y $93,83 \pm 0,25\%$ a las 48 horas. Esto conlleva a estimar que el Dimetil Sulfoxido afecta mínimamente la viabilidad de los fibroblastos periodontales al aplicarlo de manera directa.

6.3 Viabilidad celular en ácido gálico

6.3.1 Aplicación de ácido gálico con tiempo de exposición de 12 horas

Fig 4. Viabilidad celular en fibroblastos periodontales al aplicar ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μM durante 12 horas



Fuente: autoría propia

Durante un tiempo de exposición de 12 horas de los fibroblastos periodontales en concentraciones de 1,5,10 y 20 μM de ácido gálico, el crecimiento de la viabilidad celular fue exponencial al momento de aumentar las concentraciones, es decir, que, a mayor concentración, la cantidad de fibroblastos presentes en el medio celular fue mayor.

Tabla 4. Resultado de ensayo por triplicado durante 12 horas, aplicando ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μM y promedio por concentración.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	ENSAYO	VIABILIDAD	PROMEDIO
ACIDO GÁLICO	1 μM	X1	94,3	94,33
		X2	94,8	
		X3	93,9	
	5 μM	Y1	95,2	94,93
		Y2	93,3	
		Y3	96,3	
	10 μM	Z1	95,6	95,67
		Z2	95,9	
		Z3	95,5	
	20 μM	W1	95,9	96,13
		W2	95,7	
		W3	96,8	

Fuente: autoría propia

6.3.1.1 Viabilidad celular con 1 μM de ácido gálico

Al aplicar una concentración de 1 μM de ácido gálico en fibroblastos periodontales, durante un tiempo de 12 horas, se evidenció una viabilidad celular promedio de $94,33 \pm 0,45 \%$.

6.3.1.2 Viabilidad celular con 5 μM de ácido gálico

Al aplicar una concentración de 5 μM de ácido gálico en fibroblastos periodontales, durante un tiempo de 12 horas, se evidenció una viabilidad celular promedio de $94,93 \pm 1,52 \%$.

6.3.1.3 Viabilidad celular con 10 μM de ácido gálico

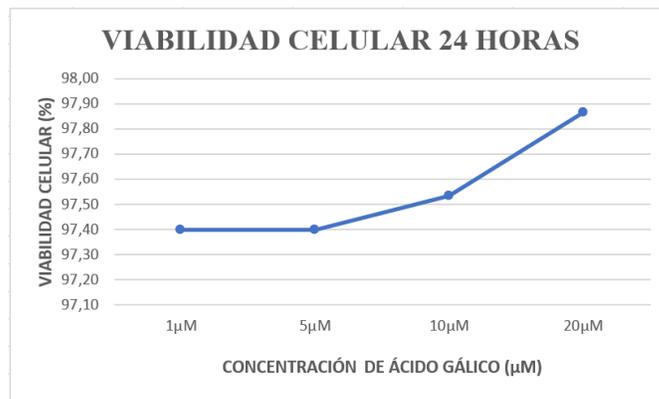
Se evidenció que, al aplicar en los fibroblastos periodontales una concentración de 10 μM de ácido gálico durante 12 horas, la viabilidad celular promedio fue de $95,67 \pm 0,21\%$.

6.3.1.4 Viabilidad celular con 20 μ M de ácido gálico

Se evidenció que, al aplicar en los fibroblastos periodontales una concentración de 20 μ M de ácido gálico durante 12 horas, la viabilidad celular promedio fue de $95,67 \pm 0,21\%$.

6.3.2 Aplicación de ácido gálico con tiempo de exposición de 24 horas

Fig 5. Viabilidad celular en fibroblastos periodontales al aplicar ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μ M durante 24 horas.



Fuente: autoría propia

A lo largo de la exposición de los fibroblastos periodontales en ácido gálico en concentraciones de 1,5,10,20 μ M, se evidenció inicialmente una viabilidad celular constante en concentraciones de 1 μ M y 5 μ M. Sin embargo, a medida que fue aumentando la concentración de ácido gálico, la viabilidad se comportó de manera proporcional, es decir, en una mayor concentración de ácido gálico, la presencia de fibroblastos presentes en el medio celular fue mayor.

Tabla 5. Resultado de ensayo por triplicado durante 24 horas, aplicando ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μM y promedio por concentración.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	ENSAYO	VIABILIDAD	PROMEDIO
ACIDO GÁLICO	1 μM	X1	97,3	97,40
		X2	97,4	
		X3	97,5	
	5 μM	Y1	97,1	97,40
		Y2	97,4	
		Y3	97,7	
	10 μM	Z1	96,8	97,53
		Z2	98,4	
		Z3	97,4	
	20 μM	W1	97,5	97,87
		W2	97,8	
		W3	98,3	

Fuente: autoría propia

6.3.2.1 Viabilidad celular con 1 μM de ácido gálico

Al aplicar una concentración de 1 μM de ácido gálico en fibroblastos periodontales, durante un tiempo de 24 horas, se evidenció una viabilidad celular promedio de 97.40 ± 0.1 .

6.3.2.2 Viabilidad celular con 5 μM de ácido gálico

Al aplicar una concentración de 5 μM de ácido gálico en fibroblastos periodontales, durante un tiempo de 24 horas, se evidenció una viabilidad celular promedio de 97.40 ± 0.3 .

6.3.2.3 Viabilidad celular con 10 μM de ácido gálico

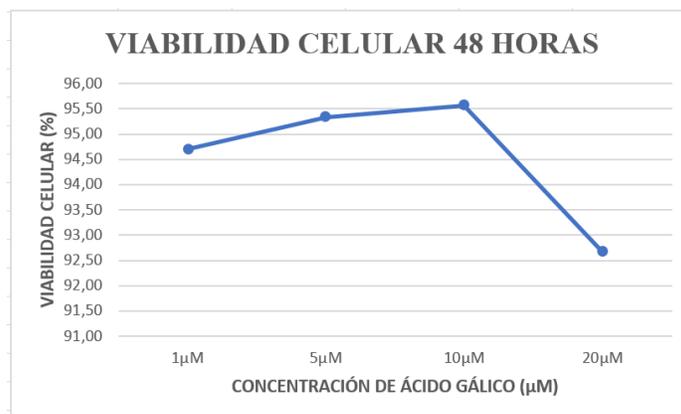
Al aplicar una concentración de 10 μM de ácido gálico en fibroblastos periodontales, durante un tiempo de 24 horas, se evidenció una viabilidad celular promedio de 97.53 ± 0.8

6.3.2.4 Viabilidad celular con 20 μM de ácido gálico

Al aplicar una concentración de 20 μM de ácido gálico en fibroblastos periodontales, durante un tiempo de 24 horas, se evidenció una viabilidad celular promedio de 97.87 ± 0.4 .

6.3.3 Aplicación de ácido gálico con tiempo de exposición de 48 horas

Fig 6. Viabilidad celular en fibroblastos periodontales al aplicar ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μM durante 48 horas.



Fuente: autoría propia

Durante un tiempo de exposición de 48 horas de los fibroblastos periodontales en concentraciones de 1,5 y 10 μM de ácido gálico, el crecimiento de la viabilidad celular fue exponencial, pero, al momento de aumentar la concentración a 20 μM , la viabilidad celular presenta una tendencia a la baja manteniéndose en un margen de 92-93%.

Tabla 6. Resultado de ensayo por triplicado durante 48 horas, aplicando ácido gálico en concentraciones de 1,5,10 y 20 μM y promedio por concentración.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	ENSAYO	VIABILIDAD	PROMEDIO
ACIDO GÁLICO	1 μM	X1	94,3	94,7
		X2	94,3	
		X3	95,5	
	5 μM	Y1	95,2	95,33
		Y2	95,7	
		Y3	95,1	
	10 μM	Z1	94,8	95,57
		Z2	96,1	
		Z3	95,8	
	20 μM	W1	94,3	92,67
		W2	92,5	
		W3	91,2	

Fuente: autoría propia

6.3.3.1 Viabilidad celular con 1 μ M de ácido gálico

Al aplicar una concentración de 1 μ M de ácido gálico en fibroblastos periodontales, durante un tiempo de 48 horas, se evidenció una viabilidad celular promedio de 94,70 +/- 0,69%.

6.3.3.2 Viabilidad celular con 5 μ M de ácido gálico

Al aplicar una concentración de 5 μ M de ácido gálico en fibroblastos periodontales, durante un tiempo de 48 horas, se evidenció una viabilidad celular promedio de 95,33 +/- 0,32%.

6.3.3.3 Viabilidad celular con 10 μ M de ácido gálico

Se evidenció que, al aplicar en los fibroblastos periodontales una concentración de 10 μ M de ácido gálico durante 48 horas, la viabilidad celular promedio fue de 95,57 +/- 0,68%.

6.3.3.4 Viabilidad celular con 20 μ M de ácido gálico

Se evidenció que, al aplicar en los fibroblastos periodontales una concentración de 20 μ M de ácido gálico durante 48 horas, la viabilidad celular promedio fue de 92,67 +/- 1,56%.

7 Discusión

En la presente investigación se evidencia que los compuestos de origen natural como el ácido gálico, no generan un efecto citotóxico significativo en microorganismos no patógenos, como en este caso lo son los fibroblastos periodontales, manteniendo los niveles de viabilidad celular en rangos favorables, independientemente de la concentración al que son expuestos. Esto se da debido a que el ácido gálico es un agregado que se utiliza principalmente para atacar microorganismos patógenos, y estos resultados sugieren que no tiene una afectación importante en fibroblastos del ligamento periodontal.

Siendo el ácido gálico un compuesto orgánico que hace parte del grupo de los taninos hidrosolubles, y convirtiéndose en un elemento de fácil obtención en grandes variedades de alimentos que se encuentran en el consumo diario de los seres humanos, este es un compuesto que, gracias a sus características y componentes, ha generado un efecto favorable en el área de la salud, dando paso a procesos antiinflamatorios, antialérgicos, antimicrobianos, entre otras propiedades, y brindando un avance al mundo de la ciencia (Fernández et al, 2018).

Este fenómeno positivo como resultado de esta investigación, donde el ácido gálico da lugar a una amplia viabilidad celular en la microbiota no patógena, es consistente de acuerdo con el artículo elaborado por Truzzi et al., (2020) donde se evalúa el efecto de ácido gálico en tejidos intestinales y su correlación respectiva a la concentración trabajada. En este estudio se refleja que, la viabilidad celular en fibroblastos, monocitos y colonocitos del tejido intestinal, no se vio afectada por el ácido gálico en concentraciones de 2.5, 5, 10, 20 μ L de ácido gálico; esto se da debido a que estos polifenoles ejercen una captación de radicales libres, gracias a sus características estructurales específicas. Al aplicar ácido gálico en estas concentraciones a este

tipo de tejido intestinal, hace que las células inmunológicas puedan responder de manera activa los marcadores de estrés oxidativo y, por ende, el polifenol en esas concentraciones anteriormente mencionadas cumple funciones benéficas en algunas afecciones patológicas. Sin embargo, se evidencia que al ser expuestos a ácido gálico en concentración de 40 μL , genera apoptosis de estas células inmunológicas.

En circunstancias donde se busca que la acción del ácido gálico sea generar apoptosis, un ejemplo reciente es su acción sobre células de carcinoma de pulmón que no mantienen relación con pequeñas células (NSCLC), induce la renovación del factor crecimiento epidérmico, siendo el ácido gálico un polifenol un agente terapéutico en el tratamiento de este tipo de carcinomas (Nam et al., 2016). Por otra parte, se corrobora la apoptosis celular generada en procesos de fibrosis pulmonar idiopática en la investigación de Rong et al., (2018), donde el tratamiento con ácido gálico redujo esos cambios histológicos de la fibrosis pulmonar y bajó la infiltración de células inflamatorias.

En contraparte, Abnosi & Yari, (2018) evidenciaron que el ácido gálico, en concentraciones desde 1,87 μM , produce baja viabilidad celular en células madre mesenquimales de ratas. Los autores sugieren tres razones por las cuales posiblemente puedan explicar estos resultados: primero el ácido gálico produce un desequilibrio electrolítico, en segundo lugar porque hay una ruptura del ADN en estas células por exponerlas en ácido gálico, y por último, porque el ácido gálico podría causar un desequilibrio metabólico, lo que conlleva a pensar sobre el efecto contraproducente del consumo de té negro, que es donde se encuentra ampliamente el ácido gálico, y además recomiendan el no uso de ácido gálico en concentraciones mayores a 1.87 μM .

En estudios previos realizados por Hsieh et al., (2016), donde hace énfasis en los efectos del ácido gálico en los fibroblastos de cicatrización hipertrófica, y se implementan concentraciones de 25,50 y 100 μM , los resultados demostraron que, a 25, 50 y 100 μM de ácido gálico, la capacidad de contracción del gel de colágeno fue menor en comparación con el grupo de control, destacando una amplia viabilidad celular al aplicar el ácido gálico. Luego, realizan un control de colágeno después de la digestión con la colagenasa durante 24 horas, y determinaron que no presentaba altos cambios en la viabilidad en diferentes concentraciones, favoreciendo un adecuado proceso de cicatrización.

En la publicación de Hsieh et al., (2017), donde se indaga sobre los mecanismos moleculares de la inhibición del crecimiento inducida por ácido gálico, apoptosis y necrosis en fibroblastos de cicatrices hipertróficas, se toman en cuenta para dicho estudio concentraciones de ácido gálico de 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 y 300 μM . Dicha investigación indica que, en concentraciones de 0 a 15 μM , no se denota una inhibición del crecimiento ni citotoxicidad después de la exposición durante 8 y 24 horas; después de las 24 horas se observa que, al aplicar concentraciones de 50 a 75 μM de ácido gálico, se redujo la proliferación sin ningún cambio morfológico evidente. Por otra parte, al ser expuestos los fibroblastos a concentraciones de 100 a 150 μM , se evidencia un aumento significativo en la mortalidad, pero, al exponer una colonia de queratocitos en 200 μM de ácido gálico durante 48 horas, su crecimiento no se ve afectado a la administración de ácido gálico.

Teniendo en cuenta que, el ácido gálico como compuesto de uso terapéutico no genera solo cambios a nivel celular, es un potente medicamento para el abordaje de una gran variedad de enfermedades sistémicas, dentro de las cuales destaca la diabetes, problemas cardiovasculares y procesos inflamatorios. Si evaluamos los efectos del ácido gálico en el tratamiento de la

diabetes, se encuentra que, el consumo de alimentos ricos en polifenoles presentes en verduras y frutas, impactan de manera positiva generando efectos antioxidantes y antihiper glucemiantes, disminuyendo así de manera progresiva la cantidad de glucosa por decilitro de sangre en los vasos sanguíneos. (Xu et al., 2021)

Por otra parte, las enfermedades cardiovasculares desencadenan una disfunción en el tejido muscular cardíaco alterando así el ritmo sanguíneo, produciendo un déficit en el estilo de vida de aquellos que lo padecen. Se ha empleado el ácido gálico en investigaciones para el tratamiento de estas patologías, como la de Jin et al., (2017), donde sometieron ratas espontáneamente hipertensas al consumo de este compuesto durante 16 semanas. Los resultados demostraron una reducción importante en la contracción de los tejidos, el grosor de la pared aórtica y la atenuación de la hipertrofia ventricular izquierda del corazón.

En definitiva, el ácido gálico se podría catalogar como un compuesto de origen natural que influye en el tratamiento parcial o definitivo de alteraciones sistémicas y que, en cierta manera, puede generar un efecto negativo en microorganismos no patógenos si se administra en elevadas concentraciones. Sin embargo, es un tema que requiere mayor investigación.

En lo que concierne a los fibroblastos periodontales, las investigaciones actuales solo se han centrado en observar el mecanismo de acción del ácido gálico para tratar enfermedades inflamatorias multifactoriales, como lo es la enfermedad periodontal, pero no han sido objetivos con determinar si este compuesto puede inducir procesos de apoptosis o disbiosis celular en células presentes en los tejidos de soporte como los cementoblastos, por ejemplo.

8 Conclusiones

- El ácido gálico no generó una disminución importante en los índices de viabilidad celular, teniendo en cuenta un margen mínimo de 90% como determinante de viabilidad en todos los tiempos de exposición y concentraciones evaluadas.

- En concentraciones de 1, 5 y 10 μM de ácido gálico durante 48 horas de exposición, la viabilidad celular tuvo un comportamiento levemente exponencial, con un pico decreciente en la concentración de 20 μM .

- El protocolo de Riccardi & Nicoletti (2006) utilizado permitió generar resultados reproducibles.

- El ácido gálico se sugiere como un posible componente a futuro para usarse para el tratamiento de patologías orales como la gingivitis o periodontitis.

9 Recomendaciones

Se recomienda dar continuidad a estudios sobre la viabilidad celular del ácido gálico en células no patógenas de la microbiota normal, diferentes a los fibroblastos periodontales, como cementoblastos y osteoblastos.

Se recomienda utilizar otras pruebas de laboratorio para medir la viabilidad celular del ácido gálico en fibroblastos del ligamento periodontal.

El presente estudio abre la puerta para las futuras generaciones que decidan encaminar investigaciones sobre la aplicación del ácido gálico en forma de productos y/o medicamentos, como opción de tratamiento coadyuvante en la terapéutica periodontal.

Referencias Bibliográficas

- Abnosi, M. H., & Yari, S. (2018). The toxic effect of gallic acid on biochemical factors, viability and proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells was compensated by boric acid. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 48(June 2017), 246–253.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.04.016>
- Acosta, A. (2006). El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Universitas Odontológica*, 25(57), 26–33.
- Álvarez Castro, E., & Orallo Cambeiro, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm*, 22(10), 130–140. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-actividad-biologica-los-flavonoides-i--13054406>
- Alvarez, D., & Larque-Saavedra, A. (2004). La supermolécula, el dimetil sulfóxido. *Revista de La Academia Mexicana de Ciencias*, 5.
https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/55_3/la_supermolecula.pdf
- Bai, J., Zhang, Y., Tang, C., Hou, Y., Ai, X., Chen, X., Zhang, Y., Wang, X., & Meng, X. (2021). Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 133(September 2020), 110985. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110985>
- Carlos, I., Bonet, M., Eduardo, I., Pedro, M., & Pinda, D. (2012). *E Industriales*. 2010, 11–27.
- Fernandes, F. H. A., & Salgado, H. R. N. (2016). Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(3), 257–265. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1095064>

- Fernández-rojas, B., & Gutiérrez-venegas, G. (2018). *Flavonoids exert multiple periodontic benefits including anti-inflammatory, periodontal ligament-supporting, and alveolar bone-preserving effects*. *209*(August), 435–454. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.029>
- Hsieh, S. C., Wu, C. C., Hsu, S. L., Feng, C. H., & Yen, J. H. (2016). Gallic acid attenuates TGF- β 1-stimulated collagen gel contraction via suppression of RhoA/Rho-kinase pathway in hypertrophic scar fibroblasts. *Life Sciences*, *161*, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.07.011>
- Hsieh, S. C., Wu, C. C., Hsu, S. L., & Yen, J. H. (2017). Molecular mechanisms of gallic acid-induced growth inhibition, apoptosis, and necrosis in hypertrophic scar fibroblasts. *Life Sciences*, *179*, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.08.006>
- Jiménez, E., Martínez, C., & Guevara Fonseca, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, *52*(2), 73–75. <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un092g.pdf>
- Jin, L., Hao Piao, Z., Sun, S., Liu, B., Ran Kim, G., Mi Seok, Y., Quan Lin, M., Ryu, Y., Young Choi, S., Jin Kee, H., & Ho Jeong, M. (2017). Gallic Acid Reduces Blood Pressure and Attenuates Oxidative Stress and Cardiac Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats OPEN. *Scientific Reports*, *7*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15925-1>
- Kahkeshani, N., Farzaei, F., Fotouhi, M., Alavi, S. S., Bahramsoltani, R., Naseri, R., Momtaz, S., Abbasabadi, Z., Rahimi, R., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. (2019). Pharmacological effects of gallic acid in health and disease: A mechanistic review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *22*(3), 225–237. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.32806.7897>
- Lima, N., Oliveira-tintino, C. D. M., Santos, E. S., Morais, L. P., Cruz, R. P., Menezes, I. R. A.,

- & Coutinho, H. D. M. (2016). *Microbial Pathogenesis Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds : Gallic acid , caffeic acid and pyrogallol*. 99, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.004>
- Nam, B., Rho, J. K., Shin, D. M., & Son, J. (2016). Gallic acid induces apoptosis in EGFR-mutant non-small cell lung cancers by accelerating EGFR turnover. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(19), 4571–4575. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.08.083>
- Osmany Cuesta R, Ingrid Márquez H, M. C. F. (2015). *Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides*.
- Parra, C. (1997). *Analisis Mediante Citometria De Flujo De La Respuesta De Los Espermatozoides De Verraco a Diferentes Medios De Incubacion*. 116.
- Pérez Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), 0–0. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Rodríguez Hinoshita, K. S. N. (2014). Comparación histológica de ligamento periodontal humano preservado en clara de huevo y leche descremada. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/3654#.YigoCepHIDs.mendeley>
- Rong, Y., Cao, B., Liu, B., Li, W., Chen, Y., Chen, H., Liu, Y., & Liu, T. (2018). A novel Gallic acid derivative attenuates BLM-induced pulmonary fibrosis in mice. *International Immunopharmacology*, 64(August), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.08.024>

- Truzzi, F., Valerii, M. C., Tibaldi, C., Zhang, Y., Abduazizova, V., Spisni, E., & Dinelli, G. (2020). Are supplements safe? Effects of gallic and ferulic acids on in vitro cell models. *Nutrients*, *12*(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu12061591>
- Ucero, C., Acosta, Y., & Montero, M. (2016). Fibroblasto: Célula Fundamental En La Salud Y En La Enfermedad Periodontal. *Acta Odontológica Venezolana*, *52*(3).
- Variya, B. C., Bakrania, A. K., Madan, P., & Patel, S. S. (2019). Acute and 28-days repeated dose sub-acute toxicity study of gallic acid in albino mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *101*, 71–78. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2018.11.010>
- Víctor, S., & Antonio, D. (2019). *Fisiología y usos terapéuticos de los fibroblastos gingivales / Physiology and therapeutic uses of gingival fibroblasts*. *20*(1), 41–57.
- Xu, Y., Tang, G., Zhang, C., Wang, N., & Feng, Y. (2021). Gallic acid and diabetes mellitus: Its association with oxidative stress. *Molecules*, *26*(23). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26237115>
- AL Zahrani, N. A., El-Shishtawy, R. M., & Asiri, A. M. (2020). Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *204*, 112609. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112609>.
- Barrera Ramírez, L. M., Drago Serrano, M. E., Pérez Ramos, J., Zamora, A. C., Gómez Arroyo, F., Del Rosario Sainz Espuñes, T., & Mendoza Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, *17*(1), 42–55.

- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271–277. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
- Gómez, A. A. (2006). El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Universitas Odontológica.*, 25(57), 26–33.
- Ministerio de Salud Nacional, R. de C. (1993). Resolución 8430 de 1993. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i4.1526>
- IBERO. (2014). 2. Soluciones. Unidades de concentración. *Concentración, Soluciones Unidades De*, 100. <https://ibero.mx/campus/publicaciones/quimanal/pdf/2soluciones.pdf>
- López Luengo, T. (2002). FLAVONOIDES. *OFFARM*, 21(4), 108–113.
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), 1458–1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
- Truzzi, F., Valerii, M. C., Tibaldi, C., Zhang, Y., Abduazizova, V., Spisni, E., & Dinelli, G. (2020). Are supplements safe? Effects of gallic and ferulic acids on in vitro cell models. *Nutrients*, 12(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu12061591>
- Wang, X., Liu, K., Ruan, M., Yang, J., & Gao, Z. (2018). Gallic acid inhibits fibroblast growth and migration in keloids through the AKT/ERK signaling pathway. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(11), 1114–1120. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy115>

Yoon, C. H., Chung, S. J., Lee, S. W., Park, Y. B., Lee, S. K., & Park, M. C. (2013). Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint Bone Spine*, *80*(3), 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.08.010>