

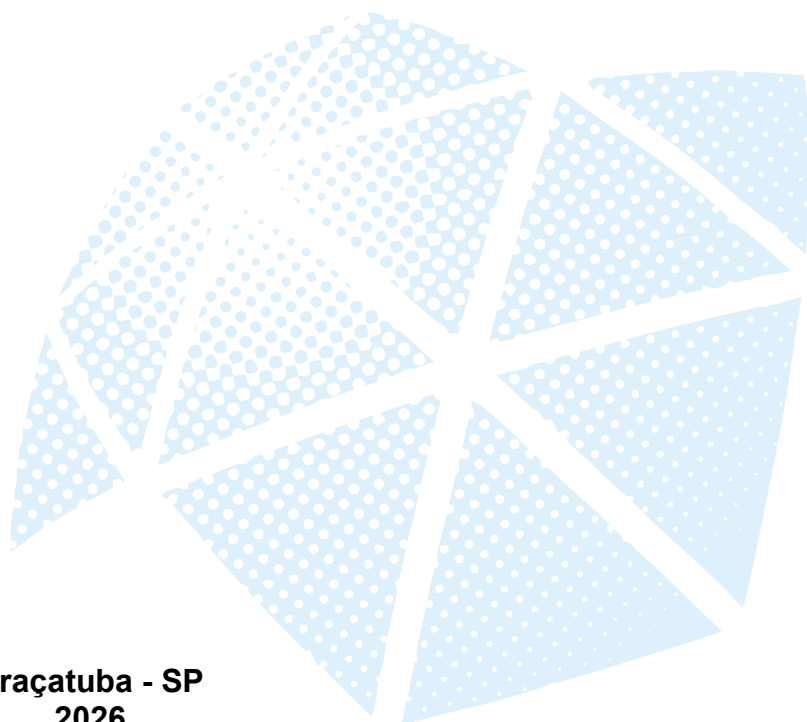


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

NATÁLIA DOS SANTOS SANCHES

**O hidrogel de gellan gum carregado com ácido tânico
reduz a expressão de quimiocinas nas células orais**

**Araçatuba - SP
2026**



NATÁLIA DOS SANTOS SANCHES

**O hidrogel de gellan gum carregado com ácido tânico
reduz a expressão de quimiocinas nas células orais**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Profº. Associado Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

**Araçatuba - SP
2026**

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S211h Sanches, Natália dos Santos.
O hidrogel de gellan gum carregado com ácido
tânico reduz a expressão de quimiocinas nas células
orais / Natália dos Santos Sanches. - Araçatuba, 2026
78 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Taninos 2. Hidrogéis 3. Fibroblastos 4. Gengiva
5. Inflamação 6. Periodontite 7. Peri-implantite I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre foram o meu alicerce. Obrigada pelo amor incondicional, pelo apoio constante e por nunca deixarem de acreditar em mim, mesmo quando eu duvidava. Esta conquista também pertence a vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, que me permitiu trilhar esta jornada até aqui com pessoas maravilhosas ao meu lado. Agradeço por me acompanhar e guiar minhas decisões, e acima de tudo por me capacitar e trazer essa vitória para a minha vida. Tenho certeza de que ao seu lado irei muito mais longe!

Aos meus pais, **Janaina de Sousa Santos Sanches** e **Edson Roberto Sanches**, que estão sempre ao meu lado, auxiliando-me para que eu possa ser independente, disciplinada e educada. Cada decisão tomada requer sacrifícios, mas o suporte dado por vocês me incentiva a pensar sempre de forma positiva e grandiosa. O tamanho da batalha nunca importou, pois vocês me ensinaram a lutar e a nunca desistir. Se para vocês é importante, então vale a pena. Obrigada por confiarem em mim e, mesmo à distância, se mostrarem sempre presentes e dispostos a tudo por mim e pela nossa família. Vocês são o meu maior exemplo e quero sempre honrá-los. Eu amo vocês!

A minha avó, **Terezinha de Sousa Santos**, meu anjo da guarda, que sempre me acompanha. Sinto profundamente a sua falta e dedico a você todas as minhas vitórias. A senhora será para sempre a minha pessoa preferida no mundo, e o amor que sinto por você estará comigo a cada passo da minha vida. Minha estrelinha. Te amo!

Ao meu namorado, **Guilherme Alexandre Silva Prado**, que, mesmo à distância, sempre se mostrou presente, pois os nossos planos sempre foram concretos. Obrigada por me fortalecer em momentos difíceis, por abrir os meus olhos quando estou enlouquecendo com os meus afazeres e por sempre comemorar as minhas pequenas vitórias. Você aceitou sacrificar muitas coisas pelo nosso relacionamento, mas com a certeza de que todos os sacrifícios são passageiros e que são em prol do nosso futuro. Eu te amo!

À minha família do interior, **Rita de Cássia da Silva**, **Wellington Carlos de Lima** e **Arthur Silva Lima**, agradeço por todo o zelo, suporte e incentivo para que eu conquiste os meus sonhos. Obrigada por cada momento vivido, por cada riso, abraço e palavra de motivação. Sei que em vocês tenho um porto seguro. Que nunca nos falem motivos para brindar. Amo vocês!

À minha tia postiça, **Leuci Fátima Zeferina Prado**, dona de um coração generoso, que se entrega de todas as formas para ajudar o próximo. Obrigada por todas as orações, e pelas palavras de incentivo e por cuidar de mim com tanto carinho e dedicação. Amo você!

À minha melhor amiga, **Vitória Zinza Custódio**, minha irmã de alma: sem a sua presença, eu não teria chegado nem à metade do que conquistei. Tudo o que você me ouviu, acolheu e incentivou não cabe em palavras. Tornou-me uma pessoa melhor, e a sua amizade é um dos maiores presentes da minha vida. Saiba que estarei sempre aqui para você. Que possamos compartilhar muitos momentos juntas e somar muitas vitórias. Amo você!

À minha amiga e eterna parceira de pós-graduação, **Caroline Liberato Marchioli**, sou profundamente grata por todo o apoio, companheirismo e força ao longo desta caminhada. Foram anos intensos, de crescimento e de superação, nos quais você nunca soltou a minha mão e esteve presente em cada momento, nos bons e nos difíceis. Não há palavras para explicar o quanto nos completamos; somos, sem dúvida, essa dupla dinâmica. Eu torço imensamente pelo seu sucesso, admiro você profundamente e sei que está no caminho certo. Estarei sempre aqui por você. Ganhei uma amiga para a vida. Amo você!

À minha amiga, **Maria Cristina Ruiz Voms Stein**, nossa eterna “quatro FAPESP”, sou imensamente grata por todo o apoio, pelos conselhos e por cada ombro amigo que me ofereceu nos momentos em que mais precisei. Acompanhar a sua caminhada desde a graduação até a pós-graduação é motivo de grande alegria e orgulho para mim. Sei que este é apenas o início de uma trajetória brilhante, e estarei sempre aqui para aplaudir cada conquista e torcer por todos os seus sonhos. Que o mestrado traga ainda mais crescimento, oportunidades e realizações para a sua vida. Ganhei uma amiga para a vida. Acredite sempre no seu potencial. Amo você!

À minha amiga, **Sara Alves Berton** e “*mamãe do pompom branco mais fofo do mundo*”, sou imensamente grata por todo o apoio, pelos conselhos e pelo carinho ao longo desta caminhada. Você mostrou que é possível conciliar a graduação e a pós-graduação com garra, dedicação e coragem. Acompanhar a sua motivação e os seus sacrifícios diários é verdadeiramente inspirador. Que o mestrado lhe traga não apenas conhecimento, mas também independência, amadurecimento e a certeza

de que tudo o que você está construindo hoje florescerá amanhã. Estarei sempre a torcer por você e a admirar cada conquista. Ganhei uma amiga para a vida. Amo você!

Aos **Rangers**, como parte desta equipe, sou grata por toda a parceria, amizade e cumplicidade. Nós fizemos acontecer! Vencemos muitas barreiras e somamos vitórias a cada ano. Vocês são a razão de eu ter continuado. Ter vocês comigo durante toda a minha pós-graduação foi uma das melhores coisas que poderiam ter me acontecido. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, nos surtos e nas alegrias. As suas conquistas são as minhas conquistas. Levarei o nome de vocês comigo para onde eu for! Amo vocês!

À minha amiga **Izabella Sol**, minha bucomaxilofacial preferida, você foi a minha luz em muitos momentos. Em você, encontrei o meu porto seguro. Compartilhar a minha vida com você sempre foi leve, e nossa amizade é genuína. Sou muito grata por ter te encontrado e eu te admiro imensamente. Você marcou história na FOA e espero que continue se destacando por onde for. Você merece o mundo! Amo você!

À minha amiga **Melissa Koto Murai**, que entende o que é viver ligada nos 220. Melzinha, você é uma pessoa incrível e única, e torço imensamente por você. Acompanhar a sua caminhada na pós-graduação foi uma honra para mim, e não tenho dúvidas de que você irá muito longe. Que a sua energia, inteligência e determinação continuem a abrir caminhos e a realizar sonhos. Estarei sempre aqui para o que der e vier, acredite em você. Amo você!

Ao meu amigo **Paulo Matheus**, o nosso churrasqueiro preferido. Paulinho, você sempre foi uma pessoa verdadeira e de coração enorme. Obrigada por se importar, por querer me ajudar, por me aconselhar e por me lembrar que ainda temos um longo caminho pela frente; vamos “*seguir o plano*”. Que a vida retribua em dobro. Estarei sempre na torcida por você. Amo você!

À minha amiga **Maísa Pereira**, que desde o primeiro ano do mestrado me acolheu e me ensinou tanto sobre cirurgia quanto sobre a vida. Fico imensamente feliz por tudo o que você tem conquistado, porque você merece cada uma dessas vitórias. Que a sua caminhada seja repleta de realizações e que você alcance tudo aquilo que sonha. Obrigada por sempre cuidar de mim e por ser tão presente; sem você, eu não estaria aqui hoje. Amo você!

À minha amiga **Maria Eduarda**, fico imensamente feliz por ter feito parte da sua jornada e por poder acompanhar de perto a sua evolução. Você tem o dom de tornar tudo mais leve, e a sua presença fez toda a diferença nesta caminhada. Obrigada por cada sorriso, por cada conversa e por todo o carinho. Sou muito grata por você. Amo você!

Ao meu amigo **Otávio Augusto Pacheco Vitória**, meu parceiro vienense, construímos uma amizade leve, intensa e fortalecida por muito trabalho e cumplicidade. Obrigada por todo o apoio, pela paciência com o meu jeito *workaholic* e por nunca deixar de acreditar em mim. Você tem um potencial extraordinário, e torço imensamente por cada conquista sua. Viver Viena ao seu lado foi uma experiência única e inesquecível, que guardarei com carinho para sempre. Estarei sempre aqui por você! Amo você!

À minha amiga **Dra. Lara Cristina Cunha Cervantes**, fomos um grupo de “dois” por muitos anos. Obrigada por ter acreditado em mim, por me motivar e por caminhar ao meu lado em tantos momentos. Fico imensamente feliz em ver você conquistando o seu espaço e alcançando cada vitória que merece. Amo você!

Ao meu amigo de pós-graduação, **Dr. Gabriel Pereira Nunes**, que me acompanha desde a graduação e sempre contribuiu, de forma solícita e paciente, para os projetos que desenvolvi ao longo desta trajetória. Obrigada por cada conselho, por cada orientação e por todo o apoio constante. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão. A nossa amizade e parceria acadêmica são únicas e representam um pilar fundamental na minha formação. Obrigada por acreditar em mim, por me incentivar e por caminhar ao meu lado em tantos desafios. Levarei comigo, com carinho e orgulho, tudo o que construímos juntos. Que você continue somando conquistas e alcançando tudo aquilo que merece.

Ao meu orientador, **Prof. Associado Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior**, por todo o ensinamento, aperfeiçoamento e credibilidade ao longo de quase nove anos de convivência e trabalho. Não há palavras para expressar o quanto sou grata ao senhor. Obrigada por zelar por mim, por confiar no meu potencial, por me motivar sempre e por estar presente. Todo o conhecimento adquirido, cada projeto desenvolvido e cada desafio superado sob a sua orientação foram determinantes para que eu desejasse dar continuidade à minha trajetória acadêmica. Hoje, despeço-me

da FOA com o coração repleto de saudade. Ainda assim, sei que continuarei presente, pois, além dos muitos projetos que ainda temos pela frente, a FOA é, e sempre será, a minha casa, e o senhor será o meu eterno orientador. Agradeço, de coração, por todas as oportunidades concedidas ao longo da graduação e da pós-graduação. Foi uma honra imensa trabalhar ao seu lado e representar a nossa universidade em seu nome. Levarei o seu nome academicamente e em meu coração. Amo o senhor!

À **Prof.^a Titular Dra. Roberta Okamoto**, minha profunda gratidão. O seu apoio foi indispensável para cada uma das nossas conquistas, e não existem palavras suficientes para expressar o quanto a senhora é importante para nós. Desde a graduação, estive presente em todos os momentos da minha trajetória, me orientando, não apenas nos projetos acadêmicos, mas também nas decisões e aprendizados da vida. Profissional inspiradora e admirável, a senhora sempre se mostrou disponível a oferecer o seu melhor para ver o nosso crescimento. Obrigada por cada gesto de incentivo, por cada sorriso que trouxe leveza aos dias difíceis e por me ensinar que inteligência, sensibilidade e bom humor podem caminhar juntos. A sua dedicação, competência e humanidade tornam-na uma referência na pesquisa e um verdadeiro exemplo a ser seguido. Guardo com carinho todos os ensinamentos recebidos ao longo desta caminhada e sou imensamente grata pelo privilégio de ter aprendido com a senhora. Amo a senhora!

Ao **Prof. Associado Dr. Francisley Ávila Souza**, a minha sincera gratidão. Professor, o senhor sempre acreditou em mim, me estendeu a mão nos momentos mais desafiadores e motivou-me a ir além. A sua presença foi essencial na minha trajetória acadêmica e pessoal, e o respeito e a admiração que tenho pelo senhor só aumentam a cada dia. Mais do que um orientador, o senhor construiu conosco um verdadeiro grupo, uma grande família, baseada no companheirismo, no crescimento e no apoio mútuo. Amo o senhor!

Ao **Prof. Reinhard Gruber**, a minha mais profunda gratidão. Um ser humano único e extraordinário, que me acolheu não apenas como acadêmica, mas também como parte da sua família. A sua generosidade, humanidade e sensibilidade marcaram profundamente a minha trajetória. O senhor sempre se fez presente, lembrou-se de mim com carinho e, com palavras simples e profundas, ensinou-me a ir além do óbvio, a enxergar com outros olhos e a questionar: “*o que é interessante aqui?*”. Essa reflexão constante fez de mim não apenas uma profissional

melhor, mas também uma pessoa mais atenta, sensível e humana. Levarei comigo, para sempre, o privilégio de ter aprendido com o senhor não apenas ciência, mas também valores que levarei para a vida. Viena me transformou de muitas formas positivas; metade do meu coração está em Viena. Te vejo em breve. Amo o senhor!

Ao Dr. Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira, um profissional admirável e de grande coração. Obrigada por todo acolhimento, encorajamento e acima de tudo pelas oportunidades. Sua confiança em mim me incentivou a batalhar por minhas conquistas. Ter vestido a camisa da IM-PRÓ foi uma honra. Te desejo todo o sucesso do mundo.

Ao Prof. Paulo Tambasco, em tão pouco tempo de convivência, o senhor mostrou-se de braços abertos e genuinamente motivado a iniciar mais uma jornada acadêmica em parceria com a UNESP. A sua receptividade, disponibilidade e entusiasmo tornaram esta caminhada ainda mais significativa. É uma honra poder trabalhar ao seu lado, aprender com a sua experiência e conviver com alguém tão solícito, atencioso, respeitoso e comprometido com a excelência acadêmica. A sua postura profissional é inspiradora e fortalece, ainda mais, minha dedicação à pesquisa e ao ensino. Espero corresponder às suas expectativas e ir além, honrando a confiança que me foi concedida com empenho, responsabilidade e resultados que reflitam a seriedade do nosso trabalho em conjunto.

Ao Prof. Dr. André da Silva Fabris, que sempre tornou a pós-graduação mais leve com sua simpatia e atenção. Obrigada por ser sempre solícito, por me oferecer oportunidades e por demonstrar um coração enorme em cada gesto. Sua dedicação e humanidade tornaram esta jornada ainda mais especial, e tenho certeza de que a FOA ainda tem muito a ganhar com o senhor.

Ao Prof. Dr. Cassio Edvard Sverzut, pelo apoio às nossas pesquisas e pela parceria com a nossa instituição, especialmente com o Departamento de Diagnóstico e Cirurgia.

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** e ao ex-diretor da **Faculdade de Odontologia de Araçatuba Profº Titular Glauco Issamu Miyahara**, por todas as conversas de encorajamento. Obrigada por sempre manter a fé, em nós alunos. Sei que o futuro reserva grandes coisas para todos nós. Agradeço também ao atual diretor e ao **Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem e vice-diretor Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra** por sempre se mostrarem presentes aos alunos, incentivando-os a sempre buscar mais.

Aos **Pós-graduandos e Professores do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse concluído com sucesso.

À minha mentora **Layla Panahipour** e aos pesquisadores do **Laboratório de Biologia Oral da Universidade de Medicina de Viena – Reinhard Gruber (Lei, Atefe, Hannah, Dominik, Chiara, Anna, Benedeta)**, cuja paciência, motivação e zelo foram fundamentais para a concretização deste projeto. O impacto de vocês transcendeu a minha trajetória acadêmica, deixando marcas profundas também na minha vida pessoal. Amo vocês! Espero vê-los em breve.

Aos assistentes de Suporte Acadêmico **Marco e Paulo**, pelo apoio técnico que forneceram durante o período de desenvolvimento das etapas laboratoriais. Ao seu **João** que sempre nos recebeu de braços abertos. Ao **Fausto**, ao **Renato** e **Lucas** que sempre me receberam bem e tentavam me animar de todas as formas.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001, pela concessão da Bolsa de Doutorado Sanduiche Processo 88887.899928/2023-00, a qual foi fundamental para a realização desta pesquisa.

***“Que a vida te surpreenda com aquilo que você nunca pediu
em voz alta, mas sempre sonhou em silêncio”***

Autor desconhecido

RESUMO

SANCHES, N. S. **Hidrogel de gellan gum carregado com ácido tânico reduz a expressão de quimiocinas nas células orais**. 2026. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2026.

Ácido tânico (TA), um polifenol natural com propriedades anti-inflamatórias e de reticulação, é um componente versátil de hidrogéis que pode ser liberado em locais inflamados na cavidade oral. No entanto, o impacto do TA na atenuação da resposta inflamatória em células orais ainda não havia sido demonstrado. Diante disso, estabelecemos um bioensaio no qual a expressão de quimiocinas foi induzida pela exposição de fibroblastos gengivais e células de linhagem celular de carcinoma espinocelular oral (HSC2) a IL-1 β e TNF- α . Além disso, os fibroblastos gengivais foram estimulados com saliva e poly (I:C) de alto peso molecular (HMW) para induzir a produção de quimiocinas. Os resultados demonstraram que o TA reduziu de forma eficaz a expressão de CXCL1, CXCL2, CXCL8 e CXCL10 — tanto nos fibroblastos gengivais quanto nas células HSC2 — sem afetar a viabilidade celular. Esse efeito foi confirmado por imunoenaios para CXCL8. Observou-se ainda que o TA diminuiu a fosforilação de ERK, JNK e p65 em fibroblastos gengivais e inibiu parcialmente a translocação nuclear de NF- κ B/p65. Notavelmente, o TA liberado a partir de hidrogel gellan gum manteve sua capacidade de suprimir a expressão de quimiocinas em fibroblastos gengivais. Além disso, considerando que as espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel crucial nos danos teciduais relacionados à inflamação, observamos que o TA reduziu significativamente os níveis de ROS mitocondrial em fibroblastos gengivais expostos a H₂O₂ e IL-1 β +TNF- α . Esses achados fornecem insights sobre as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do TA em células orais e apresentam o hidrogel gellan gum como um sistema de liberação, indicando um potencial clínico relevante no controle da expressão exacerbada de quimiocinas e do estresse oxidativo em condições inflamatórias crônicas, como a periodontite ou a peri-implantite.

Palavras-chave: ácido tânico; gellan gum hidrogel; fibroblastos gengivais; resposta inflamatória; periodontite; peri-implantite.

ABSTRACT

SANCHES, N. S. **Tannic acid-loaded gellan gum hydrogel reduce chemokine expression in oral cells.** 2026. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2026.

Tannic acid (TA), a natural polyphenol with anti-inflammatory and crosslinking properties, is a versatile component of hydrogels and can be released at inflamed sites within the oral cavity. However, the impact of TA on the attenuation of inflammatory responses in oral cells had not yet been demonstrated. To address this, we established a bioassay in which chemokine expression was induced by exposing gingival fibroblasts and oral squamous cell carcinoma cells (HSC2) to IL-1 β and TNF- α . In addition, gingival fibroblasts were stimulated with saliva and high-molecular-weight poly(I:C) (HMW) to induce chemokine production. The results demonstrated that TA effectively reduced the expression of CXCL1, CXCL2, CXCL8, and CXCL10 in both gingival fibroblasts and HSC-2 cells without affecting cell viability. This effect was further confirmed by immunoassays for CXCL8. TA also decreased the phosphorylation of ERK, JNK, and p65 in gingival fibroblasts and partially inhibited the nuclear translocation of NF- κ B/p65. Notably, TA released from a gellan gum hydrogel retained its ability to suppress chemokine expression in gingival fibroblasts. Moreover, given that reactive oxygen species (ROS) play a critical role in inflammation-associated tissue damage, we observed that TA significantly reduced mitochondrial ROS levels in gingival fibroblasts exposed to H₂O₂ and IL-1 β + TNF- α . Collectively, these findings provide insights into the anti-inflammatory and antioxidant properties of TA in oral cells and present the gellan gum hydrogel as a delivery system with clinically relevant potential for controlling excessive chemokine expression and oxidative stress in chronic inflammatory conditions, such as periodontitis and peri-implantitis.

Keywords: tannic acid; gellan gum hydrogel; gingival fibroblasts; inflammatory response; periodontitis; peri-implantitis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeitos farmacológicos e mecanísticos do ácido tânico 23
- Figura 2.** Metodologia de plaqueamento com hidrogel 27
- Figura 3.** Preparação das bolsas de diálise para análise de cinética de liberação 28
- Figura 4.** Ensaio de viabilidade celular para triagem de concentrações de ácido tânico em fibroblastos gengivais e HSC2. Células expostas a meio sem soro com diluição seriada de TA ($\mu\text{g/mL}$) durante a noite. (A e B) A viabilidade foi avaliada pela medição da produção de formazana e expressa como percentual em relação aos controles não estimulados. A análise estatística foi realizada usando o teste t pareado por razão, com os valores de p indicados. (C e D) Imagens representativas da coloração live/dead, em que o verde indica células viáveis e o vermelho células mortas. Os resultados sugerem que a viabilidade celular foi mantida até a concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ de TA para fibroblastos gengivais e células HSC2. Barra de escala: 100 μm 33
- Figura 5.** Fibroblastos gengivais foram expostos a IL1- β e TNF- α (10 ng/mL) isoladamente e em combinação com TA (20 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão nas células não tratadas. (A) A expressão gênica das quimiocinas foi significativamente reduzida pelo TA a 20 $\mu\text{g/mL}$, (B) confirmado em nível proteico pelo imunoensaio para CXCL8 (pg/mL). Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes de PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada usando teste t pareado por razão, com os valores de p indicados 35
- Figura 6.** Fibroblastos gengivais foram expostos a saliva a 5% isoladamente e em combinação com TA (20 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão observadas nas células não tratadas. (A) A expressão gênica das quimiocinas foi significativamente reduzida pelo TA a 20 $\mu\text{g/mL}$, (B) confirmado em nível proteico por imunoensaio para CXCL8 (pg/mL). Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes de PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando teste t pareado por razão, com os valores de p indicados 36
- Figura 7.** Fibroblastos gengivais foram expostos a poly (I: C) HMW (100 ng/mL) isoladamente e em combinação com TA (20 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão observadas nas células não tratadas. (A) A expressão gênica das quimiocinas foi significativamente reduzida pelo

TA a 20 µg/mL, (B) confirmado em nível proteico por imunoenensaio para CXCL8 (pg/mL). Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes de PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando teste t pareado por razão, com os valores de p indicados 37

Figura 8. Imunofluorescência para NF-κB-p65. O ácido tânico, em combinação com IL-1β e TNF-α (10 ng/mL), inibe parcialmente a translocação nuclear da p65 em fibroblastos orais. Fibroblastos gengivais não tratados (wo; sem tratamento), expostos apenas a IL-1β e TNF-α, ou tratados com TA em combinação com IL-1β e TNF-α por 1 hora. Uma marcação nuclear fraca de p65 foi observada nas células tratadas com 20 µg/mL de TA junto com IL-1β e TNF-α, em comparação com a acumulação significativa de p65 no núcleo em resposta apenas a IL-1β e TNF-α. A barra de escala representa 90 µm 38

Figura 9. Fibroblastos gengivais foram expostos a IL-1β e TNF-α (10 ng/mL) isoladamente e em combinação com TA (20 µg/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão nas células não tratadas. A expressão gênica de quimiocinas foi significativamente reduzida pela concentração de 20 µg/mL de TA. Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado de razão, e os valores de p estão indicados 38

Figura 10. Fibroblastos gengivais foram expostos a poly (I:C) HMW (100 ng/mL) isoladamente e em combinação com TA (20 µg/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão nas células não tratadas. A expressão gênica de quimiocinas foi significativamente reduzida pela concentração de 20 µg/mL de TA. Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado de razão, e os valores de p estão indicados 39

Figura 11. Células HSC2 foram expostas a IL-1β e TNF-α (10 ng/mL) isoladamente e em combinação com TA (20 µg/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão nas células não tratadas. (A) A expressão gênica de quimiocinas foi significativamente reduzida por 20 µg/mL de TA, (B) confirmado ao nível proteico pelo ensaio imunológico para CXCL8 em pg/mL. Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes de PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado de razão, e os valores de p estão indicados 40

Figura 12. O efeito do TA (20 µg/mL) na fosforilação das moléculas de sinalização em fibroblastos gengivais estimulados por IL-1β e TNF-α (10 ng/mL). Lisados celulares foram analisados por Western Blot para medir os níveis tanto fosforilados quanto totais da quinase regulada por sinal extracelular (ERK), da quinase N-terminal c-Jun (JNK), do p38 e da p65

41

Figura 13. Capacidade do TA (20 µg/mL) em reduzir as espécies reativas de oxigênio em fibroblastos gengivais expostos a H₂O₂, IL-1β e TNF-α. Fibroblastos gengivais foram expostos a (A) H₂O₂ (100 µM) e (B) IL-1β e TNF-α (10 ng/mL) para induzir a liberação de ROS. Em (A) e (B), o tratamento com TA (20 µg/mL) reduziu significativamente a liberação de ROS a níveis comparáveis ao controle não tratado. Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado, e os valores de p estão indicados

42

Figura 14. Perfil de liberação do TA em diferentes concentrações de 400, 1330 e 4000 µg/mL a partir do hidrogel GG (10 mg/mL). A cinética de liberação sustentada a longo prazo foi monitorada de 0,5 a 96 horas. Cada ponto de dado no perfil de liberação representa o valor médio ± desvio padrão, obtido a partir de experimentos independentes em triplicata

44

Figura 15. Ensaios de viabilidade celular para triagem de concentração de GGTA em fibroblastos gengivais e células HSC2 expostos a GGTA. Imagens representativas da coloração live/dead mostram células viáveis em verde e células mortas em vermelho. “WO” indica células não tratadas, enquanto “GG” representa células tratadas com GG (10 mg/mL) sem TA. As barras de escala representam 100 µm

45

Figura 16. Fibroblastos gengivais foram expostos a IL-1β e TNF-α (10 ng/mL) isoladamente e em combinação com GGTA (1330 µg/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão das células não tratadas. (A) A expressão gênica das quimiocinas foi significativamente reduzida pelo GGTA 1330 µg/mL, (B) resultado confirmado no nível proteico por imunoenensaio para CXCL8 (pg/mL). Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes para PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado por razão (ratio-paired t-test), e os valores de p são apresentados

46

Figura 17. Fibroblastos gengivais foram expostos a saliva a 5% isoladamente e em combinação com GGTA (1330 µg/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão das células não tratadas. (A) A expressão gênica das

quimiocinas foi significativamente reduzida pelo GG+TA na concentração de 1330 $\mu\text{g/mL}$, (B) o que foi confirmado no nível proteico por meio de imunoensaio para CXCL8 (pg/mL). Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes de PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado por razão (ratio-paired t-test), e os valores de p estão indicados

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers humanos

29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
AT / TA	Ácido tânico
BV2	Linha celular microglial murina BV2
CCL	Ligante de quimiocina motivo C-C
cm ²	Centímetro quadrado
CXCL	Ligante de quimiocina motivo C-X-C
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DB	DrugBank (Base de dados de fármacos)
DMEM	Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECL	Quimioluminescência reforçada
ECM	Matriz extracelular
ELISA	Ensaio imunoenzimático ligado à enzima
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERK2	Quinase regulada por sinal extracelular 2
FDA	Agência de Administração de Alimentos e Medicamentos dos
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GG	Goma gellan
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HaCaT	Queratinócitos humanos imortalizados
HMW	Alto peso molecular
HRP	Peroxidase de raiz-forte
HSC2	Linha celular de carcinoma espinocelular oral HSC-2
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8 / CXCL8	Interleucina 8
JNK	Quinase N-terminal de c-Jun
LPS	Lipopolissacarídeo
mg/mL	Miligramma por mililitro

mL	Mililitro
MMPs	Metaloproteinases da matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo
NF-κB	Fator nuclear kappa B
nm	Nanómetro
°C	Graus Celsius
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
qPCR	PCR quantitativo
RNA-seq	Sequenciação de RNA
ROS	Espécies reativas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de PCR quantitativo
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
Single-cell RNA-seq	Sequenciação de RNA de célula única
SLV	Saliva estéril
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
ΔΔCt	Diferença dupla do limiar de ciclo
μg/mL	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Cultura Celular de Fibroblastos Gengivais e Células de Carcinoma Espinocelular Oral	26
3.2 Desenvolvimento do Hidrogel Gellan Gum Carreado com Ácido Tânico	26
3.3 Cinética de Liberação do Ácido Tânico a Partir do Hidrogel Gellan Gum	27
3.4 Ensaios de Viabilidade Celular	28
3.5 Análise de Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) e Imunoensaio	28
3.6 Análise por Imunofluorescência	29
3.7 Análise de Western Blot	30
3.8 Análise de Liberação de Espécies de Oxigênio Mitocondriais (ROS)	30
3.9 Análise Estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Triagem das Concentrações de TA	32
4.2 Ácido Tânico Reduziu as Quimiocinas Induzidas por IL-1 β e TNF- α , SLV ou Poly (I:C) HMW em Fibroblastos Gengivais	33
4.3 Ácido Tânico Reduziu as Quimiocinas Induzidas por IL-1 β e TNF- α em Células HSC2	39
4.4 Ácido Tânico Inibe a Fosforilação de ERK, JNK e p65 em Fibroblastos Gengivais Induzidos por IL-1 β e TNF- α	40
4.5 Ácido Tânico Reduz Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) Induzidas por H ₂ O ₂ , IL-1 β e TNF- α em Fibroblastos Gengivais	42
4.6 Liberação Sustentada de Ácido Tânico a Partir do Hidrogel Gellan Gum (GGTA)	43
4.7 Ácido Tânico Carregado em Gellan Gum Reduziu Quimiocinas Induzidas por IL-1 β e TNF- α ou SLV em Fibroblastos Gengivais	44
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO*

A doença periodontal é uma condição patológica desencadeada por disbiose da microbiota, que provoca inflamação crônica e estresse oxidativo. Esse ambiente catabólico leva à destruição da gengiva, do ligamento periodontal, do osso alveolar e de outras estruturas de suporte [1–4]. Um processo semelhante ocorre na peri-implantite, culminando na osteólise inflamatória [2,5–7]. Essas condições evoluem a partir de estágios iniciais, menos agressivos aos tecidos de suporte e potencialmente reversíveis mediante higiene oral adequada, o que possibilita a restauração da barreira de tecidos moles [8,9]. Avanços recentes nas técnicas de sequenciamento de ácido ribonucleico (RNA) de célula única (single-cell RNA-seq.) identificam o papel de fibroblastos orais e células epiteliais na promoção da inflamação em casos de periodontite [10] e peri-implantite [11]. Os fibroblastos demonstram capacidade de recrutar neutrófilos por meio das quimiocinas C-X-C ligantes, como CXCL1, CXCL2, CXCL5 e CXCL8, enquanto CXCL12, CXCL13 e a quimiocina C-C ligante 19 (CCL19) atraem outros tipos de leucócitos [10]. De forma semelhante, os queratinócitos — células epiteliais especializadas — de pacientes com periodontite apresentam aumento na expressão de CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL13 e CCL20 [12], sugerindo que a expressão de quimiocinas por fibroblastos gengivais e células epiteliais desempenha papel central na manutenção da inflamação crônica no periodonto e na região peri-implantar.

Notavelmente, pesquisas pré-clínicas identificaram a CCL2 como uma quimiocina-chave significativamente superexpressada na periodontite, promovendo a inflamação e induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 beta (IL-1 β), que desempenham papel direto na destruição dos tecidos de suporte dentário [13]. Consistentemente, níveis elevados de citocinas e quimiocinas como TNF- α , IL-1 β e CXCL8 no fluido crevicular gengival e no fluido peri-implantar estão associadas à gravidade da periodontite e da peri-implantite [13,14]. Além disso, enzimas catabólicas como as metaloproteinases da matriz (MMPs) e moléculas oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), desempenham um papel central na cascata

* Normalizado de acordo com a International Journal of Molecules Sciences - <https://www.mdpi.com/journal/ijms/instructions>

inflamatória, degradando o colágeno e a matriz extracelular, comprometendo a integridade dos tecidos de suporte, favorecendo a progressão para perda dentária ou falha de implantes [4].

Em resposta à injúria tecidual, a redução da expressão de quimiocinas — atenuando o recrutamento de neutrófilos [14,15] e de outras células inflamatórias — bem como neutralizar as ROS, configura uma estratégia promissora para restaurar o equilíbrio homeostático, especialmente considerando que tratamentos convencionais, como o desbridamento mecânico e a antibioticoterapia, frequentemente apresentam eficácia limitada [1–3]. Consequentemente, há uma demanda crescente por estratégias adjuvantes locais que complementem as terapias convencionais, visando prevenir a progressão da periodontite e da mucosite peri-implantar para estágios irreversíveis de destruição tecidual.

Uma opção promissora para essa finalidade é o ácido tânico (TA), um polifenol de origem vegetal aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA-Agência de Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos) para aplicações biomédicas. Seu potencial clínico é sustentado por propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antibacterianas [16,17]. Por instância, o TA tem sido proposto como estratégia local para promover a cicatrização de feridas *in vivo* e *in vitro* [17-19]. Atualmente, segundo o *Drug Bank* (Base de dados de fármacos; DB09372), o TA é utilizado topicamente no tratamento de herpes labial, assaduras, bolhas febris e dermatite por hera venenosa. Estudos *in vitro* elucidam os mecanismos celulares do TA, demonstrando que ele reduz a expressão de citocinas em células microgлияis (BV2) [19], inibe a síntese de prostaglandinas em queratinócitos humanos imortalizados (HaCat) irradiadas [20] e em modelos murinos de úlceras [21], além de atuar em macrófagos derivados de medula óssea [22]. Ainda, o TA regula negativamente a expressão de óxido nítrico sintase induzível e outros mediadores inflamatórios em condrócitos, modulando as vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e do fator nuclear chapa B (NF- κ B) [19,22–25]. O TA também reduz a ativação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) das vias quinase regulada por sinal extracelular 2 (ERK2), p38 e NF- κ B em células de linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7) [26] e diminui a produção ROS em diversos modelos [26–29] (Figura 1).

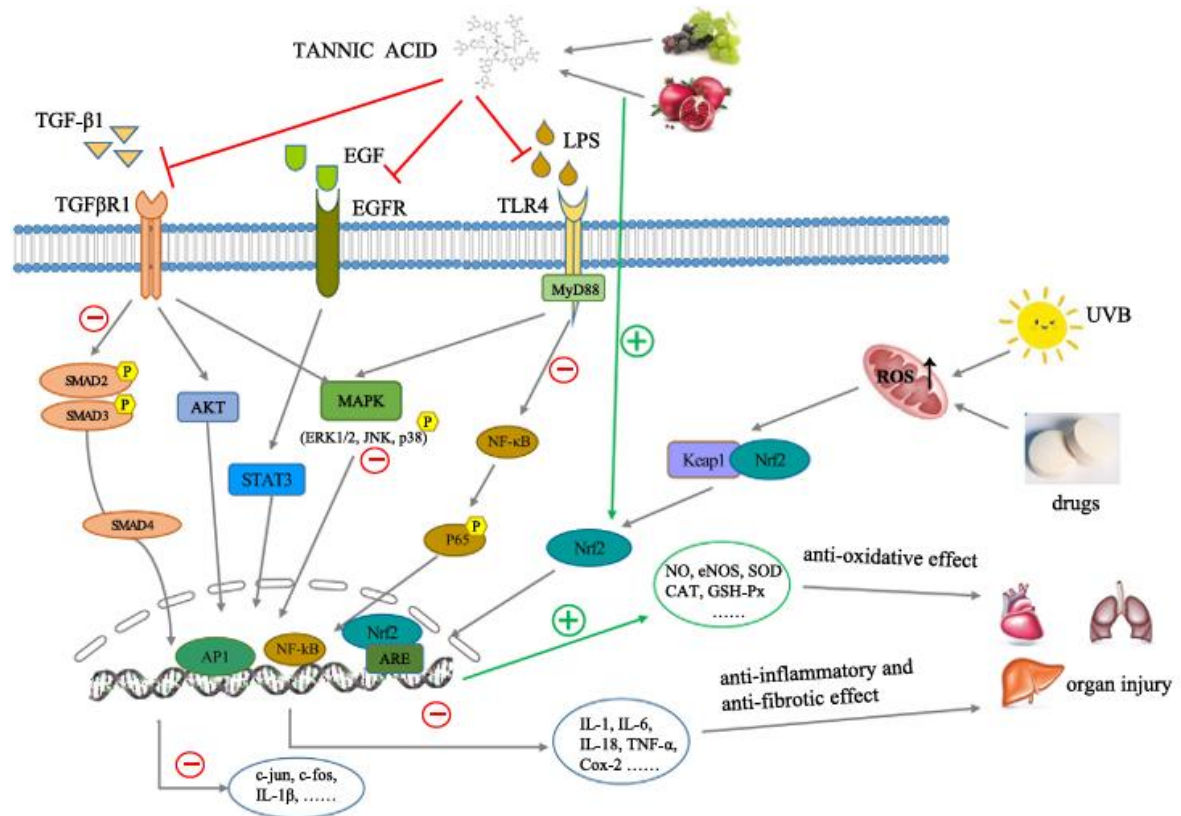


Figura 1. Efeitos farmacológicos e mecânicos do ácido tânico.

Fonte: Jing et al.¹⁶

Diante desses achados, não surpreende que o TA tenha sido utilizado como revestimento de componentes protéticos de implantes [9], assim como em microcápsulas de alginato contendo prata e TA em hidrogel, que demonstraram suporte à microvascularização em modelos de periodontite [30,31]. Esses resultados reforçam a hipótese de que o TA pode exercer efeitos anti-inflamatórios tanto na periodontite quanto na peri-implantite. Contudo, ainda existem evidências limitadas sobre seu potencial para reduzir a expressão de quimiocinas em células orais. Para que seus efeitos terapêuticos sejam eficazes, o TA requer um sistema de liberação apropriado. Como reticulador (*crosslink*) natural, ele participa de interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas [32], permitindo sua incorporação em biomateriais [32,33] e contribuindo para a estabilidade estrutural de hidrogéis [34,35].

Neste contexto, o hidrogel gellan gum (GG) é um polissacarídeo aniônico de origem natural, aprovado pela FDA, amplamente empregado na formulação de

hidrogéis in situ e reconhecido como uma plataforma promissora para sistemas de liberação de fármacos, conforme discutido em diversas revisões [30–33]. O hidrogel GG apresenta excelente biocompatibilidade, baixa taxa de degradação e propriedades mecânicas ajustáveis, características que o tornam um candidato ideal para liberação controlada de medicamentos [28]. Destaca-se como hidrogel termossensível, permanecendo líquido à temperatura ambiente e gelificando ao contato com a temperatura corporal. Essa característica permite que o GG atue como veículo injetável para liberação controlada de fármacos, sendo aplicável em engenharia de tecidos e cicatrização de feridas [36-39]. Notavelmente, hidrogéis de GG carregados com TA, demonstraram potencial para acelerar a regeneração tecidual e promover reparo eficaz em modelos de feridas [40,41]. No entanto, o impacto do TA livre em solução e carregado no hidrogel GG na atenuação da resposta inflamatória em células orais ainda precisa ser demonstrado.

Considerando o cenário inflamatório característico da periodontite e da peri-implantite, este estudo foi desenvolvido para investigar o potencial do TA em reduzir a expressão de quimiocinas e ROS. Para isso, utilizamos fibroblastos gengivais humanos e a linhagem de carcinoma espinocelular oral (HSC2), uma vez que essas células representam os principais mediadores da inflamação oral: os fibroblastos refletem a resposta do tecido conjuntivo à inflamação e à regeneração, enquanto as células HSC2 fornecem insights sobre o comportamento epitelial em condições patológicas [42-44]. Além disso, avaliamos a eficácia do hidrogel GG como sistema de liberação controlada de TA e exploramos os mecanismos celulares subjacentes, com foco nas vias de sinalização inflamatórias relevantes, incluindo NF- κ B e MAPK, que regulam a resposta pró-inflamatória em células orais.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal avaliar o potencial do ácido tânico em modular a resposta inflamatória e o estresse oxidativo em células orais humanas — incluindo fibroblastos gengivais primários e células da linhagem HSC2 — bem como investigar as vias de sinalização intracelular associadas a esses efeitos. Além disso, buscou-se verificar se o TA, quando liberado a partir de um hidrogel GG, mantém sua atividade anti-inflamatória nos fibroblastos gengivais. Tais investigações visam fornecer evidências *in vitro* sobre o potencial do TA como agente terapêutico para o controle da inflamação crônica em doenças orais, como periodontite e peri-implantite, além de validar o uso de hidrogéis de GG como sistema de liberação tópica de compostos bioativos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura Celular de Fibroblastos Gengivais e Células de Carcinoma Espinocelular Oral

Fibroblastos gengivais humanos primários foram isolados a partir de fragmentos gengivais obtidos de terceiros molares (dentes do siso) extraídos de três doadores distintos, mediante consentimento informado dos pacientes. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (EK Nr. 631/2007). A linhagem celular de carcinoma espinocelular oral (HSC2) foi adquirida do *Health Science Research Resources Bank* (Sennan, Japão). Todas as células foram cultivadas em atmosfera umidificada a 37 graus celsius (°C) com 5 por cento (%) de gás carbônico (CO₂), utilizando meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina; Sigma-Aldrich).

Os fibroblastos gengivais foram semeados em placas de 24 poços (VWR International, Radnor, PA, EUA) na densidade de 1×10^5 células por centímetro quadrado (cm²), enquanto as células HSC2 foram semeadas na densidade de 2×10^5 células/cm². No dia seguinte, as células foram pré-tratadas com ácido tânico (TA; CAS: 1401-55-4, Sigma-Aldrich) à 20 microgramas por mililitro (µg/mL) por 20 minutos, em associação com 10 ng/mL de IL-1β e TNF-α (ProSpec-Tany Techno Gene Ltd., Ness-Ziona, Israel), 5% de saliva estéril (SLV) ou 100 nanograma por mililitros (ng/mL) de poly (I:C) HMW (InvivoGen, Toulouse, França), utilizado como controle positivo para indução inflamatória [44]. Após incubação durante a noite nas mesmas condições de cultivo, foi realizada a extração de RNA para análise de expressão gênica, e o sobrenadante foi coletado para ensaios imunológicos.

3.2 Desenvolvimento do Hidrogel Gellan Gum Carreado com Ácido Tânico

O TA foi dissolvido em água destilada contendo 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 160 miligrama por mililitro (mg/mL). O pó de gellan gum (GG, Shanghai Macklin Biochemical Technology Co., Ltd., Xangai, China) foi dissolvido em

água destilada (10 mg/mL) e aquecido a 90 °C por 30 minutos até a obtenção de uma solução translúcida. O hidrogel foi formulado especificamente para este estudo pela mistura do TA com o GG, obtendo-se concentrações finais de 400 µg/mL, 1330 µg/mL e 4000 µg/mL, enquanto o GG isolado foi utilizado como controle. Para os ensaios o hidrogel foi posicionado perpendicularmente à parede de placas de 96 e 24 poços previamente semeadas com fibroblastos gengivais e células HSC2 [38] (Figura 2).

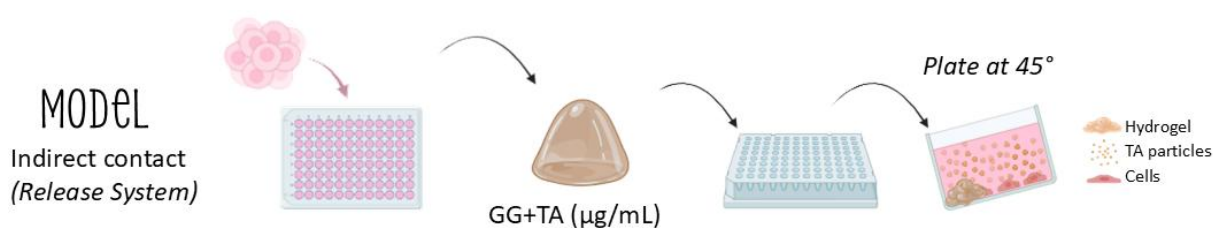


Figura 2. Metodologia de plaqueamento com hidrogel.

Fonte: Biorender (2025)

3.3 Cinética de Liberação do Ácido Tânico a Partir do Hidrogel Gellan Gum

A liberação *in vitro* do TA a partir dos hidrogéis foi avaliada utilizando bolsas de diálise com ponto de corte de 3500 daltons (Da). As bolsas foram imersas em 20 mililitro (mL) de solução salina tamponada com fosfato (PBS; Sigma-Aldrich) e mantidas em agitador orbital a 37 °C, com agitação constante de 100 rotações por minuto (rpm) (Figura 3). Nos tempos determinados, 2 mL do meio de liberação foram coletados e substituídos por PBS fresco. A cinética de liberação do TA foi determinada por leitura espectrofotométrica (Synergy HTX, BioTek, Boston, EUA), com base na intensidade de absorção do TA a 275 nanômetro (nm). A liberação cumulativa foi quantificada por meio de uma curva de calibração previamente estabelecida com soluções de TA em concentrações conhecidas.

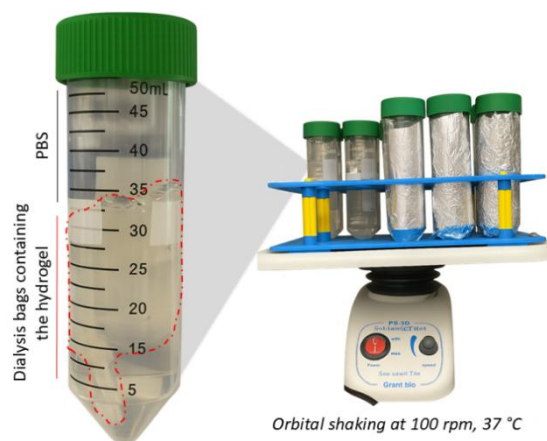


Figura 3. Preparação das bolsas de diálise para análise de cinética de liberação.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

3.4 Ensaios de Viabilidade Celular

Experimentos de viabilidade foram realizados em fibroblastos gengivais e células HSC2, tratadas com diluições seriadas de TA em meio livre de soro durante a noite. O reagente MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio brometo; Sigma-Aldrich) foi adicionado a uma concentração final de 0,5 mg/mL e as células foram incubadas por 2 horas a 37 °C. Os cristais de formazan formados foram solubilizados com DMSO (Sigma-Aldrich), e a densidade óptica foi medida a 570 nm. Os dados foram normalizados em relação aos valores do grupo controle não estimulado. A viabilidade celular também foi confirmada por meio de um kit colorimétrico de células vivas/mortas, conforme as instruções do fabricante (Enzo Life Sciences, Inc., Lausanne, Suíça).

3.5 Análise de Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) e Imunoensaio

Após a estimulação, o RNA total foi isolado utilizando o kit ExtractMe total RNA (EURx, Gdańsk, Polônia), seguido por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), realizadas com reagentes da LabQ (Labconsulting, Viena, Áustria) em um sistema CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os níveis RNA mensageiro (mRNA) foram calculados com base na normalização ao gene de

referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), utilizando o método de quantificação relativa baseado na diferença dupla do limiar do ciclo ($\Delta\Delta C_t$). As sequências dos primers dos genes-alvo estão listadas na Tabela 1. Para os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), foi utilizado o kit ELISA Quantikine para detecção de CXCL8/IL8 humano (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

Tabela 1. Sequência de primers humanos.

Gene	Forward (5'→ 3')	Reverse (3'→ 5')
hCXCL1	TCCTGCATCCCCCATAGTTA	CTTCAGGAACAGCCACCAGT
hCXCL2	CCCATGGTTAAGAAAATCATCG	CTTCAGGAACAGCCACCAAT
hCXCL8	AACTTCTCCACAACCCTCTG	TTGGCAGCCTTCCTGATTTT
hCXCL10	TGCCATTCTGATTTGCTGCC	TGCAGGTACAGCGTACAGTT
hCCL2	AGAATCACCAGCAGCAAGTGTC	TCCTGAACCCACTTCTGCTTG
hCCL4	AATCACCAGCAGCAAGTGTC	TTGGGTTGTGGAGTGAGTGT
hMMP1	GCTAACCTTTGATGCTATAACTACGA	TTTGTGCGCATGTAGAATCTG
hMMP3	GCAGTTTGCTCAGCCTATCC	TTTCTCCTAACAACTGTTTCACATC
hCOX2	GAATGGGGTGATGAGCAGTT	CAGAGGGCAGGATACAGC
hGAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

3.6 Análise por Imunofluorescência

Fibroblastos gengivais foram semeados em lâminas Millicell EZ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) na densidade de $0,5 \times 10^5$ células/cm². As células, mantidas em meio sem soro, foram pré-tratadas com ácido tânico (20 µg/mL) por 20 minutos, seguidas da exposição a IL-1 β e TNF- α (10 ng/mL) por 1 hora. Como controle, utilizou-se meio sem soro. Após os tratamentos, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, bloqueadas com albumina de soro bovino a 1% (Sigma-Aldrich) e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,3% (Sigma-Aldrich). O anticorpo primário anti-NF- κ B-p65 (Cell Signaling Technology, Cambridge, Reino Unido) foi aplicado e incubado durante a noite a 4 °C. A detecção foi realizada com anticorpo secundário Alexa 488 (CS-4412, Cell Signaling Technology). As imagens fluorescentes foram obtidas em microscópio equipado com filtro de excitação dual por 4',6-diamidino-2-fenilindol e isotiocianato de fluoresceína (DAPI-FITC; Echo Revolve Fluorescence Microscope, San Diego, CA, EUA).

3.7 Análise de Western Blot

Fibroblastos gengivais foram mantidos em meio livre de soro, pré-tratados com TA (20 µg/mL) durante a noite e posteriormente expostos a IL1-β e TNF-α (10 ng/mL) por 1 hora. Os extratos celulares foram preparados com tampão de sódio dodecil sulfato (SDS) contendo inibidores de protease e fosfatase (cOmplete ULTRA Tablets e PhosSTOP; Roche, Mannheim, Alemanha), separados por eletroforese em gel (SDS-PAGE) e transferidos para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). As membranas foram bloqueadas e incubadas com os anticorpos primários: fosfo-ERK e ERK total (#7383, #81459), fosfo-p38 e p38 total (#4511, #535), fosfo-quinase N-terminal do c-Jun (JNK) e JNK total (#6254, #7345) da Santa Cruz Biotechnology (SCBT), além de fosfo-NF-κB-p65 e NF-κB-p65 total (#3033, #8242) da Cell Signaling Technology. A detecção foi realizada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase de raiz-forte (HRP) (CS-7074; Cell Signaling Technology, Cambridge, Reino Unido). Após incubação com o reagente de detecção Clarity Western ECL Substrate, os sinais de quimioluminescência foram visualizados em um sistema de imagem ChemiDoc. A análise densitometria das bandas foi feita utilizando o software Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

3.8 Análise de Liberação de Espécies Reativas de Oxigênio Mitocondriais (ROS)

Fibroblastos gengivais foram semeados em placas de 96 poços na densidade de 1×10^5 células/cm². No dia seguinte, as células foram tratadas conforme o protocolo padrão de estimulação com TA, seguidas da exposição a peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 100 micromol (µM); Sigma-Aldrich) [27] e às citocinas IL-1β e TNF-α (10 ng/mL cada) [27] durante a noite. A liberação de espécies reativas de oxigênio mitocondriais foi avaliada utilizando o marcador MitoROS™ 580 (AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante.

3.9 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados, no mínimo, em triplicata, sendo cada ponto de dados representativo de experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste t pareado (ratio-paired t-test) para comparações individuais. A análise dos dados foi conduzida no software Prism v9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), considerando-se estatisticamente significativos os valores de nível de significância ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Triagem das Concentrações de TA

Para compreender o impacto do TA na viabilidade de células orais, avaliou-se a capacidade de fibroblastos gengivais e células HSC2 de converter um substrato de tetrazólio em formazana. Nos fibroblastos gengivais, a formação de formazana aumentou progressivamente com concentrações mais elevadas de TA (Figura 4A). Em contrapartida, as células HSC2 apresentaram tendência oposta, com redução da formação de formazana à medida que a concentração de TA aumentou (Figura 4B). A viabilidade celular foi mantida até a concentração de 20 µg/mL de TA para fibroblastos gengivais e células HSC2 (Figuras 4A e 4B). A predominância de coloração verde no ensaio de viabilidade (*life-dead assay*) confirmou adicionalmente que as células permanecem viáveis na concentração de 20 µg/mL de TA (Figuras 4C e 4D).

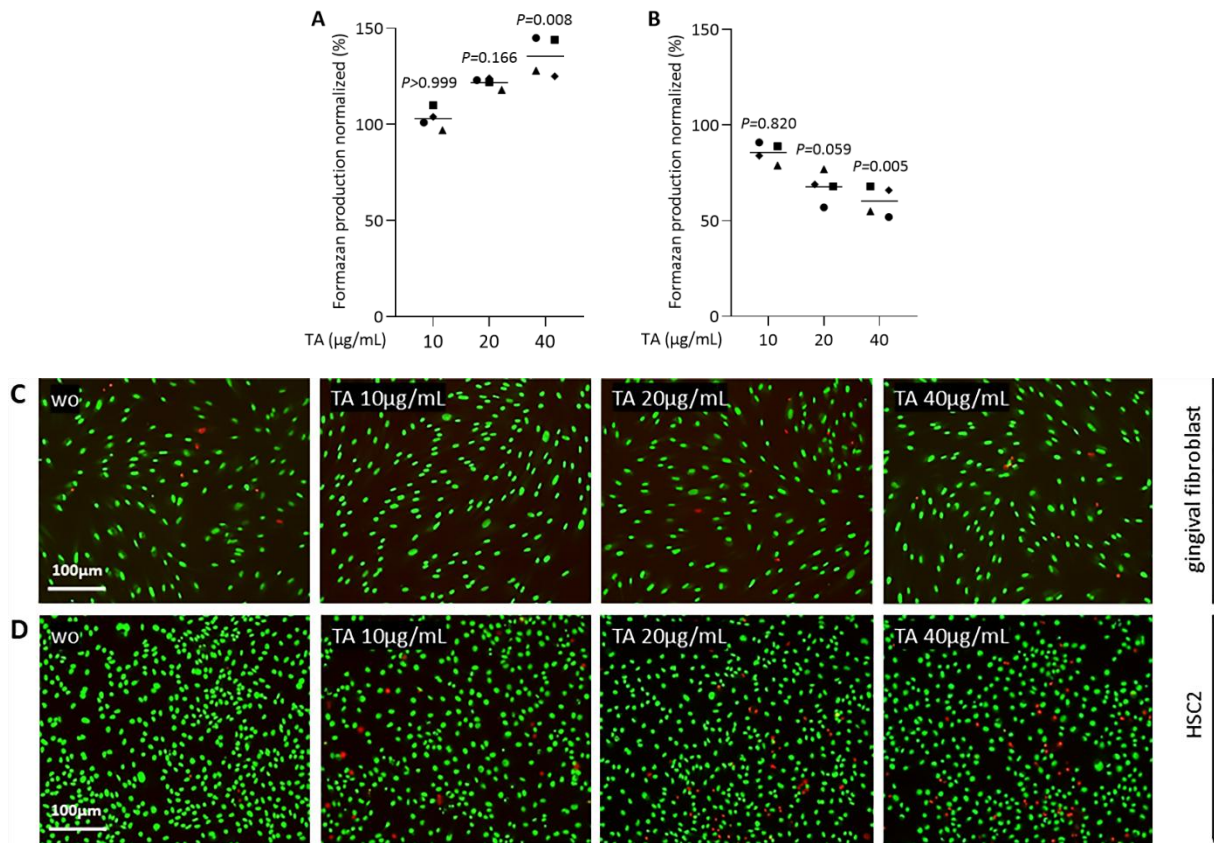


Figura 4. Ensaio de viabilidade celular para triagem de concentrações de ácido tânico em fibroblastos gengivais e HSC2. Células expostas a meio sem soro com diluição seriada de TA (μg/mL) durante a noite. (A e B) A viabilidade foi avaliada pela medição da produção de formazana e expressa como percentual em relação aos controles não estimulados. A análise estatística foi realizada usando o teste t pareado por razão, com os valores de p indicados. (C e D) Imagens representativas da coloração live/dead, em que o verde indica células viáveis e o vermelho células mortas. Os resultados sugerem que a viabilidade celular foi mantida até a concentração de 20 μg/mL de TA para fibroblastos gengivais e células HSC2. Barra de escala: 100 μm.

Fonte: GraphPad Software v9, La Jolla, CA, EUA (2025)

4.2 Ácido Tânico Reduziu as Quimiocinas Induzidas por IL-1β e TNF-α, SLV ou Poly (I:C) HMW em Fibroblastos Gengivais

A atividade anti-inflamatória do TA tem sido relatada em diversos tipos celulares, porém seus efeitos em células orais ainda são pouco explorados [17]. Assim, levantamos a hipótese de que o TA também exerce propriedades anti-

inflamatórias em fibroblastos gengivais quando expostos a diferentes agonistas inflamatórios. Para testar essa hipótese, induzimos uma resposta inflamatória expondo fibroblastos gengivais a IL-1 β e TNF- α , SLV 5% ou poly (I:C) HMW (um agonista do TLR3) [45]. Como esperado, IL-1 β e TNF- α [38], SLV [38] e poly (I:C) HMW provocaram um aumento expressivo na expressão de CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10, CCL2 e CCL4 em fibroblastos gengivais (Figuras 5A, 6A e 7A). Relatamos aqui que o pré-tratamento com TA reduziu significativamente a expressão dessas quimiocinas. A transcrição gênica foi corroborada por um ensaio imunoenzimático que demonstrou redução da proteína CXCL8 em nível translacional para todos os agonistas inflamatórios (Figuras 5B, 6B e 7B). Consistente com o papel estabelecido das vias de sinalização NF- κ B (Figura 8) na expressão de CXCL8 [46,47], a exposição ao TA em combinação com IL-1 β e TNF- α inibe parcialmente a translocação nuclear da subunidade p65 em fibroblastos gengivais [17].

Além disso, o TA reduziu significativamente a expressão de metaloproteinase 1 (MMP1) [47], MMP3 [48] e cicloxigenase-2 (COX2) [17,49-52] quando as células foram expostas a IL-1 β e TNF- α (Figura 9) ou poly (I:C) HMW (Figura 10), ressaltando seu papel proteção contra a degradação da matriz extracelular e o dano tecidual associados a processos inflamatórios crônicos [7,10,53]. Esses resultados enfatizam o potencial do TA em reduzir a inflamação e os danos inflamatórios em fibroblastos gengivais [54-56].

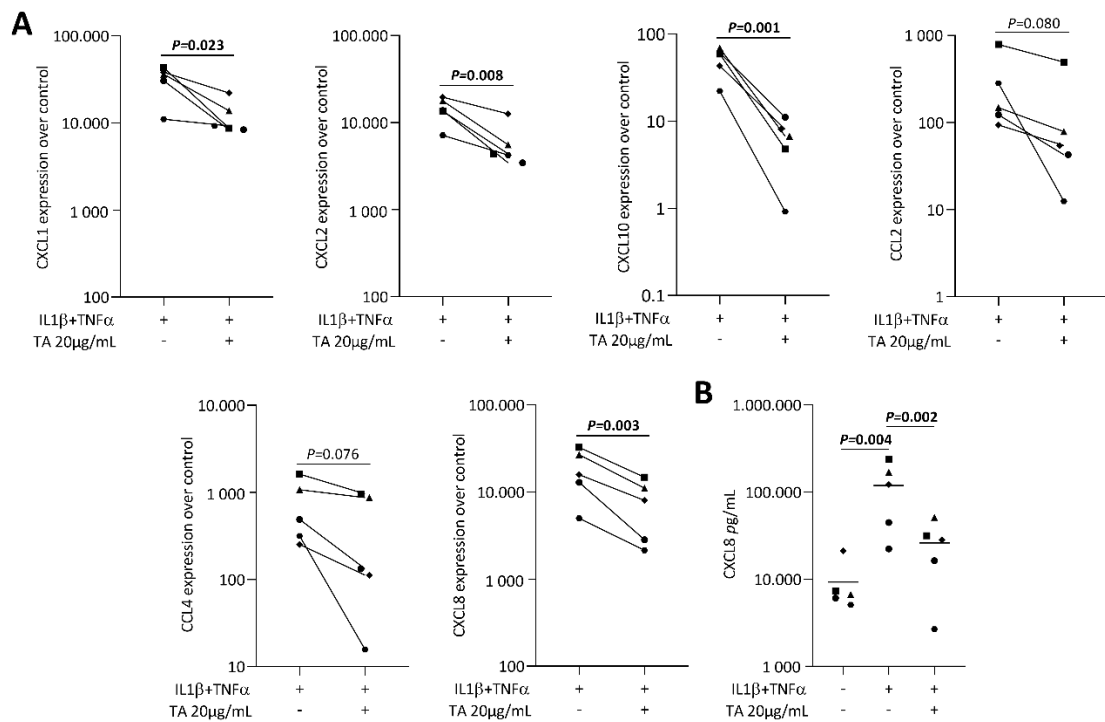


Figura 5. Fibroblastos gengivais foram expostos a IL1- β e TNF- α (10 ng/mL) isoladamente e em combinação com TA (20 μ g/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão nas células não tratadas. (A) A expressão gênica das quimiocinas foi significativamente reduzida pelo TA a 20 μ g/mL, (B) confirmado em nível proteico pelo imunoensaio para CXCL8 (pg/mL). Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes de PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada usando teste t pareado por razão, com os valores de p indicados.

Fonte: GraphPad Software v9, La Jolla, CA, EUA (2025)

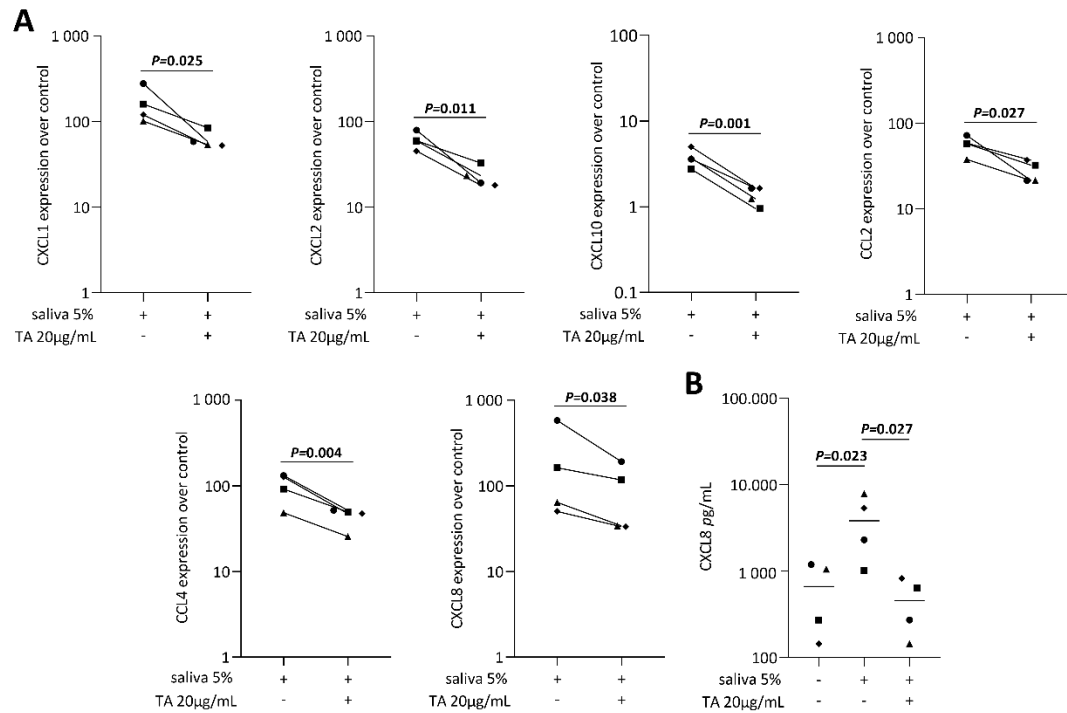


Figura 6. Fibroblastos gengivais foram expostos a saliva a 5% isoladamente e em combinação com TA (20 µg/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão observadas nas células não tratadas. (A) A expressão gênica das quimiocinas foi significativamente reduzida pelo TA a 20 µg/mL, (B) confirmado em nível proteico por imunoenensaio para CXCL8 (pg/mL). Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes de PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando teste t pareado por razão, com os valores de p indicados.

Fonte: GraphPad Software v9, La Jolla, CA, EUA (2025)

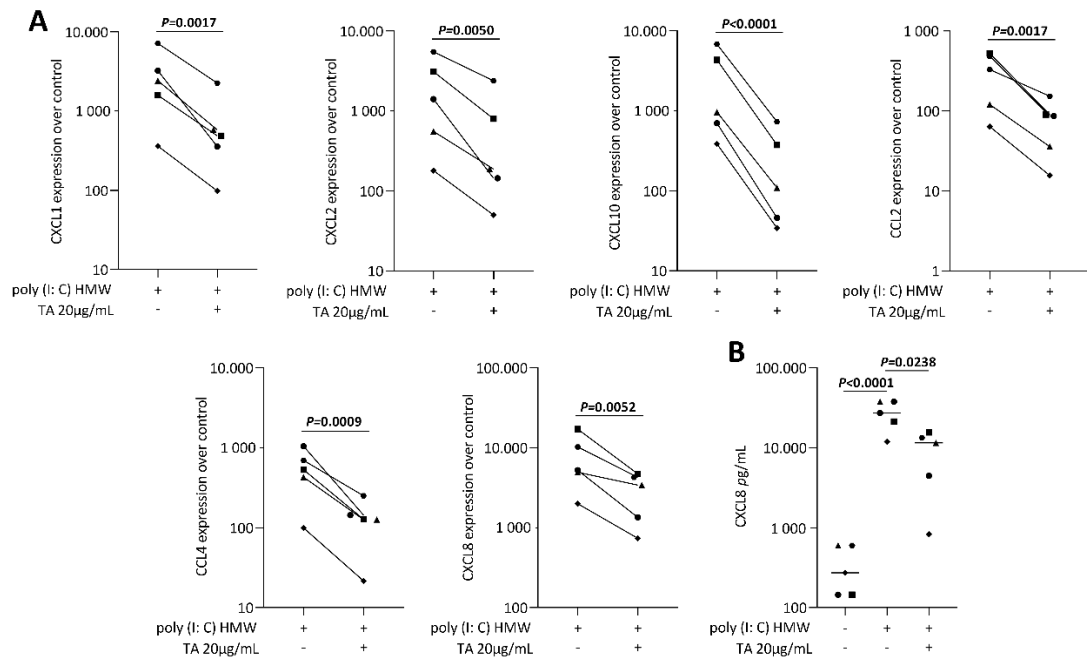


Figura 7. Fibroblastos gengivais foram expostos a poly (I: C) HMW (100 ng/mL) isoladamente e em combinação com TA (20 µg/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão observadas nas células não tratadas. (A) A expressão gênica das quimiocinas foi significativamente reduzida pelo TA a 20 µg/mL, (B) confirmado em nível proteico por imunoenensaio para CXCL8 (pg/mL). Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes de PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando teste t pareado por razão, com os valores de p indicados.

Fonte: GraphPad Software v9, La Jolla, CA, EUA (2025)

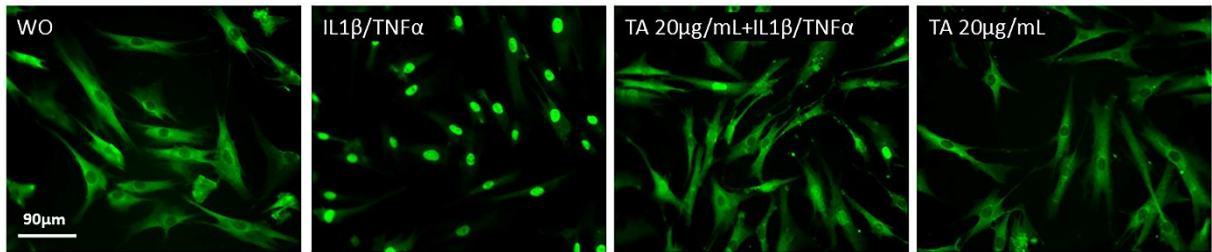


Figura 8. Imunofluorescência para NF-κB-p65. O ácido tânico, em combinação com IL-1β e TNF-α (10 ng/mL), inibe parcialmente a translocação nuclear da p65 em fibroblastos orais. Fibroblastos gengivais não tratados (wo; sem tratamento), expostos apenas a IL-1β e TNF-α, ou tratados com TA em combinação com IL-1β e TNF-α por 1 hora. Uma marcação nuclear fraca de p65 foi observada nas células tratadas com 20 μg/mL de TA junto com IL-1β e TNF-α, em comparação com a acumulação significativa de p65 no núcleo em resposta apenas a IL-1β e TNF-α. A barra de escala representa 90 μm.

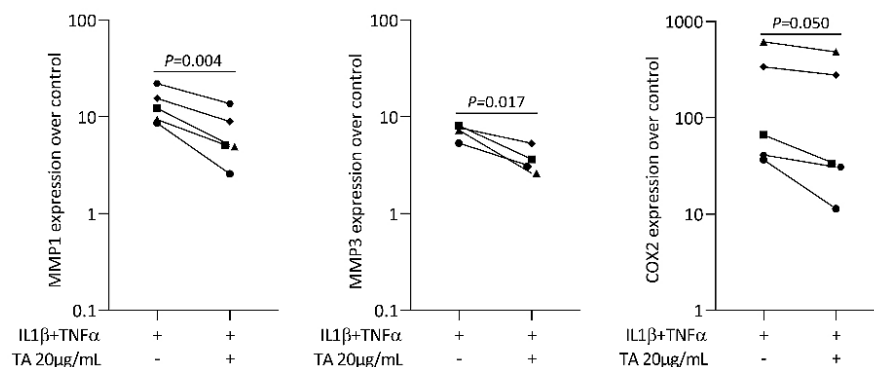


Figura 9. Fibroblastos gengivais foram expostos a IL-1β e TNF-α (10 ng/mL) isoladamente e em combinação com TA (20 μg/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão nas células não tratadas. A expressão gênica de quimiocinas foi significativamente reduzida pela concentração de 20 μg/mL de TA. Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado de razão, e os valores de p estão indicados.

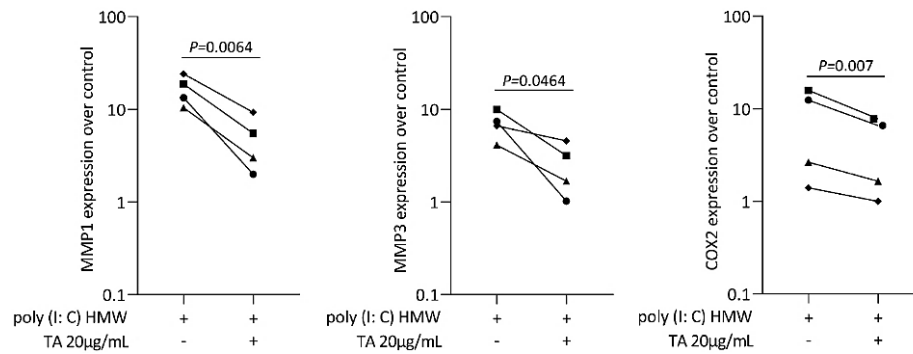


Figura 10. Fibroblastos gengivais foram expostos a poly (I:C) HMW (100 ng/mL) isoladamente e em combinação com TA (20 µg/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão nas células não tratadas. A expressão gênica de quimiocinas foi significativamente reduzida pela concentração de 20 µg/mL de TA. Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado de razão, e os valores de p estão indicados.

Fonte: GraphPad Software v9, La Jolla, CA, EUA (2025)

4.3 Ácido Tânico Reduziu as Quimiocinas Induzidas por IL-1 β e TNF- α em Células HSC2

Para fornecer evidências diretas da atividade anti-inflamatória do TA em células orais, realizamos experimentos adicionais em células HSC2. Conforme esperado, o pré-tratamento com TA reduziu significativamente a expressão de CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10 e CCL2 em resposta à estimulação com IL-1 β e TNF- α (Figura 11A). De forma consistente, o ensaio imunológico demonstrou uma diminuição nos níveis de CXCL8 ao nível proteico (Figura 11B). Em conjunto, esses resultados destacam o papel do TA na redução da inflamação em células orais.

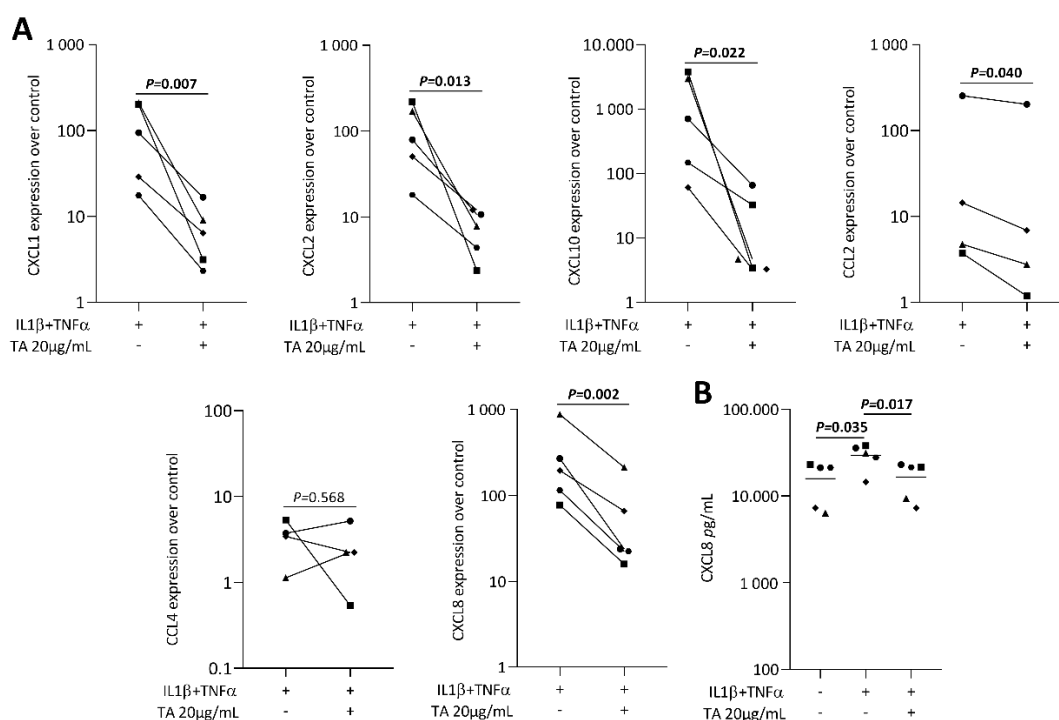


Figura 11. Células HSC2 foram expostas a IL-1 β e TNF- α (10 ng/mL) isoladamente e em combinação com TA (20 μ g/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão nas células não tratadas. (A) A expressão gênica de quimiocinas foi significativamente reduzida por 20 μ g/mL de TA, (B) confirmado ao nível proteico pelo ensaio imunológico para CXCL8 em pg/mL. Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes de PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado de razão, e os valores de p estão indicados.

Fonte: GraphPad Software v9, La Jolla, CA, EUA (2025)

4.4 Ácido Tânico Inibe a Fosforilação de ERK, JNK e p65 em Fibroblastos Gingivais Induzidos por IL-1 β e TNF- α

Em seguida, analisamos mais detalhadamente as vias de sinalização MAPK e NF- κ B em fibroblastos gengivais para investigar os mecanismos subjacentes aos efeitos anti-inflamatórios do TA [25,56]. Como podemos observar na Figura 12, IL-1 β e TNF- α aumentaram significativamente a fosforilação de ERK, JNK, p38 e p65, enquanto o TA isoladamente não teve efeito. No entanto, o tratamento com TA levou a uma redução significativa na fosforilação de ERK e JNK [25], com redução parcial

da fosforilação de p38 [27,57] e p65 [27,58]. Esses achados sugerem que o TA atua por meio de um mecanismo amplo, modulando várias vias de sinalização, incluindo MAPK e NF-κB [17], regulando a fosforilação de proteínas-chave na resposta inflamatória em fibroblastos gengivais.

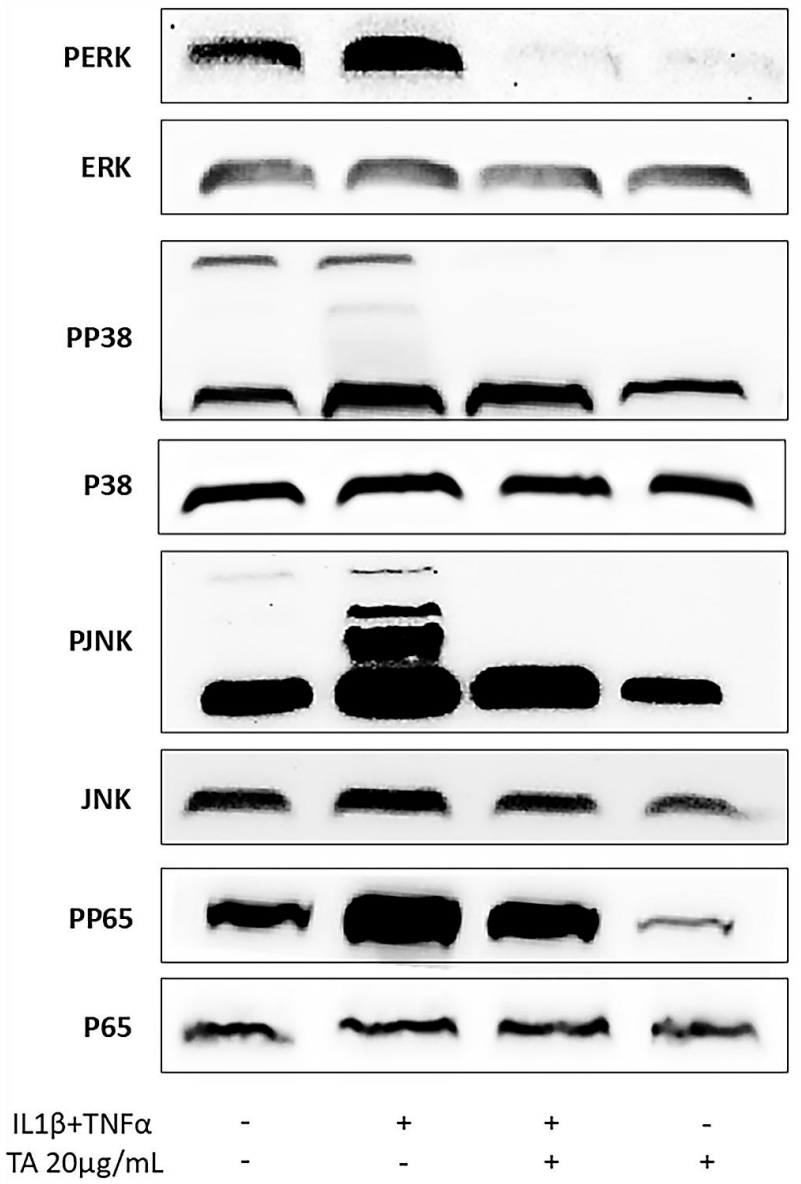


Figura 12. O efeito do TA (20 µg/mL) na fosforilação das moléculas de sinalização em fibroblastos gengivais estimulados por IL-1β e TNF-α (10 ng/mL). Lisados celulares foram analisados por Western Blot para medir os níveis tanto fosforilados quanto totais da quinase regulada por sinal extracelular (ERK), da quinase N-terminal c-Jun (JNK), do p38 e da p65.

4.5 Ácido Tânico Reduz Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) Induzidas por H₂O₂, IL-1 β e TNF- α em Fibroblastos Gengivais

A geração excessiva de ROS durante a fase inflamatória, estimulada por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , é um dos principais mecanismos de dano tecidual [54,55,59]. Considerando a importância de controlar essas ROS, avaliamos sua produção mitocondrial em fibroblastos gengivais expostos a H₂O₂ [54,55,60] e à IL-1 β e TNF- α [53,61-63]. O tratamento com TA reduziu significativamente os níveis de ROS, aproximando-os dos valores do grupo controle não tratado (Figura 13A e B). Esses resultados destacam o efeito antioxidante do TA e seu potencial como agente terapêutico para minimizar danos oxidativos em fibroblastos gengivais [56].

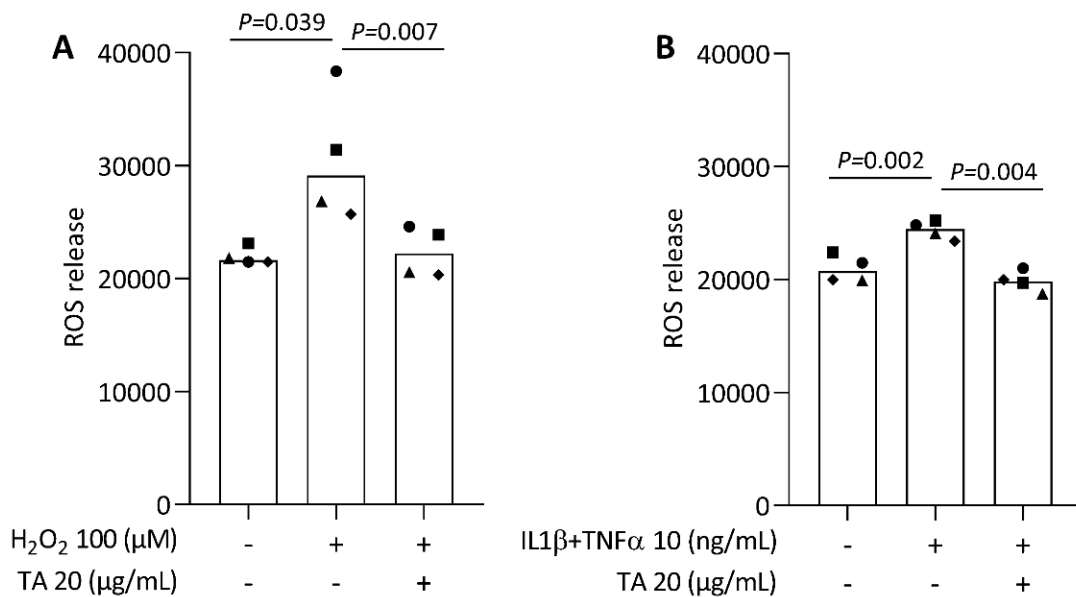


Figura 13. Capacidade do TA (20 μ g/mL) em reduzir as espécies reativas de oxigênio em fibroblastos gengivais expostos a H₂O₂, IL-1 β e TNF- α . Fibroblastos gengivais foram expostos a (A) H₂O₂ (100 μ M) e (B) IL-1 β e TNF- α (10 ng/mL) para induzir a liberação de ROS. Em (A) e (B), o tratamento com TA (20 μ g/mL) reduziu significativamente a liberação de ROS a níveis comparáveis ao controle não tratado. Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado, e os valores de *p* estão indicados.

4.6 Liberação Sustentada de Ácido Tânico a Partir do Hidrogel Gellan Gum (GGTA)

Devido à sua abundância de grupos fenólicos hidroxila, o TA, um polifenol derivado de plantas, pode formar uma variedade de hidrogéis sintetizados fisicamente em sistema *one-pot* — em um único recipiente — em combinação com diferentes polímeros [34]. Estudos anteriores demonstraram a incorporação bem-sucedida do TA em hidrogéis e cápsulas à base de ácido hialurônico [55]. Com base nessas evidências, investigamos o potencial do GG como veículo para administração tópica, avaliando sua capacidade de modular a liberação de TA em PBS a 37 °C. O TA apresentou um perfil de liberação sustentada, com um aumento gradual e cumulativo antes de alcançar estabilidade em 72 horas (Figura 14), especialmente nas formulações GG+TA nas concentrações de 1330 µg/mL e 4000 µg/mL. Esses resultados destacam uma estratégia promissora, posicionando o GG+TA como uma opção terapêutica potencial para o tratamento localizado de distúrbios orais em odontologia e medicina oral.

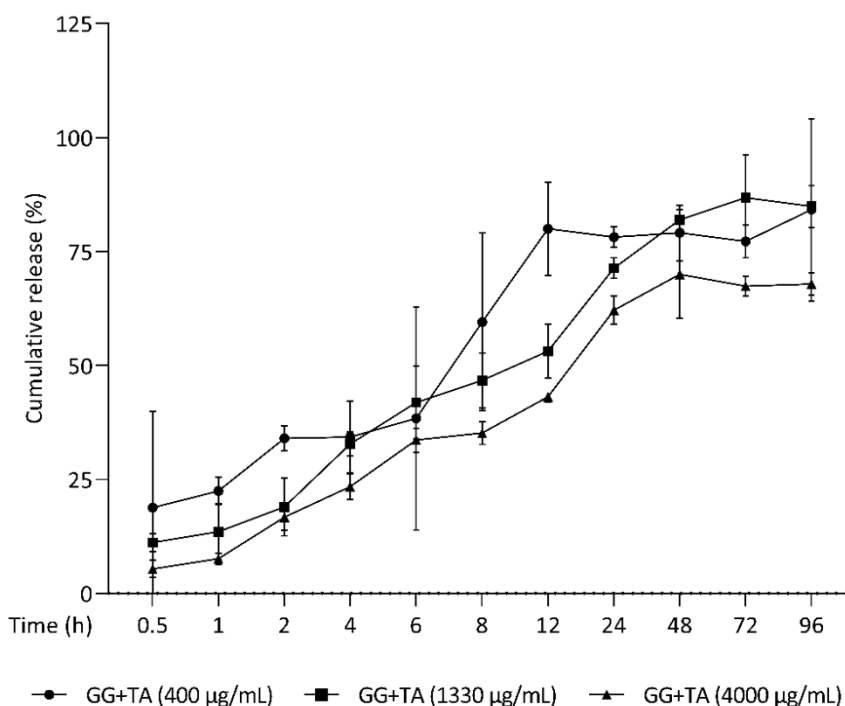


Figura 14. Perfil de liberação do TA em diferentes concentrações de 400, 1330 e 4000 µg/mL a partir do hidrogel GG (10 mg/mL). A cinética de liberação sustentada a longo prazo foi monitorada de 0,5 a 96 horas. Cada ponto de dado no perfil de liberação representa o valor médio $\pm$ desvio padrão, obtido a partir de experimentos independentes em triplicata.

Fonte: GraphPad Software v9, La Jolla, CA, EUA (2025)

4.7 Ácido Tânico Carregado em Gellan Gum Reduziu Quimiocinas Induzidas por IL-1 β e TNF- α ou SLV em Fibroblastos Gengivais

Para investigar mais a liberação do TA carregado no hidrogel GG, foi realizado um bioensaio de cocultura utilizando fibroblastos gengivais e células orais HSC2 [38]. O ensaio de coloração live/dead confirmou a biocompatibilidade do hidrogel GG carregado com TA no modelo celular de fibroblastos gengivais (Figura 15A). Para as células orais HSC2, os resultados foram consistentes com achados anteriores, demonstrando que concentrações mais baixas de TA são seguras (Figura 15B). Notavelmente, a presença do hidrogel GG sozinho pareceu afetar a viabilidade celular, conforme indicado pela coloração live/dead (Figuras 15A e 15B). Posteriormente, observamos que o pré-tratamento com GG+TA (1330 µg/mL) reduziu

significativamente a expressão de quimiocinas em fibroblastos gengivais estimulados por IL-1 β , TNF- α e SLV 5% (Figuras 16A e 17A). Notavelmente, o pré-tratamento com TA reduziu efetivamente a expressão de CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL2, CCL4 e CXCL8 em células expostas a IL-1 β e TNF- α (Figura 15A), assim como CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL2, CCL4 e CXCL8 em resposta ao SLV 5% (Figura 16A). A transcrição gênica foi corroborada por um ensaio imunológico que mostrou redução de CXCL8 ao nível translacional para todos os agonistas inflamatórios (Figuras 15B e 16B).

Com base nos resultados positivos observados, este modelo apoia o potencial do TA, isoladamente ou incorporado no GG, como uma abordagem promissora para futuros tratamentos tópicos de doenças inflamatórias na cavidade oral.

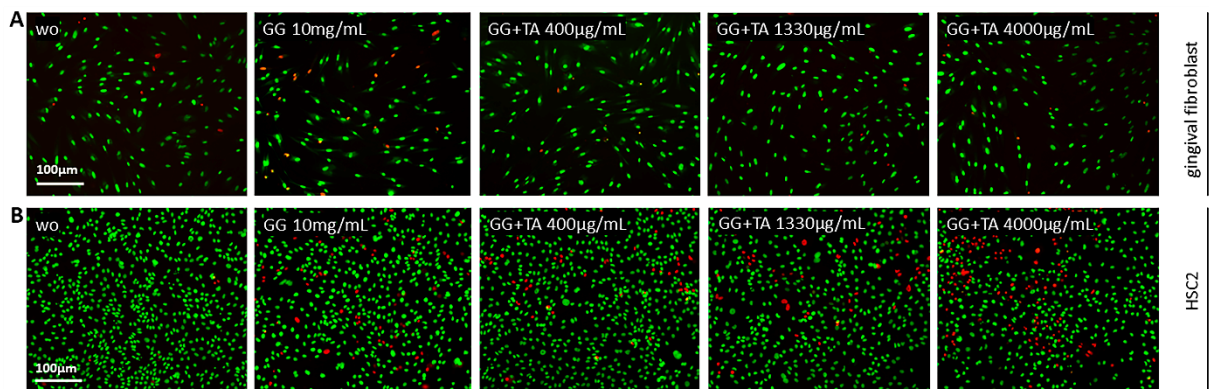


Figura 15. Ensaio de viabilidade celular para triagem de concentração de GGTA em fibroblastos gengivais e células HSC2 expostos a GGTA. Imagens representativas da coloração live/dead mostram células viáveis em verde e células mortas em vermelho. “WO” indica células não tratadas, enquanto “GG” representa células tratadas com GG (10 mg/mL) sem TA. As barras de escala representam 100 μ m.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

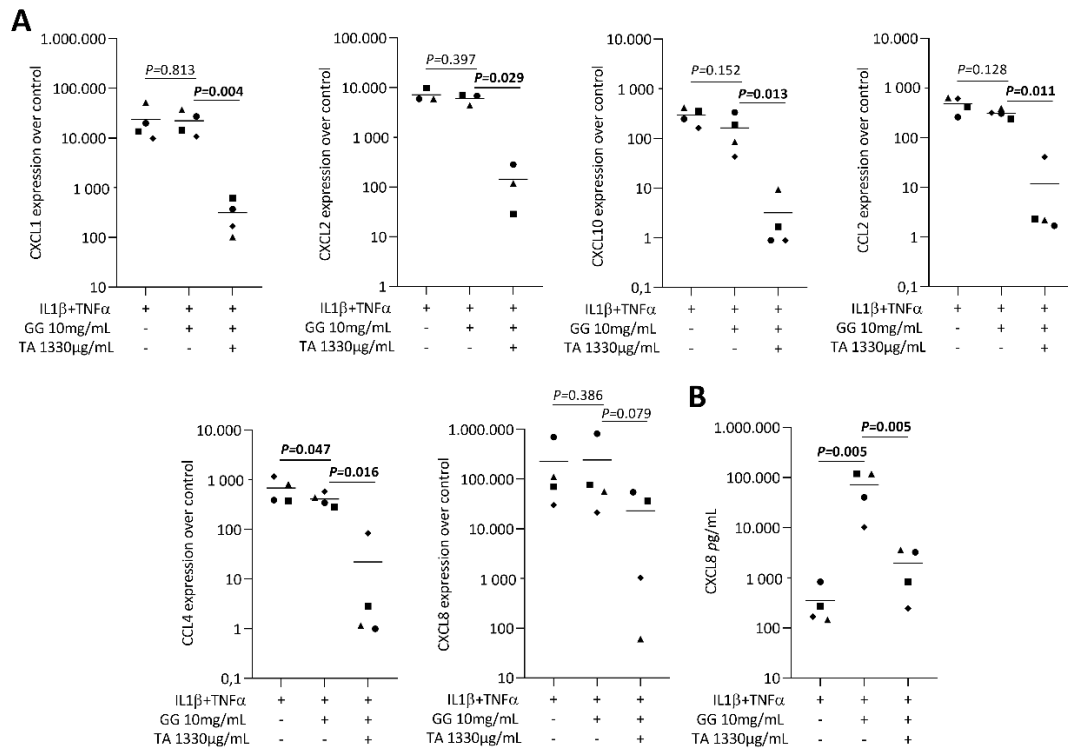


Figura 16. Fibroblastos gengivais foram expostos a IL-1 β e TNF- α (10 ng/mL) isoladamente e em combinação com GGTA (1330 μ g/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão das células não tratadas. (A) A expressão gênica das quimiocinas foi significativamente reduzida pelo GGTA 1330 μ g/mL, (B) resultado confirmado no nível proteico por imunoensaio para CXCL8 (pg/mL). Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes para PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado por razão (ratio-paired t-test), e os valores de p são apresentados.

Fonte: GraphPad Software v9, La Jolla, CA, EUA (2025)

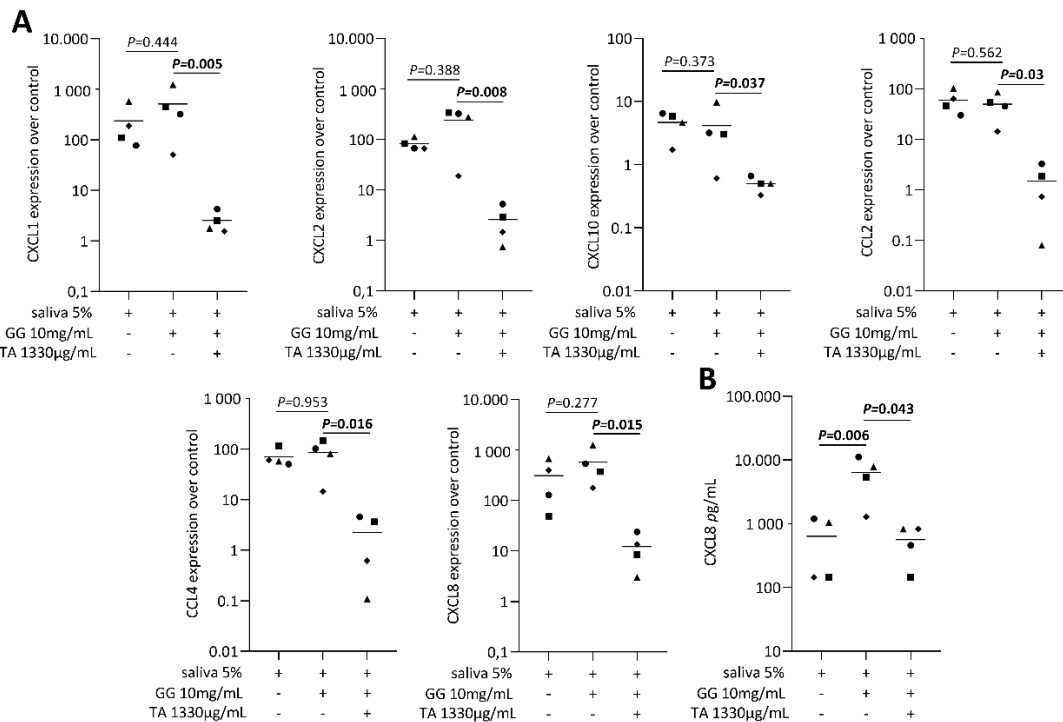


Figura 17. Fibroblastos gengivais foram expostos a saliva a 5% isoladamente e em combinação com GGTA (1330 µg/mL). Os resultados foram normalizados em relação às alterações de expressão das células não tratadas. (A) A expressão gênica das quimiocinas foi significativamente reduzida pelo GG+TA na concentração de 1330 µg/mL, (B) o que foi confirmado no nível proteico por meio de imunoenensaio para CXCL8 (pg/mL). Diferentes formatos de símbolos representam experimentos independentes de PCR e ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t pareado por razão (ratio-paired t-test), e os valores de p estão indicados.

Fonte: GraphPad Software v9, La Jolla, CA, EUA (2025)

5 DISCUSSÃO

A periodontite e a peri-implantite são patologias orais de ampla prevalência mundial, caracterizadas por inflamação crônica e destruição catabólica dos tecidos envolvidos [1]. Além das medidas preventivas, quando a doença progride para mucosite, torna-se necessário intervir terapêuticamente para restaurar a saúde tecidual ou, ao menos, impedir a progressão da inflamação para estágios irreversíveis da periodontite e peri-implantite. As terapias convencionais visam principalmente a redução da causa da inflamação crônica, que é o acúmulo de biofilme e a liberação de fatores de virulência que desencadeiam a resposta inflamatória [10-12]. Contudo, há demanda por soluções econômicas e de fácil aplicação que complementem os tratamentos convencionais e atuem também como medidas profiláticas. No caso da mucosite, tais abordagens poderiam contribuir para a atenuação da resposta inflamatória, favorecendo a resolução da doença oral. Nesse contexto, o ácido tânico destaca-se como uma alternativa promissora e acessível, reconhecida pela FDA para aplicações biomédicas [17]. Entretanto, sua utilização na odontologia ainda está em estágio inicial, e seus efeitos sobre as células orais permanecem pouco esclarecidos. Nosso estudo é relevante por demonstrar que o ácido tânico, um composto natural de baixa toxicidade, reduz de forma eficaz a resposta inflamatória induzida em fibroblastos gengivais e na linha celular epitelial oral HSC2. Além disso, elucidamos os mecanismos de sinalização envolvidos, com ênfase nas vias MAPK e NF- κ B.

Relacionar nossos achados com estudos anteriores requer reconhecer, além dos diversos modelos pré-clínicos [25,42,43], que os bioensaios in vitro apoiam o potencial do TA em reduzir a resposta inflamatória. Por exemplo, o TA foi capaz de diminuir a expressão das citocinas IL6, IL-1 β e TNF- α em células microgлияis BV2 [20], condrócitos humanos de osteoartrite [24], em modelos murinos de úlceras [22] e a expressão de IL-1 β em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) [23]. Mecanicamente, essa atividade anti-inflamatória está associada à inibição das vias MAPK e NF- κ B pelo TA [17,20,23,24]. Com base nesses resultados consistentes, nossa pesquisa contribui para essa linha de investigação ao demonstrar que, em uma faixa de concentrações semelhante, o TA reduz a expressão de CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10 e CCL4 sem afetar a viabilidade celular em fibroblastos gengivais primários e células HSC2. Além disso, revelamos que o TA diminui a fosforilação de ERK, JNK e p65 em fibroblastos gengivais. Também observamos uma redução

significativa na translocação nuclear de p65 em fibroblastos gengivais expostos a IL-1 β +TNF- α , refletindo achados anteriores em macrófagos derivados da medula óssea expostos a LPS [23]. Considerando esses dados e apoiando pesquisas prévias com TA liberado a partir de hidrogéis de GG [25,26] e de alginato de sódio modificado [42,43,59], demonstramos que o hidrogel carregado com TA reduziu efetivamente a expressão induzida de CXCL1, CXCL2, CXCL8 e CCL2 em fibroblastos gengivais, indicando que o TA permanece bioativo após a liberação a partir da matriz do hidrogel.

Embora as implicações clínicas de nossos achados ainda sejam especulativas, os resultados fornecem uma base sólida para a transição das observações *in vitro* para investigações pré-clínicas. Considerando que a expressão de quimiocinas por fibroblastos gengivais e células HSC2 desempenha um papel patológico central na periodontite [11] e na peri-implantite [23], e que o TA atenua eficazmente essa resposta, nossos dados sustentam seu potencial para tradução clínica — hipótese que requer validação em modelos pré-clínicos relevantes. Destaca-se que complexos de TA com íons gálio, combinados com partículas de polidopamina e incorporados ao hidrogel gellan gum, já foram aplicados com sucesso em modelos de cicatrização de feridas [42]. De forma semelhante, microcápsulas de alginato de prata revestidas com TA e incorporadas em hidrogéis de GG demonstraram eficácia em modelos de periodontite [314] — ressaltando as ações sinérgicas do TA, incluindo a redução da inflamação vascular, o sequestro de ROS, efeitos antibacterianos e a mitigação do dano tecidual. Considerando ainda nossos resultados, especulamos que o TA, isoladamente ou carregado em hidrogel GG, possa atuar como agente anti-inflamatório local em enxaguantes bucais ou cremes dentais ou, em concentrações mais elevadas, ser aplicado em defeitos periodontais e peri-implantares após terapias convencionais. Além disso, pode apresentar potencial como revestimento para implantes dentários, visando modular a inflamação e promover a cicatrização — ampliando suas possíveis aplicações no campo da odontologia.

Apesar dos resultados positivos, que fornecem importantes insights sobre o potencial de sistemas de liberação contendo TA, como o hidrogel gellan gum, para estratégias terapêuticas tópicas no manejo de condições inflamatórias na cavidade oral, é importante reconhecer que nossa investigação se restringiu a um bioensaio *in vitro* — um estudo de prova de conceito focado na resposta celular de células orais. Nesse contexto, o ambiente inflamatório foi simulado utilizando citocinas pró-

inflamatórias clássicas, IL-1 β e TNF- α [38], saliva [60], e poly (I:C) HMW, um agonista do TLR3 [44] — todas mecanicamente implicadas na indução da expressão de quimiocinas em fibroblastos gengivais e, em certa medida, em células epiteliais in vitro. Outra limitação do desenho experimental foi que o hidrogel foi aplicado apenas na borda da placa de cultura, cobrindo uma área limitada. Esse formato permitiu a formação de um gradiente de difusão do TA, com células ao redor, não cobertas diretamente, respondendo ao composto liberado, enquanto aquelas localizadas sob o hidrogel podem ter experimentado diferentes níveis de exposição.

Além disso, as limitações intrínsecas aos modelos in vitro devem ser consideradas, particularmente a ausência de células do sistema imunológico, componentes vasculares e a complexidade tecidual global, que influenciam significativamente as respostas farmacológicas in vivo. Para avançar com esses achados, estudos futuros devem utilizar modelos pré-clínicos de periodontite, como os induzidos por LPS de *Porphyromonas gingivalis* ou pela colocação de ligaduras em torno do primeiro molar superior em roedores. Esses modelos reproduzem eficazmente a inflamação crônica e a destruição tecidual observadas na doença periodontal humana. Adicionalmente, abordagens ômicas, como RNA-seq, podem ajudar a revelar efeitos transcriptômicos mais amplos e elucidar os mecanismos específicos de sinalização regulados pelo TA. Mais pesquisas são necessárias para traduzir esses achados em aplicações clínicas na periodontologia e implantodontia, especialmente por meio da administração local de TA via sistemas à base de hidrogel em defeitos periodontais e peri-implantares. Vale destacar que o TA já está disponível comercialmente em combinação com salicilato de colina e cetrimida (Arlak Biotech, Zirakpur, Índia) e, no futuro, poderá ser incorporado a formulações de enxaguantes bucais ou cremes dentais — reforçando ainda mais a relevância clínica dos nossos achados in vitro.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o TA, seja isoladamente ou liberado a partir de um hidrogel, demonstra um forte potencial anti-inflamatório ao modular a expressão de quimiocinas e inibir as vias de sinalização MAPK-NF κ B em fibroblastos gengivais e células carcinoma espinocelular oral HSC2 expostas a diferentes agonistas. Sustentando o potencial dos hidrogéis carregados com TA para investigações futuras em modelos pré-clínicos de inflamação crônica.

REFERÊNCIAS

1. Scannapieco, F.A.; Cantos, A. Oral Inflammation and Infection, and Chronic Medical Diseases: Implications for the Elderly. *Periodontol. 2000* **2016**, *72*, 153–175. <https://doi.org/10.1111/prd.12129>
2. Kinane, D.F.; Stathopoulou, P.G.; Papapanou, P.N. Periodontal Diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
3. Shen, L.; Hu, J.; Yuan, Y.; Wang, X.; Jiang, Q. Photothermal-Promoted Multi-Functional Gallic Acid Grafted Chitosan Hydrogel Containing Tannic Acid Miniaturized Particles for Peri-Implantitis. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *253*, 127366. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127366>
4. Shang, J.; Liu, H.; Zheng, Y.; Zhang, Z. Role of Oxidative Stress in the Relationship between Periodontitis and Systemic Diseases. *Front. Physiol.* **2023**, *14*, 1210449. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1210449>
5. Renvert, S.; Persson, G.R.; Piri, F.Q.; Camargo, P.M. Peri-Implant Health, Peri-Implant Mucositis, and Peri-Implantitis: Case Definitions and Diagnostic Considerations. *J. Periodontol.* **2018**, *89* (Suppl. 1), S304–S312. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0588>
6. Fürst, M.M.; Salvi, G.E.; Lang, N.P.; Persson, G.R. Bacterial Colonization Immediately after Installation on Oral Titanium Implants. *Clin. Oral Implant. Res.* **2007**, *18*, 501–508. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01381.x>
7. Belibasakis, G.N.; Manoil, D. Microbial Community-Driven Etiopathogenesis of Peri-Implantitis. *J. Dent. Res.* **2021**, *100*, 21–28. <https://doi.org/10.1177/0022034520949851>
8. Renvert, S.; Roos-Jansåker, A.-M.; Claffey, N. Non-Surgical Treatment of Peri-Implant Mucositis and Peri-Implantitis: A Literature Review. *J. Clin. Periodontol.* **2008**, *35*, 305–315. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01276.x>
9. Li, D.; Tan, X.; Zheng, L.; Tang, H.; Hu, S.; Zhai, Q.; Jing, X.; Liang, P.; Zhang, Y.; He, Q.; et al. A Dual-Antioxidative Coating on Transmucosal Component of Implant to Repair Connective Tissue Barrier for Treatment of Peri-Implantitis. *Adv. Healthc. Mater.* **2023**, *12*, e2301733. <https://doi.org/10.1002/adhm.202301733>

10. Williams, D.W.; Greenwell-Wild, T.; Brenchley, L.; Dutzan, N.; Overmiller, A.; Sawaya, A.P.; Webb, S.; Martin, D.; NIDCD/NIDCR Genomics and Computational Biology Core; Hajishengallis, G.; et al. Human Oral Mucosa Cell Atlas Reveals a Stromal-Neutrophil Axis Regulating Tissue Immunity. *Cell* **2021**, *184*, 4090-4104.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.013>
11. Li, J.; Ye, L.J.; Dai, Y.W.; Wang, H.W.; Gao, J.; Shen, Y.H.; Wang, F.; Dai, Q.G.; Wu, Y.Q. Single-Cell Analysis Reveals a Unique Microenvironment in Peri-Implantitis. *J. Clin. Periodontol.* **2024**, *51*, 1665-1676. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13982>
12. Easter, Q.T.; Fernandes Matuck, B.; Beldorati Stark, G.; Worth, C.L.; Predeus, A.V.; Fremin, B.; Huynh, K.; Ranganathan, V.; Ren, Z.; Pereira, D.; et al. Single-Cell and Spatially Resolved Interactomics of Tooth-Associated Keratinocytes in Periodontitis. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 5016. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49037-y>
13. Jiang, W.; Xu, T.; Song, Z.; Wang, X.; Yuan, S.; Li, Q.; Wei, Y.; Wang, C.; Yang, G.; Cao, J.; et al. CCL2 Is a Key Regulator and Therapeutic Target for Periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **2023**, *50*, 1644–1657. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13872>
14. Alassy, H.; Parachuru, P.; Wolff, L. Peri-Implantitis Diagnosis and Prognosis Using Biomarkers in Peri-Implant Crevicular Fluid: A Narrative Review. *Diagnostics* **2019**, *9*, 214. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9040214>
15. Aleksandrowicz, P.; Brzezińska-Błaszczyk, E.; Kozłowska, E.; Żelechowska, P.; Borgonovo, A.E.; Agier, J. Analysis of IL-1 β , CXCL8, and TNF- α Levels in the Crevicular Fluid of Patients with Periodontitis or Healthy Implants. *BMC Oral Health* **2021**, *21*, 120. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01478-3>
16. Gonzáles, J.R.; Herrmann, J.M.; Boedeker, R.H.; Francz, P.I.; Biesalski, H.; Meyle, J. Concentration of Interleukin-1 β and Neutrophil Elastase Activity in Gingival Crevicular Fluid during Experimental Gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* **2001**, *28*, 544–549. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028006544.x>
17. Jing, W.; Xiaolan, C.; Yu, C.; Feng, Q.; Haifeng, Y. Pharmacological Effects and Mechanisms of Tannic Acid. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *154*, 113561. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113561>

18. Mohammadzadeh, V.; Mahmoudi, E.; Ramezani, S.; Navaeian, M.; Taheri, R.A.; Ghorbani, M. Design of a Novel Tannic Acid Enriched Hemostatic Wound Dressing Based on Electrospun Polyamide-6/Hydroxyethyl Cellulose Nanofibers. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2023**, *86*, 104625. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104625>
19. Wekwejt, M.; Małek, M.; Ronowska, A.; Michno, A.; Pałubicka, A.; Zasada, L.; Klimek, A.; Kaczmarek-Szczepańska, B. Hyaluronic Acid/Tannic Acid Films for Wound Healing Application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *254*, 128101. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128101>
20. Wu, Y.; Zhong, L.; Yu, Z.; Qi, J. Anti-Neuroinflammatory Effects of Tannic Acid against Lipopolysaccharide-Induced BV2 Microglial Cells via Inhibition of NF-κB Activation. *Drug Dev. Res.* **2019**, *80*, 262–268. <https://doi.org/10.1002/ddr.21490>
21. Xu, J.; Li, Y.; Chen, Y.; Wang, L.; Liao, M. Preparation and Characterization of a Novel Polysialic Acid/Gelatin Composite Hydrogels Cross-Linked by Tannic Acid to Improve Wound Healing after Cesarean Section Dressing. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2021**, *32*, 1927–1943. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1950961>
22. de Veras, B.O.; da Silva, M.V.; Cabral Ribeiro, P.P. Tannic Acid Is a Gastroprotective That Regulates Inflammation and Oxidative Stress. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *156*, 112482. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112482>
23. Song, D.; Zhao, J.; Deng, W.; Liao, Y.; Hong, X.; Hou, J. Tannic Acid Inhibits NLRP3 Inflammasome-Mediated IL-1β Production via Blocking NF-κB Signaling in Macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *503*, 3078–3085. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.096>
24. Lee, H.-R.; Jeong, Y.-J.; Lee, J.-W.; Jhun, J.; Na, H.S.; Cho, K.-H.; Kim, S.J.; Cho, M.-L.; Heo, T.-H. Tannic Acid, an IL-1β-Direct Binding Compound, Ameliorates IL-1β-Induced Inflammation and Cartilage Degradation by Hindering IL-1β-IL-1R1 Interaction. *PLoS One* **2023**, *18*, e0281834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281834>
25. Chen, Y.; Tian, L.; Yang, F.; Tong, W.; Jia, R.; Zou, Y.; Yin, L.; Li, L.; He, C.; Liang, X.; et al. Tannic Acid Accelerates Cutaneous Wound Healing in Rats Via Activation of the ERK 1/2 Signaling Pathways. *Adv. Wound Care* **2019**, *8*, 341–354. <https://doi.org/10.1089/wound.2018.0853>

26. Sivanantham, A.; Pattarayan, D.; Rajasekar, N.; Kannan, A.; Loganathan, L.; Bethunaickan, R.; Mahapatra, S.K.; Palanichamy, R.; Muthusamy, K.; Rajasekaran, S. Tannic Acid Prevents Macrophage-Induced pro-Fibrotic Response in Lung Epithelial Cells via Suppressing TLR4-Mediated Macrophage Polarization. *Inflamm. Res.* **2019**, *68*, 1011–1024. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01282-4>
27. Tsai, K.-F.; Shen, C.-J.; Cheung, C.-W.; Wang, T.-L.; Chow, L.W.C.; Leung, Y.-M.; Wong, K.-L. Lipotoxicity in Human Lung Alveolar Type 2 A549 Cells: Mechanisms and Protection by Tannic Acid. *Chin. J. Physiol.* **2021**, *64*, 289–297. https://doi.org/10.4103/cjp.cjp_68_21
28. Liu, Y.; Zhu, M.; Ou, J.; Li, K.; Ju, X.; Tian, Y.; Niu, Z. Multi-Responsive Sodium Hyaluronate/Tannic Acid Hydrogels with ROS Scavenging Ability Promote the Healing of Diabetic Wounds. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *278*, 134896. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134896>
29. Qin, J.; Li, Z.; Feng, Y.; Guo, Y.; Zhao, Z.; Sun, S.; Zheng, J.; Zhang, M.; Zhang, J.; Zhang, Y.; et al. Reactive Oxygen Species-Scavenging Mesoporous Poly(Tannic Acid) Nanospheres Alleviate Acute Kidney Injury by Inhibiting Ferroptosis. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2024**, *10*, 5856–5868. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c00844>
30. Yeo, J.; Lee, J.; Yoon, S.; Kim, W.J. Tannic Acid-Based Nanogel as an Efficient Anti-Inflammatory Agent. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 1148–1159. <https://doi.org/10.1039/c9bm01384a>
31. Lengert, E.V.; Savkina, A.A.; Ermakov, A.V.; Saveleva, M.S.; Lagutina, D.D.; Stepanova, T.V.; Ivanov, A.N. Influence of the New Formulation Based on Silver Alginate Microcapsules Loaded with Tannic Acid on the Microcirculation of the Experimental Periodontitis in Rats. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2021**, *126*, 112144. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112144>
32. Chen, C.; Yang, H.; Yang, X.; Ma, Q. Tannic Acid: A Crosslinker Leading to Versatile Functional Polymeric Networks: A Review. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 7689–7711. <https://doi.org/10.1039/d1ra07657d>
33. Baldwin, A.; Booth, B.W. Biomedical Applications of Tannic Acid. *J. Biomater. Appl.* **2022**, *36*, 1503–1523. <https://doi.org/10.1177/08853282211058099>

34. Jafari, H.; Ghaffari-Bohlouli, P.; Niknezhad, S.V.; Abedi, A.; Izadifar, Z.; Mohammadinejad, R.; Varma, R.S.; Shavandi, A. Tannic Acid: A Versatile Polyphenol for Design of Biomedical Hydrogels. *J. Mater. Chem. B* **2022**, *10*, 5873–5912. <https://doi.org/10.1039/d2tb01056a>
35. Yue, J.; Liu, Z.; Wang, L.; Wang, M.; Pan, G. Recent Advances in Bioactive Hydrogel Microspheres: Material Engineering Strategies and Biomedical Prospects. *Mater. Today Bio* **2025**, *31*, 101614. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101614>
36. Mahdi, M.H.; Conway, B.R.; Mills, T.; Smith, A.M. Gellan Gum Fluid Gels for Topical Administration of Diclofenac. *Int. J. Pharm.* **2016**, *515*, 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.048>
37. Osmalek, T.; Froelich, A.; Milanowski, B.; Bialas, M.; Hyla, K.; Szybowicz, M. pH-Dependent Behavior of Novel Gellan Beads Loaded with Naproxen. *Curr. Drug Deliv.* **2018**, *15*, 52–63. <https://doi.org/10.2174/1567201814666170303120936>
38. Wang, L.; Dos Santos Sanches, N.; Panahipour, L.; Imani, A.; Yao, Y.; Zhang, Y.; Li, L.; Gruber, R. Dimethyl Fumarate-Loaded Gellan Gum Hydrogels Can Reduce In Vitro Chemokine Expression in Oral Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 9485. <https://doi.org/10.3390/ijms25179485>
39. Musazzi, U.M.; Cencetti, C.; Franzé, S.; Zoratto, N.; Di Meo, C.; Procacci, P.; Matricardi, P.; Cilurzo, F. Gellan Nanohydrogels: Novel Nanodelivery Systems for Cutaneous Administration of Piroxicam. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 1028–1036. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00926>
40. Ng, J.Y.; Zhu, X.; Mukherjee, D.; Zhang, C.; Hong, S.; Kumar, Y.; Gokhale, R.; Ee, P.L.R. Pristine Gellan Gum–Collagen Interpenetrating Network Hydrogels as Mechanically Enhanced Anti-Inflammatory Biologic Wound Dressings for Burn Wound Therapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4*, 1470–1482. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01363>
41. Spera, R.; Nobile, S.; Di Trapani, L. Gellan Gum for Tissue Engineering Applications: A Mini Review. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* **2018**, *7*, 5785–5786. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2018.07.001474>
42. Wang, F.; Li, S.; Wang, X.; Yang, Q.; Duan, J.; Yang, Y.; Mu, H. Gellan Gum-Based Multifunctional Hydrogel with Enduring Sterilization and ROS Scavenging for

Infected Wound Healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *282*, 136888. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136888>

43. Scalia, F.; Vitale, A.M.; Picone, D.; De Cesare, N.; Swiontek Brzezinska, M.; Kaczmarek-Szczepanska, B.; Ronca, A.; Zavan, B.; Bucchieri, F.; Szychlinska, M.A.; et al. Exploring Methacrylated Gellan Gum 3D Bioprinted Patches Loaded with Tannic Acid or L-Ascorbic Acid as Potential Platform for Wound Dressing Application. *Gels* **2025**, *11*, 40. <https://doi.org/10.3390/gels11010040>

44. Panahipour, L.; Abbasabadi, A.O.; Gruber, R. Oral Cell Lysates Reduce the Inflammatory Response of Activated Macrophages. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 1701. <https://doi.org/10.3390/jcm12041701>

45. Liu, F.; Sheng, S.; Shao, D.; Xiao, Y.; Zhong, Y.; Zhou, J.; Quek, C.H.; Wang, Y.; Dawulieti, J.; Yang, C.; et al. Targeting Multiple Mediators of Sepsis Using Multifunctional Tannic Acid-Zn²⁺-Gentamicin Nanoparticles. *Matter* **2021**, *4*, 3677–3695. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2021.09.001>

46. Cvikl, B.; Lussi, A.; Moritz, A.; Sculean, A.; Gruber, R. Sterile-Filtered Saliva Is a Strong Inducer of IL-6 and IL-8 in Oral Fibroblasts. *Clin. Oral Investig.* **2015**, *19*, 385–399. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1232-3>

47. Frasheri, I.; Heym, R.; Ern, C.; Summer, B.; Hennessen, T.G.; Högg, C.; Reichl, F.-X.; Folwaczny, M. Salivary and Gingival CXCL8 Correlation with Periodontal Status, Periodontal Pathogens, and Smoking. *Oral Dis.* **2022**, *28*, 2267–2276. <https://doi.org/10.1111/odi.13994>

48. Imani, A.; Panahipour, L.; Dos Santos Sanches, N.; Wang, L.; Gruber, R. Platelet-Rich Fibrin Increases CXCL8 Expression in Gingival Fibroblasts. *Biomedicines* **2024**, *12*, 1326. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061326>

49. Bond, M.; Chase, A.J.; Baker, A.H.; Newby, A.C. Inhibition of Transcription Factor NF-kappaB Reduces Matrix Metalloproteinase-1, -3 and -9 Production by Vascular Smooth Muscle Cells. *Cardiovasc. Res.* **2001**, *50*, 556–565. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00220-6](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00220-6)

50. Daré, R.G.; Nakamura, C.V.; Ximenes, V.F.; Lautenschlager, S.O.S. Tannic Acid, a Promising Anti-Photoaging Agent: Evidences of Its Antioxidant and Anti-Wrinkle Potentials, and Its Ability to Prevent Photodamage and MMP-1 Expression in L929

Fibroblasts Exposed to UVB. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *160*, 342–355. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.019>

51. Chiang, Y.-T.; Xiao, Y.-B.; Hsu, S.-H.; Chang, S.-W.; Chou, C.-C. Molecular Interactions of Tannic Acid and Matrix Metalloproteinases 2 and 9. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2023**, *21*, 2792–2800. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.04.011>

52. Park, H.J.; Kim, H.J.; Kwon, H.J.; Lee, J.Y.; Cho, B.K.; Lee, W.J.; Yang, Y.; Cho, D.H. UVB-Induced Interleukin-18 Production Is Downregulated by Tannic Acids in Human HaCaT Keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2006**, *15*, 589–595. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00449.x>

53. Azimullah, S.; Meeran, M.F.N.; Ayoob, K.; Arunachalam, S.; Ojha, S.; Beiram, R. Tannic Acid Mitigates Rotenone-Induced Dopaminergic Neurodegeneration by Inhibiting Inflammation, Oxidative Stress, Apoptosis, and Glutamate Toxicity in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9876. <https://doi.org/10.3390/ijms24129876>

54. Meier, B.; Radeke, H.H.; Selle, S.; Younes, M.; Sies, H.; Resch, K.; Habermehl, G.G. Human Fibroblasts Release Reactive Oxygen Species in Response to Interleukin-1 or Tumour Necrosis Factor-Alpha. *Biochem. J.* **1989**, *263*, 539–545. <https://doi.org/10.1042/bj2630539>

55. Son, Y.; Kim, S.; Chung, H.-T.; Pae, H.-O. Reactive Oxygen Species in the Activation of MAP Kinases. *Methods Enzymol.* **2013**, *528*, 27–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00002-1>

56. Zhou, Z.; Xiao, J.; Guan, S.; Geng, Z.; Zhao, R.; Gao, B. A Hydrogen-Bonded Antibacterial Curdlan-Tannic Acid Hydrogel with an Antioxidant and Hemostatic Function for Wound Healing. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *285*, 119235. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119235>

57. Guo, Z.; Xie, W.; Lu, J.; Guo, X.; Xu, J.; Xu, W.; Chi, Y.; Takuya, N.; Wu, H.; Zhao, L. Tannic Acid-Based Metal Phenolic Networks for Bio-Applications: A Review. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9*, 4098–4110. <https://doi.org/10.1039/D1TB00383F>

58. Tikoo, K.; Bhatt, D.K.; Gaikwad, A.B.; Sharma, V.; Kabra, D.G. Differential Effects of Tannic Acid on Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2027–2035. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.036>

59. Jin, W.; Xue, Y.; Xue, Y.; Han, X.; Song, Q.; Zhang, J.; Li, Z.; Cheng, J.; Guan, S.; Sun, S.; et al. Tannic Acid Ameliorates Arsenic Trioxide-Induced Nephrotoxicity, Contribution of NF- κ B and Nrf2 Pathways. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *126*, 110047. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110047>
60. Zhang, X.; Liu, K.; Qin, M.; Lan, W.; Wang, L.; Liang, Z.; Li, X.; Wei, Y.; Hu, Y.; Zhao, L.; et al. Abundant Tannic Acid Modified Gelatin/Sodium Alginate Biocomposite Hydrogels with High Toughness, Antifreezing, Antioxidant and Antibacterial Properties. *Carbohydr. Polym.* **2023**, *309*, 120702. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120702>
61. Ransy, C.; Vaz, C.; Lombès, A.; Bouillaud, F. Use of H₂O₂ to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9149. <https://doi.org/10.3390/ijms21239149>
62. Yang, D.; Elner, S.G.; Bian, Z.-M.; Till, G.O.; Petty, H.R.; Elner, V.M. Pro-Inflammatory Cytokines Increase Reactive Oxygen Species through Mitochondria and NADPH Oxidase in Cultured RPE Cells. *Exp. Eye Res.* **2007**, *85*, 462–472. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.06.013>
63. Wu, L.; Pan, Y. Reactive Oxygen Species Mediate TNF- α -Induced Inflammatory Response in Bone Marrow Mesenchymal Cells. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2019**, *22*, 1296–1301. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.37893.9006>

ANEXOS

Anexo A – Comitê de Ética no Uso Animal (I)



Borschkegasse 8b/6
1090 Wien, Österreich

T +43(0)1 404 00-21470, 22440
F +43(0)1 404 00-16900
ethik-kom@meduniwien.ac.at
ethikkommission.meduniwien.ac.at

Sehr geehrter Antragsteller!

Bezüglich Ihrer Studie EK-Nr.631.../...2007... teilen wir Ihnen mit,

dass die Verlängerung des Votums verspätet erfolgt.

Die jährliche Verlängerung wäre am23.01.2024... fällig
gewesen.



Univ.Doz.Dr. Martin Brunner
Vorsitzender der Kommission

Anexo B – Comitê de Ética no Uso Animal (II)

ETHIK-KOMMISSION
DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT WIEN
 Borschkegasse 8b/6 - A-1090 Wien, Austria
 ☎ 0043 1 404 00 – 21470, 22440 & 📠 0043 1 404 00 – 16900
 E-Mail: ethik-kom@meduniwien.ac.at
ethikkommission.meduniwien.ac.at

AUSZUG AUS DEM PROTOKOLL DER AMENDMENTS U.DIV.MELDUNGEN
 DER ETHIK-KOMMISSION
 VOM JUNI 2024

003/06/2024) EK Nr. 631/2007

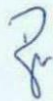
Univ.Doiz.Dr. Reinhard Gruber
Univ.Klin.f. Zahn-, Mund- u. Kieferheilkunde, Klin.Abt.f. Orale Chirurgie
Isolierung von Fibroblasten aus extrahierten Zähnen

Verlängerung der Gültigkeit des Votums

(Meldung 24.06.2024)

Die Kommission nimmt diese Meldung ohne Einspruch zur Kenntnis.

Bei einer geplanten weiteren Projektlaufzeit von mehr als 12 Monaten ist die Studie zeitnahe in das elektronische Einreichsystem der Ethik-Kommission (ECS) zu übertragen, wobei auf das positive Votum der zugrunde liegenden Studie Bezug genommen werden soll.



Univ.Doiz.Dr. Martin Brunner
 Vorsitzender der Kommission

05. Juli 2024

Anexo B – Manuscrito publicado na International Journal of Molecules Sciences



Article

Tannic Acid-Loaded Gellan Gum Hydrogels Reduce In Vitro Chemokine Expression in Oral Cells

Natália dos Santos Sanches ^{1,2} , Atefe Imani ¹ , Lei Wang ^{1,3}, Otávio Augusto Pacheco Vitória ^{1,4} , Hannah Reinert ¹, Layla Panahipour ¹ , Francisley Ávila Souza ² , Idelmo Rangel Garcia Júnior ² and Reinhard Gruber ^{1,5,6,*}

¹ Department of Oral Biology, University Clinic of Dentistry, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria; natalia.s.sanches@unesp.br (N.d.S.S.); n12202452@students.meduniwien.ac.at (A.I.); wanglei20111213@163.com (L.W.); otavio_pacheco00@hotmail.com (O.A.P.V.); hanna.reinert@outlook.com (H.R.); layla.panahipour@meduniwien.ac.at (L.P.)

² Department of Diagnosis and Surgery, Araçatuba Dental School of Sao Paulo, Sao Paulo 16015-050, Brazil; francisley.avila@unesp.br (F.Á.S.); idelmo.rangel@unesp.br (I.R.G.J.)

³ Wenzhou Institute, University of Chinese Academy of Sciences, Wenzhou 325000, China

⁴ Department of Diagnosis and Surgery – Periodontics Division, Araçatuba Dental School of Sao Paulo, Sao Paulo 16015-050, Brazil

⁵ Austrian Cluster for Tissue Regeneration, 1200 Vienna, Austria

⁶ Department of Periodontology, School of Dental Medicine, University of Bern, 3010 Bern, Switzerland

* Correspondence: reinhard.gruber@meduniwien.ac.at; Tel.: +43-(0)1400702660



Academic Editors: Satoshi Komasa and Yoshiya Hashimoto

Received: 24 April 2025

Revised: 24 May 2025

Accepted: 5 June 2025

Published: 11 June 2025

Citation: dos Santos Sanches, N.; Imani, A.; Wang, L.; Pacheco Vitória, O.A.; Reinert, H.; Panahipour, L.; Souza, F.Á.; Garcia Júnior, I.R.; Gruber, R. Tannic Acid-Loaded Gellan Gum Hydrogels Reduce In Vitro Chemokine Expression in Oral Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 5578.

<https://doi.org/10.3390/ijms26125578>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Tannic acid (TA), a natural polyphenol with antiphlogistic and crosslinking properties, is a versatile component of hydrogel that can be delivered to inflammatory sites in oral applications. However, the impact of TA dampening an inflammatory response in oral cells remains to be shown. We, therefore, established a bioassay where chemokine expression is induced by exposing gingival fibroblasts and HSC2 oral squamous carcinoma cells to IL1 β and TNF α . Additionally, gingival fibroblasts were stimulated with saliva and poly I:C HMW to trigger chemokine production. Our findings demonstrate that TA effectively reduced the expression of *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL8*, and *CXCL10*—in gingival fibroblasts and HSC2 cells—without affecting cell viability. This effect was further confirmed by immunoassays for *CXCL8*. Moreover, we observed that TA decreased *ERK*, *JNK*, and *p65* phosphorylation in gingival fibroblasts and partially inhibited *NF- κ B/p65* nuclear translocation. Notably, TA released from a gellan gum hydrogel retained its ability to suppress chemokine expression in gingival fibroblasts. These in vitro findings provide insights into the anti-inflammatory properties of TA in oral cells and introduce gellan gum hydrogel as a delivery vehicle paving the way for future preclinical research.

Keywords: tannic acid; gellan gum hydrogel; gingival fibroblasts; inflammatory response; periodontitis; peri-implantitis

1 Introduction

Periodontal disease is a pathological condition caused by microbial imbalance, triggering chronic inflammation and oxidative stress. This catabolic environment destroys the gingiva, periodontal ligament, alveolar bone, and other supporting structures [1–4]. A similar process occurs in peri-implantitis, culminating in inflammatory osteolysis [2,5–7]. Periodontitis and peri-implantitis often arise from the earlier, less severe form of mucositis, which can be reversed with proper oral hygiene, thereby reestablishing the soft tissue barrier [8,9]. Recently, single-cell RNA sequencing revealed the role of oral fibroblasts

and epithelial cells in driving inflammation in periodontitis [10] and peri-implantitis [11]. Fibroblasts exhibit a unique ability to recruit neutrophils through chemokine ligands such as *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL5*, and *CXCL8*, while *CXCL12*, *CXCL13*, and *CCL19* attract other leukocytes [10]. Similarly, keratinocytes in periodontitis patients show increased expression of *CXCL1*, *CXCL3*, *CXCL8*, *CXCL13*, and *CCL20* [12], suggesting that chemokine expression in gingival fibroblasts and epithelial cells drives chronic periodontitis. Notably, preclinical research has identified *CCL2* as a key chemokine that is significantly upregulated in pe-riodontitis, promoting inflammation and upregulating pro-inflammatory cytokines such as *TNF α* and *IL1 β* [13]. Consistently, increasing concentrations of chemokines such as *TNF α* , *IL1 β* and *CXCL8* in the gingival crevicular fluid and peri-implant crevicular fluid are associated with the severity of periodontitis and peri-implantitis [14,15]. In addition, overexpression of reactive oxygen species (ROS) further exacerbates inflammation and tissue destruction, increasing the risk of implant failure or tooth loss [4]. Thus, lowering the expression of chemokines—thereby dampening the influx of neutrophils [15,16] and other inflammatory cells producing ROS, represents a potential strategy to regain control over periodontal and peri-implant tissues—particularly because conventional treatments, including mechanical debridement and antibiotic therapy, often present limitations [1–3]. Consequently, there is a growing demand for adjunctive local strategies to complement conventional periodontal and peri-implant therapies, ideally preventing the progression of mucositis into irreversible tissue destruction.

Tannic acid (TA) is a plant-derived polyphenol approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for biomedical applications. Its clinical potential is supported by its potential anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial properties [17]. For instance, TA has been proposed as a local strategy to support wound healing in vivo and in vitro [18,19]. Currently, according to Drug Bank DB09372, TA is topically applied for the treatment of cold sores, diaper rash, fever blisters, and poison ivy. In vitro studies offer insights into the cellular mechanisms of TA, showing that TA reduces cytokine expression in BV2 microglial cells [20], prostaglandin synthesis in irradiated HaCat cells [21], in mouse models of ulcers [22], and in bone marrow-derived macrophages [23]. Additionally, TA downregulates the expression of inducible nitric oxide synthase and other inflammatory mediators in chondrocytes via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor-kappa B (*NF- κ B*) pathways [20,23–25]. TA also reduces lipopolysaccharide-induced (LPS) activation of the *Erk2*, *p38*, and *NF- κ B* signaling in RAW 264.7 cells [26] and decreases ROS production in several models [27–30]. Given these findings, it is not surprising that TA has been used as a coating for implant abutments [9] and that TA-loaded silver alginate microcapsules hydrogel can support microvasculature in periodontitis models [31]. Together, these findings suggest that TA could combat inflammation in periodontitis and peri-implantitis; however, there is still limited information regarding its potential to reduce chemokine expression in oral cells.

To exert its therapeutic benefits, TA requires a delivery system. As a natural crosslinker, TA undergoes non-covalent interactions such as hydrogen bonds, electrostatic forces, and hydrophobic interactions [32]. Therefore, TA can be incorporated [33,34] and enhance the hydrogel's stability [35]. Gellan gum (GG) is a naturally derived, anionic polysaccharide polymer that is FDA-approved and commonly utilized in the preparation of situ-forming hydrogels, offering significant potential for drug delivery systems, as discussed in various comprehensive reviews [30–33]. GG offers excellent biocompatibility, low degradation rates, and tunable mechanical properties, making it an ideal candidate for drug delivery systems [28]. Notably, GG is a thermosensitive hydrogel that remains in a liquid, injectable form at room temperature and undergoes gelation upon exposure to body temperature, making it suitable for applications in drug delivery [36–39], tissue engineering, and wound healing [40,41]. For instance, GG hydrogel has been used to deliver TA to support wound healing [42,43]. Considering periodontitis and peri-implantitis, the question arises of whether TA, when released from GG hydrogels maintains its potential capacity to lower forced chemokine expression using in vitro bioassays. Here, we test the ability of TA to reduce the chemokine expression in gingival fibroblasts and the HSC2 oral squamous carcinoma cell line [44] and evaluate the use of GG as an in vitro TA delivery system.

2 Results

2.1 Screening of TA Concentrations

To understand the impact of TA on oral cell viability, we evaluated the ability of gingival fibroblasts and HSC2 cells to convert a tetrazolium substrate into formazan. In gingival fibroblasts, formazan formation increased progressively with higher concentrations of TA (Figure 1A). In contrast, however, HSC2 cells exhibited the opposite trend, with formazan formation decreasing as TA concentration increased (Figure 1B). Cell viability was maintained up to a TA concentration of 20 μ g/mL for gingival fibroblasts and HSC2 cells (Figure 1A,B). The predominance of green staining in the live-dead assay further confirmed that cells remain vital at 20 μ g/mL TA (Figure 1C,D).

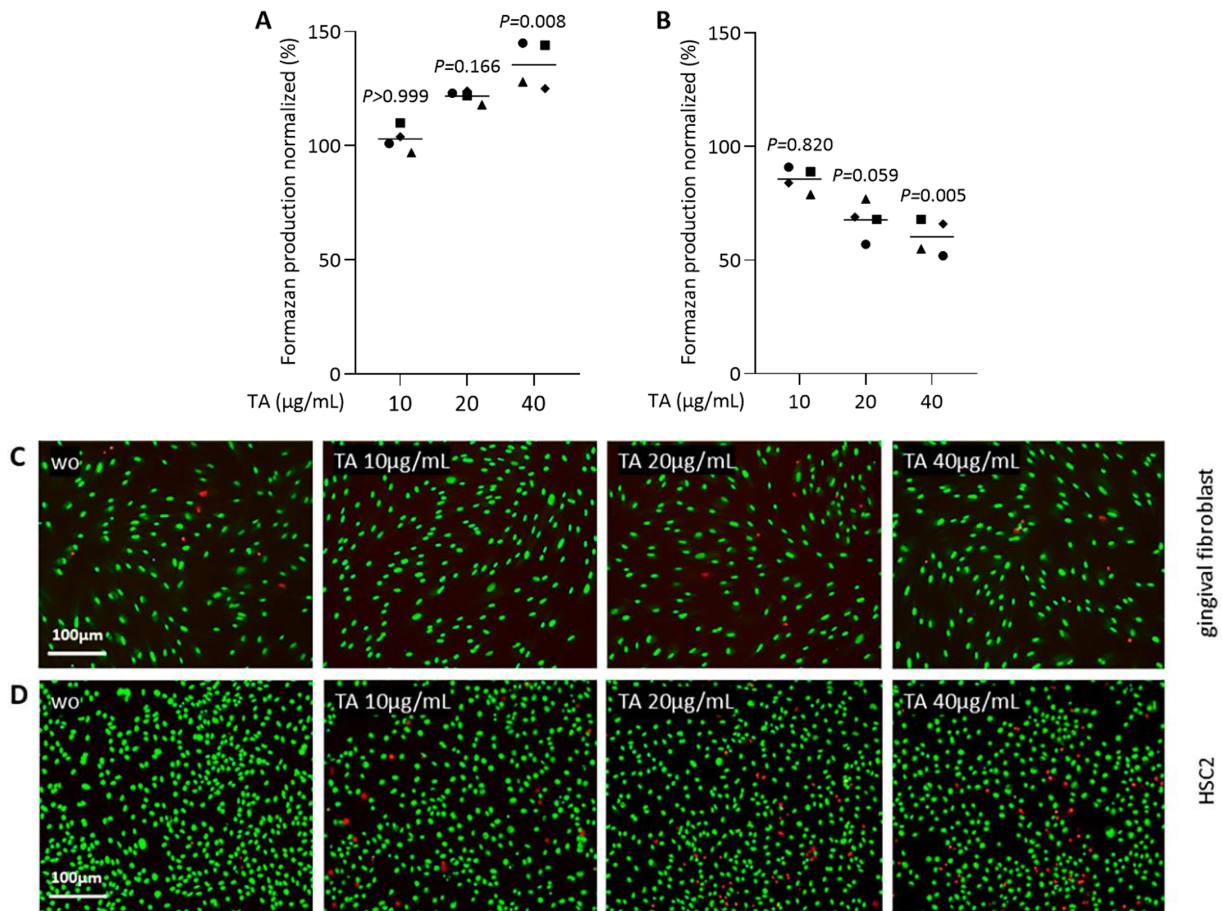


Figure 1. Cell viability assays were performed in gingival fibroblasts (A,C) and HSC2 cells (B,D) exposed to serum-free media with a serial dilution of TA (μg/mL) overnight. (A,B) Viability was assessed by measuring formazan production and expressed as a percentage relative to unstimulated controls. Different symbol shapes represent independent experiments. Statistical analysis was performed using the ratio-paired *t*-tests, and the *p*-values are shown. (C,D) Representative live/dead staining, with green indicating viable cells and red indicating dead cells. The results suggest cell viability was maintained up to a 20 μg/mL TA concentration for gingival fibroblasts and HSC2 cells. Scale bar 100 μm.

2.2 TA Reduced IL1β and TNFα, SLV or Poly I: C HMW-Induced Chemokines in Gingival Fibroblasts

The anti-inflammatory activity of TA has been reported in various cell types, but its effects on oral cells remain poorly explored [17]. Thus, we hypothesized that TA also exerts anti-inflammatory properties on gingival fibroblasts when exposed to different inflammatory agonists. To test this assumption, we induced an inflammatory response by exposing gingival fibroblasts to IL1β and TNFα, SLV 5%, or poly(I: C) HMW (a TLR3 agonist) [45]. As expected, IL1β and TNFα [38], SLV [38], and poly(I: C) HMW triggered a robust increase in the expression of CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10, CCL2, and CCL4 in gingival fibroblasts (Figures 2A, 3A and 4A). We report here that pre-treatment with TA significantly reduced the expression of these chemokines. Gene transcription was supported by an immunoassay showing reduced CXCL8 on the translational level for all the inflammatory agonists (Figure 2B, Figure 3B, and Figure 4B). Consistently with the established role of NFκβ signaling pathways in CXCL8 expression [46,47], exposure to TA in combination with IL1β and TNFα partially inhibits the nuclear translocation of p65 in gingival fibroblasts [17]. Furthermore, TA significantly reduced the expression of MMP1 [48,49], MMP3 [50], and COX2 [17,51,52] (Supplementary Figures S1 and S2) when exposed to IL1β and TNFα or poly(I: C) HMW, highlighting its role in modulating NFκβ activity (Figure 5). These results emphasize the potential of TA to reduce the inflammation and inflammatory damage in gingival fibroblast.

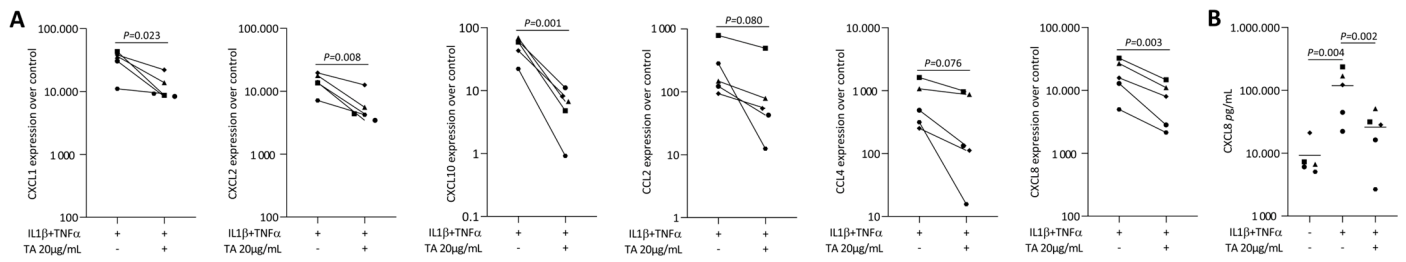


Figure 2. Gingival fibroblasts were exposed to IL1 β and TNF α (10 ng/mL) alone and in combination with TA (20 μ g/mL) (A,B). Results were normalized for expression changes for untreated cells.

(A) Gene expression of chemokines was significantly reduced by 20 μ g/mL TA, (B) confirmed at the protein level by immunoassay for CXCL8 pg/mL. Different symbol shapes represent independent experiments for PCR and ELISA. Statistical analysis was performed using ratio-paired *t*-tests, and *p*-values are shown.

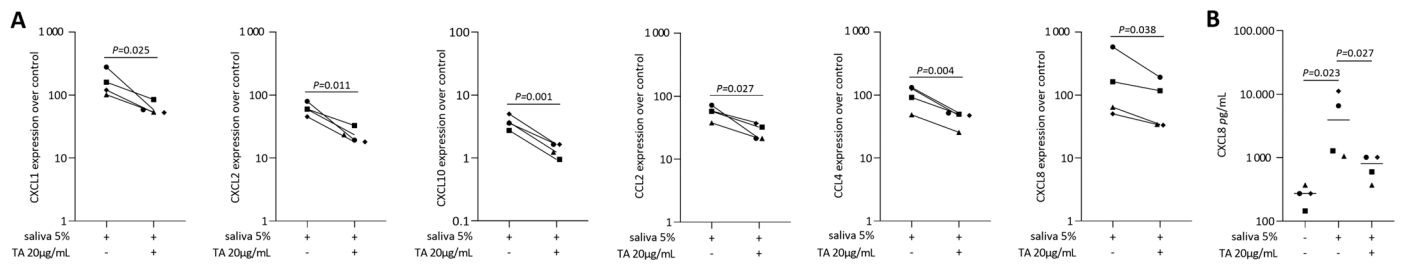


Figure 3. Gingival fibroblasts were exposed to saliva 5% alone and in combination with TA (20 μ g/mL) (A,B). Results were normalized for expression changes for untreated cells. (A) Gene expression of chemokines was significantly reduced by 20 μ g/mL TA, (B) confirmed at the protein level by immunoassay for CXCL8 pg/mL. Different symbol shapes represent independent experiments for PCR and ELISA. Statistical analysis was performed using ratio-paired *t*-tests, and *p*-values are shown.

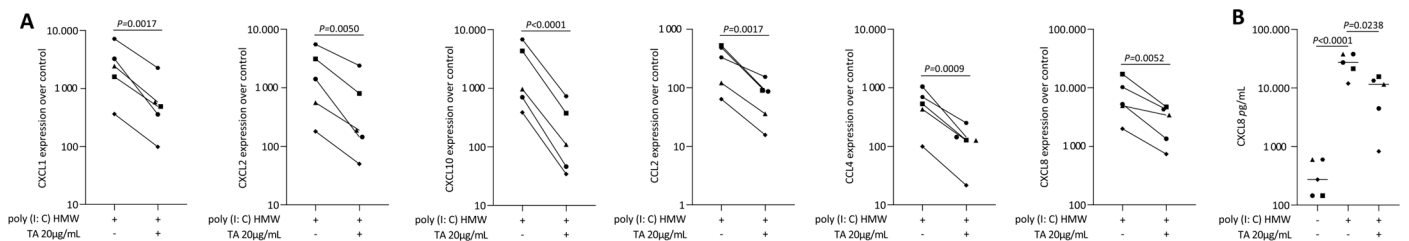


Figure 4. Gingival fibroblasts were exposed to poly (I: C) HMW (100 ng/mL) alone and in combination with TA (20 μ g/mL) (A,B). Results were normalized for expression changes for untreated cells.

(A) Gene expression of chemokines was significantly reduced by 20 μ g/mL TA, (B) confirmed at protein level by immunoassay for CXCL8 pg/mL. Different symbol shapes represent independent experiments for PCR and ELISA. Statistical analysis was performed using ratio-paired *t*-tests, and *p*-values are shown.

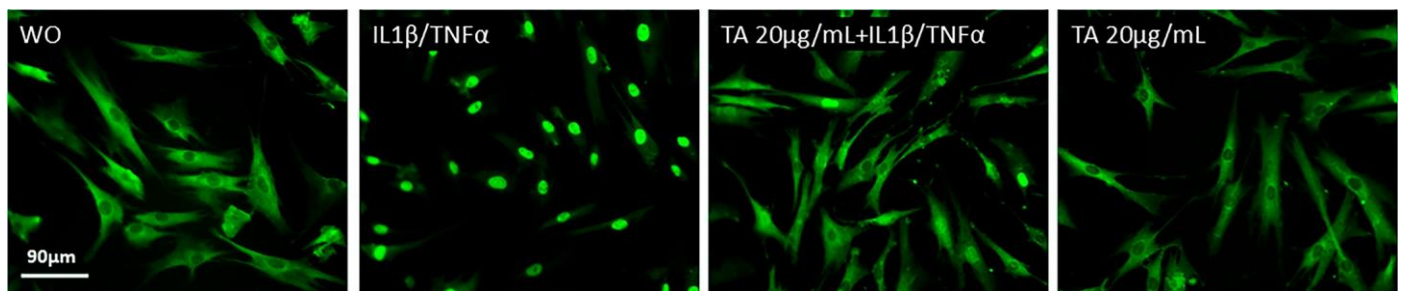


Figure 5. Tannic acid, in combination with IL1 β and TNF α (10 ng/mL), partially inhibits the nuclear translocation of p53 in oral fibroblasts. Gingival fibroblasts were untreated (wo; without), exposed to IL1 β and TNF α alone, or treated with TA in combination with IL1 β and TNF α for 1 h. A faint nuclear p53 labeling was observed in cells treated with 20 μ g/mL TA along with IL1 β and TNF α , compared to the significant accumulation of p53 in the nucleus in response to IL1 β and TNF α alone. The scale bar represents 90 μ m.

Additionally, since ROS are crucial in inflammation-related tissue damage, the ability of biomaterials to scavenge ROS is

important for managing inflammation. In our study, we found that TA treatment significantly reduced mitochondrial ROS levels in gingival fibroblasts exposed to H_2O_2 and pro-inflammatory cytokines $\text{IL1}\beta$ and $\text{TNF}\alpha$, bringing them closer to control levels (Supplementary Figure S3A,B) [53–55]. Those results under-score a marked decrease in oxidative stress, highlighting TA's potential as a therapeutic agent to counteract oxidative stress-induced damage in gingival fibroblasts [56].

2.3 TA Reduced $\text{IL1}\beta$ and $\text{TNF}\alpha$ -Induced Chemokines in HSC2 Cells

To provide direct evidence of TA's anti-inflammatory activity on oral cells, we conducted additional experiments in HSC2 cells. As we expected, the pre-treatment with TA significantly downregulated the expression of CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10, and CCL2 in response to $\text{IL1}\beta$ and $\text{TNF}\alpha$ stimulation (Figure 6A). Consistently, the immunoassay demonstrated a decrease in CXCL8 levels at the protein level (Figure 6B). Taken together, these findings highlight the role of TA in reducing inflammation in oral cells.

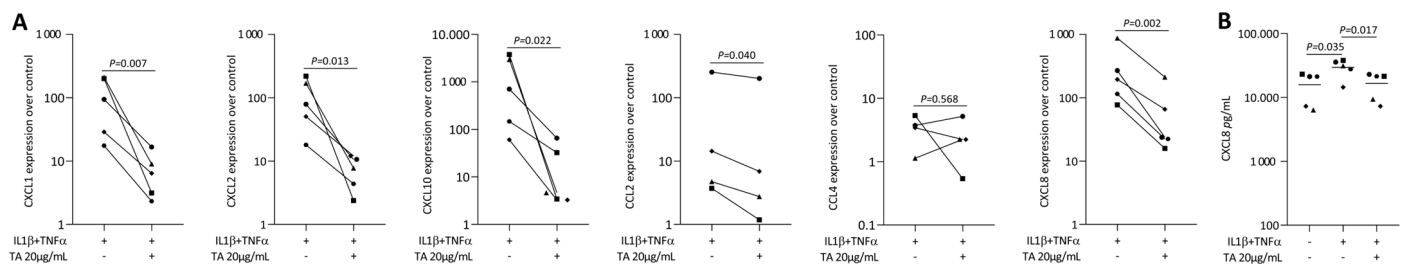


Figure 6. HSC2 cells were exposed to $\text{IL1}\beta$ and $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) alone and combined with TA (20 $\mu\text{g/mL}$) (A,B). Results were normalized for expression changes for untreated cells. (A) Gene expression of chemokines was significantly reduced by 20 $\mu\text{g/mL}$ TA, (B) confirmed at protein level by immunoassay for CXCL8 pg/mL. Different symbol shapes represent independent experiments for PCR and ELISA. Statistical analysis was performed using ratio-paired *t*-tests, and *p*-values are shown.

2.4 TA Inhibits the Phosphorylation of ERK, JNK, and p65 in $\text{IL1}\beta$ and $\text{TNF}\alpha$ -Induced Gingival Fibroblasts

Next, we further analyzed the MAPK and $\text{NF}\kappa\beta$ signaling pathways in gingival fibroblasts to investigate the underlying mechanisms of TA's anti-inflammatory effects. As shown in (Figure 7), $\text{IL1}\beta$ and $\text{TNF}\alpha$ significantly enhanced the phosphorylation of ERK, JNK, p38, and p65, while TA alone had no effect. However, TA treatment led to a significant decrease in ERK and JNK phosphorylation [25] with a partial reduction in p38 [27,57] and p65 phosphorylation [27,58]. These findings suggest that TA acts through a broad mechanism, modulating several signaling pathways, including MAPK and $\text{NF}\kappa\beta$ [17], regulating the phosphorylation of key proteins in the inflammatory response in gingival fibroblast.

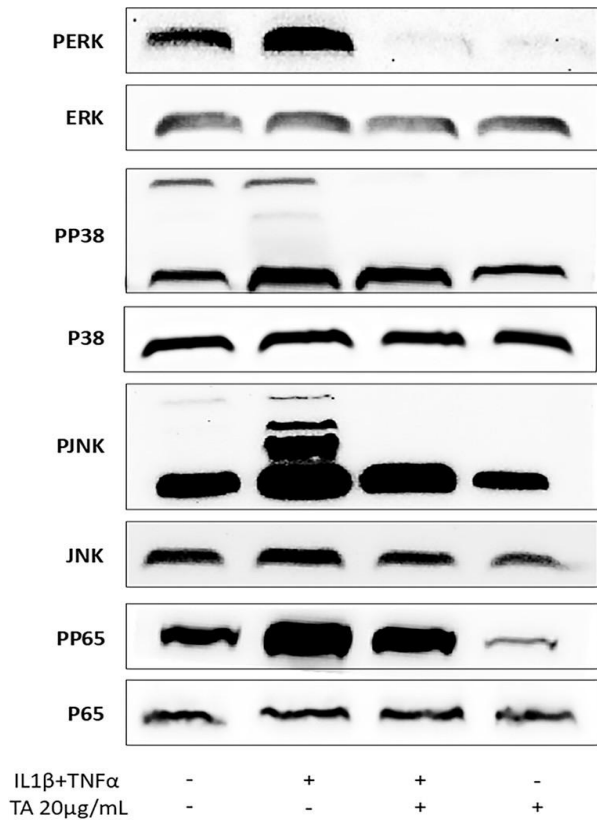


Figure 7. The effect of TA (20 µg/mL) on the phosphorylation of signaling molecules in IL1β and TNFα (10 ng/mL)-stimulated gingival fibroblasts was evaluated. Cell lysates were analyzed by Western blotting to measure both phosphorylated and total levels of extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38, and p65.

2.5 Sustained Release of Tannic Acid from Gellan Gum Hydrogel (GGTA)

Due to its abundant phenolic hydroxyl groups, TA, a plant-derived polyphenol, can form a variety of one-pot physically synthesized hydrogels in combination with different polymers [34]. Previous studies have demonstrated the successful incorporation of TA into hydrogels and hyaluronic acid-based capsules [55]. Building on this evidence, we investigated the potential of GG as a vehicle for topical administration, assessing its ability to modulate TA release in PBS at 37 °C. TA exhibited a sustained release profile, with a gradual, cumulative increase before reaching stability within 72 h (Figure 8), particularly in GG+TA formulations at 1330 µg/mL and 4000 µg/mL. These findings highlight a promising strategy, positioning GG+TA as a potential therapeutic option for the localized treatment of oral disorders in dentistry and oral medicine.

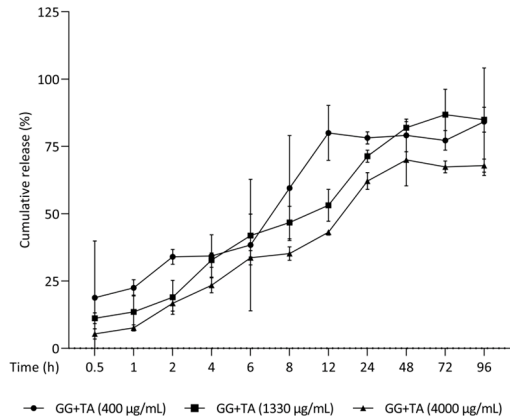


Figure 8. Release the profile of TA at different concentrations of 400, 1330, and 4000 µg/mL from gellan gum (GG) hydrogel in PBS at 37 °C. The long-term sustained release kinetics were monitored from 0.5 to 96 h. Each data point on the release profile represents the mean value ± standard deviation derived from triplicate independent experiments.

2.6 Tannic Acid-Loaded Gellan Gum Reduced IL1 β and TNF α or SLV-Induced Chemokines in Gingival Fibroblasts

To further investigate the release of TA-loaded from the GG hydrogel, a coculture bioassay was conducted using gingival fibroblasts and oral HSC2 cells [38]. The live/dead staining assay confirmed the biocompatibility of the TA-loaded GG hydro-gel in the gingival fibroblast cellular model (Figure 9A). For the HSC2 oral cells, the results were consistent with previous findings, demonstrating that lower concentrations of TA are safe (Figure 9B). Notably, the presence of GG hydrogel alone appeared to impact cell viability, as indicated by the live/dead staining (Figure 9A,B). Subsequently, we observed that pre-treatment with GG+TA (1330 μ g/mL) significantly reduced chemokine expression in gingival fibroblasts stimulated by IL1 β , TNF α , and SLV 5% (Figures 10A and 11A). Notably, TA pre-treatment effectively downregulated CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL2, and CCL4 in cells exposed to IL1 β and TNF α (Figure 11A), as well as CXCL1, CXCL2, CXCL10, CXCL8, CCL2, and CCL4 in response to SLV 5% (Figure 11A). Gene transcription was supported by an immunoassay showing reduced CXCL8 on the translational level for all the inflammatory agonists (Figures 10B and 11B). Based on the positive results observed, this model supports the potential of TA, either alone or incorporated into GG, as a promising approach for future topical treatments of inflammatory diseases in the oral cavity.

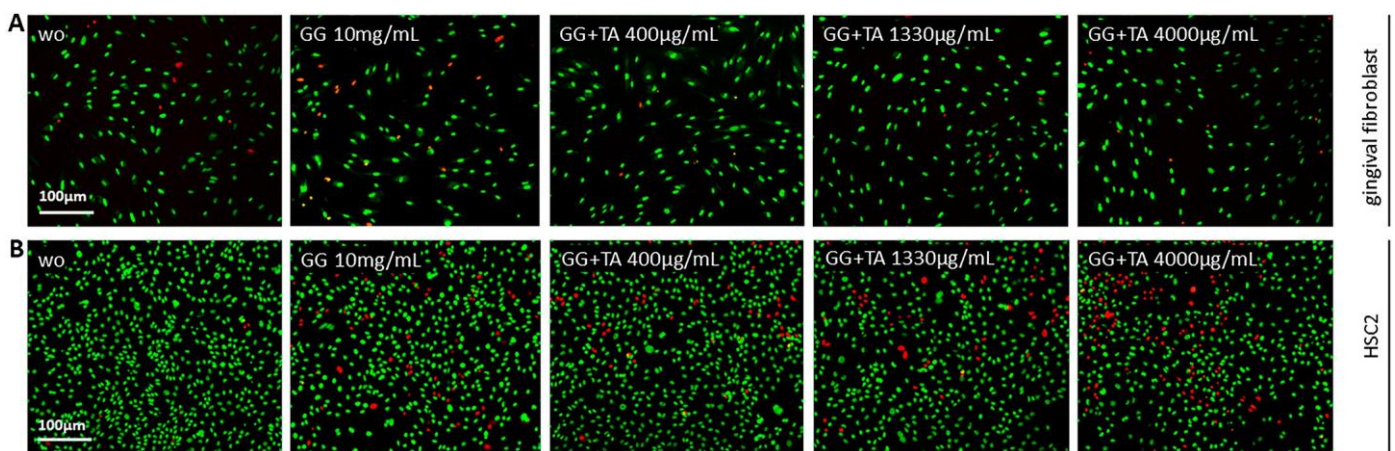


Figure 9. Cell viability assays in gingival fibroblasts (A) and HSC2 cells (B) exposed to TA at 400, 1330, and 4000 μ g/mL from gellan gum hydrogel (GG) after overnight incubation. Representative live/dead staining images show viable cells in green and dead cells in red. “WO” indicates untreated cells, while “GG” represents cells treated with GG (10 mg/mL) without TA. Scale bars represent 100 μ m.

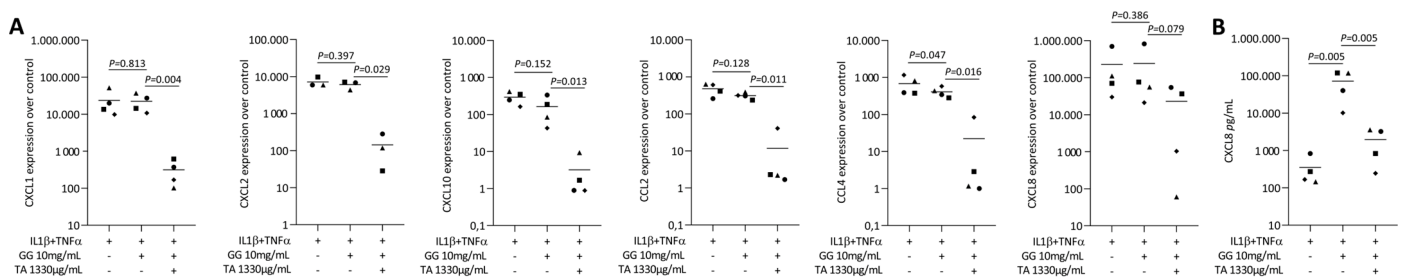


Figure 10. Gingival fibroblasts were exposed to IL1 β and TNF α (10 ng/mL) alone and in combination with TA (1330 μ g/mL) loaded gellan gum (GGTA) (A,B). Results were normalized for expression changes for untreated cells. (A) Gene expression of chemokines was significantly reduced by GGTA 1330 μ g/mL, (B) confirmed at the protein level by immunoassay for CXCL8 pg/mL. Different symbol shapes represent independent experiments for PCR and ELISA. Statistical analysis was performed using ratio-paired *t*-tests, and *p*-values are shown.

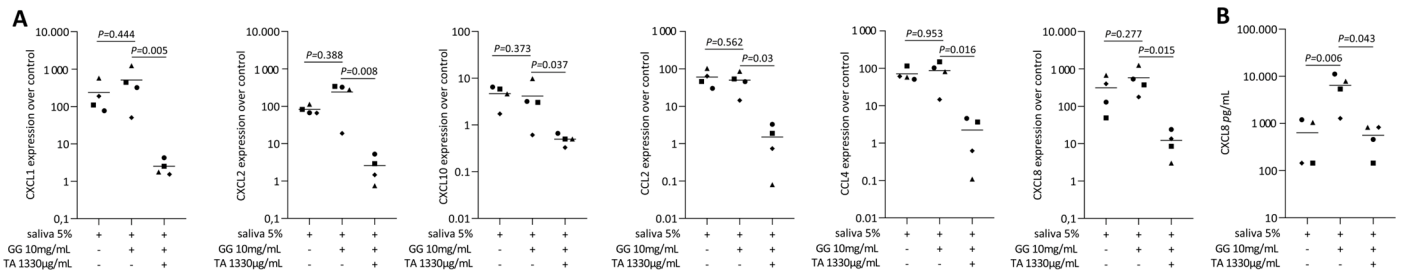


Figure 11. Gingival fibroblasts were exposed to saliva 5% alone and in combination with TA (1330 µg/mL) loaded gellan gum (GGTA) (A,B). Results were normalized for expression changes for untreated cells. (A) Gene expression of chemokines was significantly reduced by GGTA 1330 µg/mL, (B) confirmed at the protein level by immunoassay for CXCL8 pg/mL. Different symbol shapes represent independent experiments for PCR and ELISA. Statistical analysis was performed using ratio-paired *t*-tests, and *p*-values are shown.

3 Discussion

Periodontitis and peri-implantitis are two entities of oral pathologies with a global reach that are linked to chronic inflammation and concomitant catabolic tissue destruction [1]. Apart from prevention, once the disease progresses to mucositis, therapeutic interventions are required to restore tissue health or, at least, to prevent inflammation from advancing to irreversible stages of periodontitis and peri-implantitis. All conventional therapies aim to reduce chronic inflammation's cause, which is the accumulation of a biofilm and its release of virulence factors provoking inflammation [10–12]. However, there is a need for cost-effective and easy-to-use solutions that not only complement conventional therapies but also serve as prophylactic measures. In the case of mucositis, such strategies could help mitigate inflammatory responses, thereby supporting the resolution of the oral disease. Based on this, tannic acid is a possible economical solution, as proposed by an FDA for biomedicine applications [17]; however, its application in dentistry has only started to progress, and its effects on the oral cellular cells remain unclear. Our finding is important because we show that TA is a natural component that is low in toxicity and effectively lowers the forced inflammatory response of gingival fibroblasts and HSC2—oral epithelial cell line cells. Moreover, we have discovered the underlying signaling mechanisms focusing on MAPK and NFκβ signaling.

Relating our findings to previous studies requires acknowledging, apart from the various preclinical models [25,42,43], that in vitro bioassays support the potential of TA to reduce an inflammatory response. For instance, TA could reduce the cytokine expression of IL6, IL1β, and TNFα in BV2 microglial cells [20], human osteoarthritis chondrocytes [24], in mouse models of ulcers [22] and IL1β in BMDMs [23]. Mechanistically, this anti-inflammatory activity is accompanied by TA's inhibition of MAPK and NFκβ pathway [17,20,23,24]. Building on these consistent findings, our research contributes to this ongoing line of investigation by demonstrating that, at a similar concentration range, TA reduces the expression of CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10, and CCL4 without affecting cell viability in primary gingival fibroblasts and HSC2 cells. Furthermore, we revealed that TA decreases the phosphorylation of ERK, JNK, and p65 in gingival fibroblasts. We also observed a significant reduction in p65 nuclear translocation in IL1β+TNFα-exposed gingival fibroblasts, mirroring findings in bone marrow-derived macrophages exposed to LPS [23]. Taking together, supporting previous research on TA released from GG [42,43] and G-sodium alginate hydrogels [59], we demonstrated that TA-loaded hydrogel effectively reduced the induced expression of CXCL1, CXCL2, CXCL8, and CCL2 in gingival fibroblasts, indicating that TA remains bioactive after release from the hydrogel scaffold.

While the clinical implications of our findings remain speculative, the results provide a strong rationale for progressing from in vitro observations to preclinical investigations. Given that chemokine expression by gingival fibroblasts and HSC2 cells plays a central pathological role in periodontitis [10] and peri-implantitis [11], and that TA effectively attenuates this response, our data support its potential for clinical translation—a hypothesis that warrants validation in relevant preclinical models. Notably, TA-gallium ion complexes with polydopamine particles loaded into GG have already been successfully applied in the wound healing model [42]. Similarly, silver alginate microcapsules coated with TA and loaded into GG hydrogel have demonstrated efficacy in periodontitis models [31]—highlighting the synergistic actions of TA, including the reduction in vascular inflammation, ROS scavenging, antibacterial effects, and mitigation of tissue damage. Taking further and considering our findings, we speculate that TA alone or loaded into GG hydrogel could serve as a local anti-inflammatory agent in mouth rinses or toothpaste or, at higher concentrations, be applied to periodontal and peri-implant defects following conventional therapies. Furthermore, it may hold promise as a coating for dental implants to modulate inflammation and promote healing—potentially broadening its applications in the field of dentistry.

Despite the positive outcomes, which offer valuable insight into the potential of TA-loaded delivery systems such as gellan gum hydrogel as topical therapeutic strategies for managing inflammatory conditions in the oral cavity, it is important to acknowledge that our investigation was limited to an in vitro bioassay – a proof-of-principle study focusing on the cellular response of oral cells. In this context, the inflammatory environment was simulated using classical pro-inflammatory cytokines IL1 β and TNF α [38], saliva [60], and poly(I: C) HMW, a TLR3 agonist [44] – all of which are mechanistically implicated in driving chemokine expression in gingiva fibroblasts and, to some extent, epithelial cells in vitro. Another limitation of the experimental setup is that the hydrogel was applied only to the edge of the tissue culture plate, covering a limited area. This design allowed a gradient of tannic acid diffusion, with surrounding uncovered cells responding to the released compound, while those directly beneath the hydrogel may have experienced different levels of exposure. Moreover, the intrinsic limitations of in vitro models must be acknowledged, particularly the absence of immune cells, vascular components, and the overall tissue-level complexity that significantly influences drug responses in vivo. To advance these findings, future studies should consider using preclinical models of periodontitis, such as those induced by *Porphyromonas gingivalis* LPS or by ligature placement around the maxillary first molars in rodents. These models effectively mimic chronic inflammation and tissue destruction observed in human periodontal disease. Additionally, omics approaches such as RNA-seq may help uncover broader transcriptomic effects and elucidate specific signaling mechanisms regulated by TA. Further research is needed to translate these findings toward clinical applications in periodontology and implantology, particularly through the local delivery of TA via hydrogel-based systems in periodontal and peri-implant defects. Notably, TA is already commercially available in combination with choline salicylate and cetrimide (Arlak Biotech, Zirakpur, India) and may, in the future, become incorporated into mouth rinses or toothpaste formulations – further reinforcing the clinical relevance of our in vitro findings.

In conclusion, TA – either alone or released from a hydrogel – demonstrates a strong anti-inflammatory potential by modulating chemokine expression and inhibiting MAPK-NF κ B signaling pathways in gingival fibroblasts and HSC2 oral squamous carcinoma cells exposed to IL1 β and TNF α . The next steps should include biocompatibility testing, in vivo validation of anti-inflammatory efficacy, and optimization of the hydrogel delivery system for localized and sustained TA release. These findings support the potential of TA-loaded hydrogels for further investigation into preclinical models of chronic inflammation.

4 Materials and Methods

4.1 Gingival Fibroblasts and Oral Squamous Carcinoma Cells

Primary human gingival fibroblasts were isolated from gingival explants prepared from extracted wisdom teeth of three independent donors, after obtaining informed consent from the patients. The local Ethical Committee approved the protocol (EK Nr. 631/2007). The oral squamous cell carcinoma cell line (HSC2) was obtained from the Health Science Research Resources Bank (Sennan, Japan). All cells were cultured in a humidified atmosphere at 37 °C with 5% CO₂ in a growth medium consisting of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 1% antibiotics (PS; Sigma-Aldrich). Gingival fibroblasts were seeded at a density of 1×10^5 cells/cm², and HSC2 cells were seeded at 2×10^5 cells/cm² into 24-well plates (VWR International, Radnor, PA, USA). The following day cells were pre-treated with tannic acid (TA; CAS: 1401-55-4, Sigma-Aldrich) for 20 min, along with 10 ng/mL IL1 β and TNF α (ProSpec-Tany Techno Gene Ltd., Ness-Ziona, Israel), 5% sterile saliva (SLV) [60], or poly(I: C) HMW (InvivoGen, Toulouse, France) in 100 ng/mL [44] as a positive control for inflammation induction. Following overnight incubation under identical culture conditions, RNA was extracted for gene expression analysis, and the supernatant was collected for immunoassay.

4.2 Tannic Acid-Loaded Gellan Gum Hydrogel

Tannic acid was dissolved in distilled water with 1% dimethylsulphoxide at 160 mg/mL. The gellan gum (GG, Shanghai Macklin Biochemical Technology Co., Ltd., Shanghai, China) powder was dissolved in distilled water (10 mg/mL) followed by heating at 90 °C for 30 min until reaching transparency. The hydrogel was formulated for this study by mixing TA with GG to reach 400 μ g/mL, 1330 μ g/mL, and 4000 μ g/mL, while GG alone was used as a control. For the delivery assay, the hydrogel was placed perpendicular to the wall of 96-well and 24-well plates seeded with gingival fibroblasts and HSC2 cells, similar to what we have reported and illustrated recently [38].

4.3 Release Kinetics of Tannic Acid from Gellan Gum Hydrogel

The *in vitro* release of TA from a series of drug-loaded hydrogels was studied using a dialysis bag with a molecular weight cut-off of 3500 Da. The dialysis bags were placed in 20 mL PBS in an air shaker at 37 °C with stirring at 100 rpm. At the indicated time, 2 mL of the release medium was collected and replaced with fresh PBS. The kinetics of TA release were determined by multi-mode readers (Synergy HTX, BioTeK, Boston, MA, USA) based on the absorption intensity of TA at 275 nm. The cumulative release of TA was quantified using a calibration curve, which had been previously established through spectrophotometric measurements of TA solutions with known concentrations.

4.4 Viability Assay

Viability experiments were conducted on gingival fibroblasts and HSC2 cells, which were treated with serial dilution of TA in a serum-free medium overnight. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) was added at a final concentration of 0.5 mg/mL and incubated for 2 h at 37 °C. Formazan crystals were solubilized with dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich), and optical density was measured at 570 nm. Data were normalized to unstimulated control values. Cell viability was further confirmed using a live/dead colorimetric assay kit, following the manufacturer's instructions (Enzo Life Sciences, Inc., Lausanne, Switzerland).

4.5 Reverse Transcription-Quantitative Real-Time PCR and Immunoassay

For RT-qPCR, after stimulation, total RNA was isolated with the ExtractMe total RNA kit (EURx, Gdańsk, Poland) followed by reverse transcription and polymerase chain reaction (LabQ, Labconsulting, Vienna, Austria) on a CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The mRNA levels were calculated by normalizing to the housekeeping gene GAPDH using the $\Delta\Delta C_t$ method. The primer sequences of the target genes are indicated in Table 1. For the immunoassay, the human CXCL8/IL8 Quantikine ELISA kit was used (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Table 1. Human primer sequence.

Gene	Forward (5' → 3')	Reverse (3' → 5')
<i>hCXCL1</i>	TCCTGCATCCCCATAGTTA	CTTCAGGAACAGCCACCAGT
<i>hCXCL2</i>	CCCATGGTTAAGAAAATCATCG	CTTCAGGAACAGCCACCAAT
<i>hCXCL8</i>	AACTTCTCCACAACCCTCTG	CTTCAGGAACAGCCACCAAT
<i>hCXCL10</i>	TGCCATTCTGATTGCTGCC	TGGCAGCCTTCCTGATTTC
<i>hCCL2</i>	AGAATCACCAGCAGCAAGTGTC	TCCTGAACCCACTTCTGCTTG
<i>hCCL4</i>	AATCACCAGCAGCAAGTGTC	TTGGGTTGTGGAGTGAGTGT
<i>hGAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

4.6 Immunofluorescence Analysis

Gingival fibroblasts were seeded onto Millicell EZ slides (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at 0.5×10^5 cells/cm² densities. Serum-starved cells were pre-treated with 20 µg/mL TA for 20 min, followed by exposure to 10 ng/mL IL1 β and TNF α for 1 h, using a serum-free medium as a control. Following treatment, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde, blocked using 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich), and permeabilized with 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). The primary antibody NF κ B P65 (Cell Signaling Technology, Cambridge, UK) was added and incubated overnight at 4 °C. Detection was performed using Alexa 488 secondary antibody (CS-4412, Cell Signaling Technology). Fluorescent images were obtained using a microscope with a DAPI-FITC dual excitation filter (Echo Revolve Fluorescence Microscope, San Diego, CA, USA).

4.7 Western Blot

Gingival fibroblasts were serum-starved, pre-treated with 20 µg/mL TA overnight, and exposed to 10 ng/mL IL1 β and TNF α for 1 h. Extracts containing SDS buffer with protease and phosphatase inhibitors (cOmplete ULTRA Tablets and PhosSTOP; Roche, Mannheim, Germany) were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF mem-branes (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Membranes were blocked, and the binding of the primary antibody phosphor- ERK and ERK (SCBT; #7383, #81459), phosphor-p38 and p38 (Santa Cruz Biotechnology, SCBT; #4511, #535), phosphor-JNK and JNK (SCBT; #6254, #7345), and phosphor-NF κ B-p65 and NF κ B-p65 (Cell Signaling Technology; #3033, #8242) were detected with the appropriate secondary antibody labeled with HRP (CS-7074; Cell Signaling Technology, Cambridge, UK). After

exposure to the clear western ECL sub-strate, chemiluminescence signals were visualized with a ChemiDoc imaging system. For densitometric analysis of blots, the images were analyzed using Image Lab software 3.0.1 (all Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

4.8 Mitochondrial Reactive Oxygen Species Release

Gingival fibroblast cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/cm² in 96-well plates. The following day, the cells were treated according to the standard stimulation protocol with TA and subsequently exposed to 100 μ M H₂O₂ (Sigma-Aldrich) [27,61] and to 10 ng/mL IL1 β and TNF α [27,53,62,63] overnight. Following the manufacturer's instructions, the release of the mitochondrial reactive oxygen species (ROS) was assessed using MitoROSTM 580 (AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA, USA).

4.9 Statistical Analysis

All experiments were conducted at least three times, with each data point representing an independent experiment. Statistical analysis was performed using a ratio-paired *t*-test for single comparisons. All analyses were carried out using Prism V9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), with significance set at $p < 0.05$.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms26125578/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, R.G., L.P., N.d.S.S.; methodology N.d.S.S., L.P., L.W., A.I., O.A.P.V., H.R.; contributed to the acquisition of the material, R.G., L.P., L.W.; software N.d.S.S., L.P., R.G.; validation L.P., R.G.; formal analysis, N.d.S.S., L.P., R.G.; investigation N.d.S.S., R.G., L.P., L.W., A.I., O.A.P.V.; data curation, R.G. and L.P.; writing—original draft preparation, R.G., and N.d.S.S.; writing—review and editing, R.G., L.P.; visualization, L.P., R.G.; supervision, R.G., L.P.; project administration, R.G. and L.P.; funding acquisition, N.d.S.S., F.Á.S., I.R.G.J.; All authors have approved the publication of the version and agree to be responsible for all aspects of the work to ensure that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: N.d.S.S. received funding from the Federal Agency for Graduate Support and Evaluation (CAPES-Edital n° 41/2017) from 01/04/2023 to 31/10/2023 through the CAPES-Print Program; process n° 88887.899928/2023-00 from 01/11/2024 to 31/10/2024, under the supervision of R.G. and L.P. at the Medical University of Vienna.

Institutional Review Board Statement: Primary human gingival fibroblasts were isolated from explant cultures of three independent donors, following approval by the Ethics Committee of the Medical University of Vienna (EC No. 631/2007).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original data from this study are provided in the article and the Supplementary Materials section. For additional information, please contact the corresponding author.

Acknowledgments: The authors have reviewed and edited the output and take full responsibility for the content of this publication.

Conflicts of Interest: Author Reinhard Gruber was employed by the company Austrian Cluster for Tissue Regeneration. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

1. Scannapieco, F.A.; Cantos, A. Oral Inflammation and Infection, and Chronic Medical Diseases: Implications for the Elderly. *Periodontol. 2000* **2016**, *72*, 153–175. [[CrossRef](#)]
2. Kinane, D.F.; Stathopoulou, P.G.; Papapanou, P.N. Periodontal Diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17038. [[CrossRef](#)]
3. Shen, L.; Hu, J.; Yuan, Y.; Wang, X.; Jiang, Q. Photothermal-Promoted Multi-Functional Gallic Acid Grafted Chitosan Hydrogel Containing Tannic Acid Miniaturized Particles for Peri-Implantitis. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *253*, 127366. [[CrossRef](#)]
4. Shang, J.; Liu, H.; Zheng, Y.; Zhang, Z. Role of Oxidative Stress in the Relationship between Periodontitis and Systemic Diseases. *Front. Physiol.* **2023**, *14*, 1210449. [[CrossRef](#)]
5. Renvert, S.; Persson, G.R.; Pirih, F.Q.; Camargo, P.M. Peri-Implant Health, Peri-Implant Mucositis, and Peri-Implantitis: Case Definitions and Diagnostic Considerations. *J. Periodontol.* **2018**, *89* (Suppl. S1), S304–S312. [[CrossRef](#)]
6. Fürst, M.M.; Salvi, G.E.; Lang, N.P.; Persson, G.R. Bacterial Colonization Immediately after Installation on Oral Titanium Implants. *Clin. Oral. Implant. Res.* **2007**, *18*, 501–508. [[CrossRef](#)]
7. Belibasakis, G.N.; Manoil, D. Microbial Community-Driven Etiopathogenesis of Peri-Implantitis. *J. Dent. Res.* **2021**, *100*, 21–28. [[CrossRef](#)]
8. Renvert, S.; Roos-Jansåker, A.-M.; Claffey, N. Non-Surgical Treatment of Peri-Implant Mucositis and Peri-Implantitis: A Literature Review. *J. Clin. Periodontol.* **2008**, *35*, 305–315. [[CrossRef](#)]
9. Li, D.; Tan, X.; Zheng, L.; Tang, H.; Hu, S.; Zhai, Q.; Jing, X.; Liang, P.; Zhang, Y.; He, Q.; et al. A Dual-Antioxidative Coating on Transmucosal Component of Implant to Repair Connective Tissue Barrier for Treatment of Peri-Implantitis. *Adv. Healthc. Mater.* **2023**, *12*, e2301733. [[CrossRef](#)]
10. Williams, D.W.; Greenwell-Wild, T.; Brenchley, L.; Dutzan, N.; Overmiller, A.; Sawaya, A.P.; Webb, S.; Martin, D.; NIDCD/NIDCR Genomics and Computational Biology Core; Hajishengallis, G.; et al. Human Oral Mucosa Cell Atlas Reveals a Stromal-Neutrophil Axis Regulating Tissue Immunity. *Cell* **2021**, *184*, 4090–4104.e15. [[CrossRef](#)]
11. Li, J.; Ye, L.J.; Dai, Y.W.; Wang, H.W.; Gao, J.; Shen, Y.H.; Wang, F.; Dai, Q.G.; Wu, Y.Q. Single-Cell Analysis Reveals a Unique Microenvironment in Peri-Implantitis. *J. Clin. Periodontol.* **2024**, *51*, 1665–1676. [[CrossRef](#)]
12. Easter, Q.T.; Fernandes Matuck, B.; Beldorati Stark, G.; Worth, C.L.; Predeus, A.V.; Fremin, B.; Huynh, K.; Ranganathan, V.; Ren, Z.; Pereira, D.; et al. Single-Cell and Spatially Resolved Interactomics of Tooth-Associated Keratinocytes in Periodontitis. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 5016. [[CrossRef](#)]
13. Jiang, W.; Xu, T.; Song, Z.; Wang, X.; Yuan, S.; Li, Q.; Wei, Y.; Wang, C.; Yang, G.; Cao, J.; et al. CCL2 Is a Key Regulator and Therapeutic Target for Periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **2023**, *50*, 1644–1657. [[CrossRef](#)]
14. Alassy, H.; Parachuru, P.; Wolff, L. Peri-Implantitis Diagnosis and Prognosis Using Biomarkers in Peri-Implant Crevicular Fluid: A Narrative Review. *Diagnostics* **2019**, *9*, 214. [[CrossRef](#)]
15. Aleksandrowicz, P.; Brzezińska-Błaszczyk, E.; Kozłowska, E.; Z'elechowska, P.; Borgonovo, A.E.; Agier, J. Analysis of IL-1 β , CXCL8, and TNF- α Levels in the Crevicular Fluid of Patients with Periodontitis or Healthy Implants. *BMC Oral. Health* **2021**, *21*, 120. [[CrossRef](#)]
16. Gonz  les, J.R.; Herrmann, J.M.; Boedeker, R.H.; Francz, P.I.; Biesalski, H.; Meyle, J. Concentration of Interleukin-1beta and Neutrophil Elastase Activity in Gingival Crevicular Fluid during Experimental Gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* **2001**, *28*, 544–549. [[CrossRef](#)]
17. Jing, W.; Xiaolan, C.; Yu, C.; Feng, Q.; Haifeng, Y. Pharmacological Effects and Mechanisms of Tannic Acid. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *154*, 113561. [[CrossRef](#)]
18. Mohammadzadeh, V.; Mahmoudi, E.; Ramezani, S.; Navaeian, M.; Taheri, R.A.; Ghorbani, M. Design of a Novel Tannic Acid Enriched Hemostatic Wound Dressing Based on Electrospun Polyamide-6/Hydroxyethyl Cellulose Nanofibers. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2023**, *86*, 104625. [[CrossRef](#)]
19. Wekwejt, M.; Ma  lek, M.; Ronowska, A.; Michno, A.; Pa  ubicka, A.; Zasada, L.; Klimek, A.; Kaczmarek-Szczepa  nska, B. Hyaluronic Acid/Tannic Acid Films for Wound Healing Application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *254*, 128101. [[CrossRef](#)]
20. Wu, Y.; Zhong, L.; Yu, Z.; Qi, J. Anti-Neuroinflammatory Effects of Tannic Acid against Lipopolysaccharide-Induced BV2 Microglial Cells via Inhibition of NF-  B Activation. *Drug Dev. Res.* **2019**, *80*, 262–268. [[CrossRef](#)]
21. Xu, J.; Li, Y.; Chen, Y.; Wang, L.; Liao, M. Preparation and Characterization of a Novel Polysialic Acid/Gelatin Composite Hydrogels Cross-Linked by Tannic Acid to Improve Wound Healing after Cesarean Section Dressing. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2021**, *32*, 1927–1943. [[CrossRef](#)]
22. de Veras, B.O.; da Silva, M.V.; Cabral Ribeiro, P.P. Tannic Acid Is a Gastroprotective That Regulates Inflammation and Oxidative Stress. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *156*, 112482. [[CrossRef](#)]
23. Song, D.; Zhao, J.; Deng, W.; Liao, Y.; Hong, X.; Hou, J. Tannic Acid Inhibits NLRP3 Inflammasome-Mediated IL-1 β Production via Blocking NF-  B Signaling in Macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *503*, 3078–3085. [[CrossRef](#)]
24. Lee, H.-R.; Jeong, Y.-J.; Lee, J.-W.; Jhun, J.; Na, H.S.; Cho, K.-H.; Kim, S.J.; Cho, M.-L.; Heo, T.-H. Tannic Acid, an IL-1 β -Direct Binding Compound, Ameliorates IL-1 β -Induced Inflammation and Cartilage Degradation by Hindering IL-1 β -IL-1R1 Interaction. *PLoS ONE* **2023**, *18*, e0281834. [[CrossRef](#)]
25. Chen, Y.; Tian, L.; Yang, F.; Tong, W.; Jia, R.; Zou, Y.; Yin, L.; Li, L.; He, C.; Liang, X.; et al. Tannic Acid Accelerates Cutaneous Wound Healing in Rats Via Activation of the ERK 1/2 Signaling Pathways. *Adv. Wound Care* **2019**, *8*, 341–354. [[CrossRef](#)]
26. Sivanantham, A.; Pattarayan, D.; Rajasekar, N.; Kannan, A.; Loganathan, L.; Bethunaickan, R.; Mahapatra, S.K.; Palanichamy, R.;

- Muthusamy, K.; Rajasekaran, S. Tannic Acid Prevents Macrophage-Induced pro-Fibrotic Response in Lung Epithelial Cells via Suppressing TLR4-Mediated Macrophage Polarization. *Inflamm. Res.* **2019**, *68*, 1011–1024. [\[CrossRef\]](#)
27. Tsai, K.-F.; Shen, C.-J.; Cheung, C.-W.; Wang, T.-L.; Chow, L.W.C.; Leung, Y.-M.; Wong, K.-L. Lipotoxicity in Human Lung Alveolar Type 2 A549 Cells: Mechanisms and Protection by Tannic Acid. *Chin. J. Physiol.* **2021**, *64*, 289–297. [\[CrossRef\]](#)
 28. Liu, Y.; Zhu, M.; Ou, J.; Li, K.; Ju, X.; Tian, Y.; Niu, Z. Multi-Responsive Sodium Hyaluronate/Tannic Acid Hydrogels with ROS Scavenging Ability Promote the Healing of Diabetic Wounds. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *278*, 134896. [\[CrossRef\]](#)
 29. Qin, J.; Li, Z.; Feng, Y.; Guo, Y.; Zhao, Z.; Sun, S.; Zheng, J.; Zhang, M.; Zhang, J.; Zhang, Y.; et al. Reactive Oxygen Species-Scavenging Mesoporous Poly(Tannic Acid) Nanospheres Alleviate Acute Kidney Injury by Inhibiting Ferroptosis. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2024**, *10*, 5856–5868. [\[CrossRef\]](#)
 30. Yeo, J.; Lee, J.; Yoon, S.; Kim, W.J. Tannic Acid-Based Nanogel as an Efficient Anti-Inflammatory Agent. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 1148–1159. [\[CrossRef\]](#)
 31. Lengert, E.V.; Savkina, A.A.; Ermakov, A.V.; Saveleva, M.S.; Lagutina, D.D.; Stepanova, T.V.; Ivanov, A.N. Influence of the New Formulation Based on Silver Alginate Microcapsules Loaded with Tannic Acid on the Microcirculation of the Experimental Periodontitis in Rats. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2021**, *126*, 112144. [\[CrossRef\]](#)
 32. Chen, C.; Yang, H.; Yang, X.; Ma, Q. Tannic Acid: A Crosslinker Leading to Versatile Functional Polymeric Networks: A Review. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 7689–7711. [\[CrossRef\]](#)
 33. Baldwin, A.; Booth, B.W. Biomedical Applications of Tannic Acid. *J. Biomater. Appl.* **2022**, *36*, 1503–1523. [\[CrossRef\]](#)
 34. Jafari, H.; Ghaffari-Bohloul, P.; Niknezhad, S.V.; Abedi, A.; Izadifar, Z.; Mohammadinejad, R.; Varma, R.S.; Shavandi, A. Tannic Acid: A Versatile Polyphenol for Design of Biomedical Hydrogels. *J. Mater. Chem. B* **2022**, *10*, 5873–5912. [\[CrossRef\]](#)
 35. Yue, J.; Liu, Z.; Wang, L.; Wang, M.; Pan, G. Recent Advances in Bioactive Hydrogel Microspheres: Material Engineering Strategies and Biomedical Prospects. *Mater. Today Bio* **2025**, *31*, 101614. [\[CrossRef\]](#)
 36. Mahdi, M.H.; Conway, B.R.; Mills, T.; Smith, A.M. Gellan Gum Fluid Gels for Topical Administration of Diclofenac. *Int. J. Pharm.* **2016**, *515*, 535–542. [\[CrossRef\]](#)
 37. Osmalek, T.; Froelich, A.; Milanowski, B.; Bialas, M.; Hyla, K.; Szybowicz, M. pH-Dependent Behavior of Novel Gellan Beads Loaded with Naproxen. *Curr. Drug Deliv.* **2018**, *15*, 52–63. [\[CrossRef\]](#)
 38. Wang, L.; Dos Santos Sanches, N.; Panahipour, L.; Imani, A.; Yao, Y.; Zhang, Y.; Li, L.; Gruber, R. Dimethyl Fumarate-Loaded Gellan Gum Hydrogels Can Reduce In Vitro Chemokine Expression in Oral Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 9485. [\[CrossRef\]](#)
 39. Musazzi, U.M.; Cencetti, C.; Franzé, S.; Zoratto, N.; Di Meo, C.; Procacci, P.; Matricardi, P.; Cilurzo, F. Gellan Nanohydrogels: Novel Nanodelivery Systems for Cutaneous Administration of Piroxicam. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 1028–1036. [\[CrossRef\]](#)
 40. Ng, J.Y.; Zhu, X.; Mukherjee, D.; Zhang, C.; Hong, S.; Kumar, Y.; Gokhale, R.; Ee, P.L.R. Pristine Gellan Gum–Collagen Interpenetrating Network Hydrogels as Mechanically Enhanced Anti-Inflammatory Biologic Wound Dressings for Burn Wound Therapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4*, 1470–1482. [\[CrossRef\]](#)
 41. Spera, R. Gellan Gum for Tissue Engineering Applications: A Mini Review. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* **2018**, *7*, 1241–2574. [\[CrossRef\]](#)
 42. Wang, F.; Li, S.; Wang, X.; Yang, Q.; Duan, J.; Yang, Y.; Mu, H. Gellan Gum-Based Multifunctional Hydrogel with Enduring Sterilization and ROS Scavenging for Infected Wound Healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *282*, 136888. [\[CrossRef\]](#)
 43. Scalia, F.; Vitale, A.M.; Picone, D.; De Cesare, N.; Swiontek Brzezinska, M.; Kaczmarek-Szczepanska, B.; Ronca, A.; Zavan, B.; Bucchieri, F.; Szychlinska, M.A.; et al. Exploring Methacrylated Gellan Gum 3D Bioprinted Patches Loaded with Tannic Acid or L-Ascorbic Acid as Potential Platform for Wound Dressing Application. *Gels* **2025**, *11*, 40. [\[CrossRef\]](#)
 44. Panahipour, L.; Abbasabadi, A.O.; Gruber, R. Oral Cell Lysates Reduce the Inflammatory Response of Activated Macrophages. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 1701. [\[CrossRef\]](#)
 45. Liu, F.; Sheng, S.; Shao, D.; Xiao, Y.; Zhong, Y.; Zhou, J.; Quek, C.H.; Wang, Y.; Dawulieti, J.; Yang, C.; et al. Targeting Multiple Mediators of Sepsis Using Multifunctional Tannic Acid-Zn²⁺-Gentamicin Nanoparticles. *Matter* **2021**, *4*, 3677–3695. [\[CrossRef\]](#)
 46. Frasheri, I.; Heym, R.; Ern, C.; Summer, B.; Hennessen, T.G.; Högg, C.; Reichl, F.-X.; Folwaczny, M. Salivary and Gingival CXCL8 Correlation with Periodontal Status, Periodontal Pathogens, and Smoking. *Oral Dis.* **2022**, *28*, 2267–2276. [\[CrossRef\]](#)
 47. Imani, A.; Panahipour, L.; Dos Santos Sanches, N.; Wang, L.; Gruber, R. Platelet-Rich Fibrin Increases CXCL8 Expression in Gingival Fibroblasts. *Biomedicines* **2024**, *12*, 1326. [\[CrossRef\]](#)
 48. Bond, M.; Chase, A.J.; Baker, A.H.; Newby, A.C. Inhibition of Transcription Factor NF-kappaB Reduces Matrix Metalloproteinase-1, -3 and -9 Production by Vascular Smooth Muscle Cells. *Cardiovasc. Res.* **2001**, *50*, 556–565. [\[CrossRef\]](#)
 49. Daré, R.G.; Nakamura, C.V.; Ximenes, V.F.; Lautenschlager, S.O.S. Tannic Acid, a Promising Anti-Photoaging Agent: Evidences of Its Antioxidant and Anti-Wrinkle Potentials, and Its Ability to Prevent Photodamage and MMP-1 Expression in L929 Fibroblasts Exposed to UVB. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *160*, 342–355. [\[CrossRef\]](#)
 50. Chiang, Y.-T.; Xiao, Y.-B.; Hsu, S.-H.; Chang, S.-W.; Chou, C.-C. Molecular Interactions of Tannic Acid and Matrix Metalloproteinases 2 and 9. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2023**, *21*, 2792–2800. [\[CrossRef\]](#)
 51. Park, H.J.; Kim, H.J.; Kwon, H.J.; Lee, J.Y.; Cho, B.K.; Lee, W.J.; Yang, Y.; Cho, D.H. UVB-Induced Interleukin-18 Production is Downregulated by Tannic Acids in Human HaCaT Keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2006**, *15*, 589–595. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 52. Azimullah, S.; Meeran, M.F.N.; Ayoob, K.; Arunachalam, S.; Ojha, S.; Beiram, R. Tannic Acid Mitigates Rotenone-Induced Dopaminergic Neurodegeneration by Inhibiting Inflammation, Oxidative Stress, Apoptosis, and Glutamate Toxicity in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9876. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 53. Meier, B.; Radeke, H.H.; Selle, S.; Younes, M.; Sies, H.; Resch, K.; Habermehl, G.G. Human Fibroblasts Release Reactive Oxygen

- Species in Response to Interleukin-1 or Tumour Necrosis Factor-Alpha. *Biochem. J.* **1989**, 263, 539–545. [[CrossRef](#)]
54. Son, Y.; Kim, S.; Chung, H.-T.; Pae, H.-O. Reactive Oxygen Species in the Activation of MAP Kinases. *Methods Enzymol.* **2013**, 528, 27–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 55. Zhou, Z.; Xiao, J.; Guan, S.; Geng, Z.; Zhao, R.; Gao, B. A Hydrogen-Bonded Antibacterial Curdlan-Tannic Acid Hydrogel with an Antioxidant and Hemostatic Function for Wound Healing. *Carbohydr. Polym.* **2022**, 285, 119235. [[CrossRef](#)]
 56. Guo, Z.; Xie, W.; Lu, J.; Guo, X.; Xu, J.; Xu, W.; Chi, Y.; Takuya, N.; Wu, H.; Zhao, L. Tannic Acid-Based Metal Phenolic Networks for Bio-Applications: A Review. *J. Mater. Chem. B* **2021**, 9, 4098–4110. [[CrossRef](#)]
 57. Tikoo, K.; Bhatt, D.K.; Gaikwad, A.B.; Sharma, V.; Kabra, D.G. Differential Effects of Tannic Acid on Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. *FEBS Lett.* **2007**, 581, 2027–2035. [[CrossRef](#)]
 58. Jin, W.; Xue, Y.; Xue, Y.; Han, X.; Song, Q.; Zhang, J.; Li, Z.; Cheng, J.; Guan, S.; Sun, S.; et al. Tannic Acid Ameliorates Arsenic Trioxide-Induced Nephrotoxicity, Contribution of NF- κ B and Nrf2 Pathways. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, 126, 110047. [[CrossRef](#)]
 59. Zhang, X.; Liu, K.; Qin, M.; Lan, W.; Wang, L.; Liang, Z.; Li, X.; Wei, Y.; Hu, Y.; Zhao, L.; et al. Abundant Tannic Acid Modified Gelatin/Sodium Alginate Biocomposite Hydrogels with High Toughness, Antifreezing, Antioxidant and Antibacterial Properties. *Carbohydr. Polym.* **2023**, 309, 120702. [[CrossRef](#)]
 60. Cvikl, B.; Lussi, A.; Moritz, A.; Sculean, A.; Gruber, R. Sterile-Filtered Saliva Is a Strong Inducer of IL-6 and IL-8 in Oral Fibroblasts. *Clin. Oral Investig.* **2015**, 19, 385–399. [[CrossRef](#)]
 61. Ransy, C.; Vaz, C.; Lombès, A.; Bouillaud, F. Use of H₂O₂ to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 9149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 62. Yang, D.; Elner, S.G.; Bian, Z.-M.; Till, G.O.; Petty, H.R.; Elner, V.M. Pro-Inflammatory Cytokines Increase Reactive Oxygen Species through Mitochondria and NADPH Oxidase in Cultured RPE Cells. *Exp. Eye Res.* **2007**, 85, 462–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 63. Wu, L.; Pan, Y. Reactive Oxygen Species Mediate TNF- α -Induced Inflammatory Response in Bone Marrow Mesenchymal Cells. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2019**, 22, 1296–1301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.