

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o
texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir de
03/06/2026.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Laís Medeiros Cardoso

**Bisfosfonatos e implantodontia: efeito de inibidores de metaloproteinases
da matriz em modelo *in vitro***

Araraquara

2024



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Laís Medeiros Cardoso

Bisfosfonatos e implantodontia: efeito de inibidores de metaloproteinases da matriz em modelo *in vitro*

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Gonçalves Basso

Araraquara

2024

C268b Cardoso, Laís Medeiros
Bisfosfonatos e implantodontia: efeito de inibidores de metaloproteinases da matriz em modelo in vitro / Laís Medeiros Cardoso. -- Araraquara, 2024
62 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Fernanda Gonçalves Basso

1. Fibroblastos. 2. Osteoblastos. 3. Ácido zoledrônico. 4. Implantes dentários. 5. Metaloproteinases da matriz. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Laís Medeiros Cardoso

Bisfosfonatos e implantodontia: efeito de inibidores de metaloproteinases da matriz em modelo *in vitro*

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora em Odontologia

Presidente e Orientador: Prof^a. Dr^a. Fernanda Gonçalves Basso

2º examinador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

3º examinador: Prof^a. Dr^a. Roberta Okamoto

4º examinador: Prof^a. Dr^a. Telma Blanca Lombardo Bedran

Araraquara, 03 de junho de 2024.

DADOS CURRICULARES

Laís Medeiros Cardoso

NASCIMENTO: 21 de janeiro de 1994, Matão, São Paulo.

FILIAÇÃO: Susana Maria de Medeiros
Edson Wilson Cardoso

2012/2016: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2017/2019: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral (Área de Concentração em Prótese) – Nível Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2019/2024: Curso de Pós-Graduação em Odontologia (Área de Concentração em Reabilitação Oral) – Nível Doutorado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2022/2023: Doutorado Sanduíche na University of Michigan/School of Dentistry (USA)

Dedico este trabalho à minha família que esteve presente em todos os momentos,
me apoiando e inspirando.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo presente da vida e por todas as oportunidades que me foram dadas.

À minha **mãe Susana**, que sempre me guiou e inspirou nas escolhas de minha vida. Obrigada pelo apoio incondicional e por acreditar nos meus sonhos.

À minha **vó Maria Aparecida** e **irmã Beatriz**, pela força, carinho e amparo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu **pai Edson**, que me apoiou durante essa jornada com carinho.

À minha orientadora **Profª. Drª. Fernanda Gonçalves Basso**, pela paciência, confiança, incentivo, amizade e ensinamentos, contribuindo para meu crescimento profissional. Muito obrigada por me apresentar em 2013 o universo da pesquisa científica e estar presente em minha vida desde então, sendo um exemplo admirável de pessoa, pesquisadora e professora.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa** e à **Profª. Drª. Josimeri Hebling**, por todo o apoio profissional, pelos ensinamentos, orientação e paciência.

À **Profª. Drª. Taisa Nogueira Pansani**, pela dedicação, inspiração, amizade e disposição em sempre me ajudar durante todos esses anos.

Ao **Prof. Dr. Marco Cícero Bottino**, por me receber e acolher durante o período de Doutorado sanduíche na University of Michigan, seu apoio e orientação foram essenciais para o meu crescimento profissional e para o desenvolvimento de um trabalho inovador. Essa experiência internacional contribuiu imensamente para meu desenvolvimento como pesquisadora.

Aos meus amigos do Doutorado sanduíche na University of Michigan, que tornaram a jornada mais fácil e leve, especialmente **Abdel, Ana Beatriz, Carolina, Caroline, Gabriel, Luan e Renan**.

Às minhas amigas **Mariely e Ana Clara**, pela amizade de longa data e apoio durante o Doutorado.

Ao **Julio**, pelo apoio e incentivo durante a realização do Doutorado.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, nas pessoas da atual Diretora **Profª. Drª. Patrícia P. Nordi Sasso Garcia** e Vice-diretora **Profª. Drª. Elaine Pereira da Silva Tagliaferro**.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, representada pelo Coordenador **Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri** e pela Vice-coordenadora **Profª. Drª Morgana Rodrigues Guimarães-Stabili**.

Aos **Professores** do Programa de Odontologia (Área de Concentração em Reabilitação Oral) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pelos ensinamentos e experiências vividas.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, **Alessandra, Cristiano e José Alexandre** por serem sempre pacientes e prestativos.

À todos os funcionários da **Biblioteca**, pela atenção e revisão desta dissertação.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/11211-6 Auxílio Pesquisa; 2019/16886-4 Bolsa Doutorado; 22/03788-7 Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior - Doutorado), pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

À **CAPES**: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo financiamento à esta pesquisa (CNPq 302108/2019-0 – PQ2).

A todos, que de alguma maneira contribuíram para a conquista dessa etapa em minha vida, muito obrigada.

*“It is good to love many things, for therein lies true strength;
whosoever loves much, performs and can accomplish much, and what
is done in love is well done.”*

*Vincent van Gogh**

* Van Gogh V. The complete letters of Vincent van Gogh. 2nd edition. Connecticut/USA: New York Graphic Society; 1959.

Cardoso LM. Bisfosfonatos e implantodontia: efeito de inibidores de metaloproteinases da matriz em modelo *in vitro* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

RESUMO

O uso de bisfosfonatos (BFs) é indicado para o tratamento de doenças ósseas neoplásicas e metabólicas, controlando a reabsorção do tecido ósseo. Esses medicamentos apresentam alta capacidade de adesão aos tecidos mineralizados e, a partir de um evento traumático e/ou inflamatório, podem ser liberados. A instalação de implantes dentais osseointegrados em pacientes em tratamento com BF é controversa, pois a indução de um evento traumático no local pode desencadear áreas de osteonecrose. A super-expressão de enzimas metaloproteinases da matriz (MMPs) por células da mucosa oral e osteoblastos em contato com bisfosfonatos, também pode interferir negativamente na osseointegração e formação do selamento biológico dos implantes. Assim, a modulação da atividade das MMPs poderia favorecer tais eventos teciduais. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de dois inibidores de MMPs – Proantocianidinas (PA) (extrato natural da semente de uva *Vitis vinífera*) e Naringenina (NA) (sintética), no controle da síntese e atividade dessas enzimas por fibroblastos gengivais humanos (HGF) e osteoblastos (Ob; Saos-2) cultivados sobre superfícies de titânio e tratados com o BF ácido zoledrônico (AZ). Discos de titânio foram individualmente acondicionados em placas de cultura de células, e sobre estes, foram cultivados HGF ou Ob em meio de cultura DMEM + 10% de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com concentração não citotóxica de PA ou NA, previamente definida, por 24 horas, seguido da adição do AZ (5 µM) em DMEM sem SFB. Após diferentes períodos de contato, foram avaliadas a adesão e proliferação celular (microscopia de fluorescência direta), síntese de MMP-2 e MMP-9, bem como dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP)-1 e TIMP-2 (ELISA) e atividade gelatinolítica (zimografia *in situ*). A capacidade de mineralização pelos Ob foi avaliada por meio da atividade de fosfatase alcalina (ALP) após 7 dias de cultura. Os dados foram analisados pelos testes one-way ANOVA e Tukey post-hoc ($\alpha = 0,05$). O tratamento com AZ prejudicou a adesão e proliferação celular, além de aumentar a síntese ($p < 0,05$) e a atividade das MMPs; o pré-tratamento com os flavonoides controlou os efeitos gelatinolíticos induzidos pelo AZ, regulando negativamente a síntese e atividade de MMPs ($p < 0,05$) por HGF e Ob, além de favorecer a adesão e proliferação dessas células. Para HGF, o pré-tratamento com NA e PA não regulou positivamente a síntese de TIMP após exposição ao AZ ($p > 0,05$); para Ob, o TIMP-2 foi regulada positivamente ($p < 0,05$) pelos flavonoides, seguido de exposição ao AZ. A atividade de ALP em Ob foi marcadamente diminuída pelo AZ e o pré-tratamento com NA modulou levemente esse efeito ($p < 0,05$). Portanto, o pré-tratamento com os flavonoides investigados promove resultados interessantes na modulação dos efeitos deletérios do AZ, favorecendo a adesão e proliferação celular, regulando negativamente a síntese e atividade de MMP-2 e MMP-9 por HGF e Ob e regulando positivamente o TIMP-2 por Ob.

Palavras-chave: Fibroblastos. Osteoblastos. Ácido zoledrônico. Implantes dentários. Metaloproteinases da matriz. Flavonoides.

Cardoso LM. Bisphosphonates and implantodontology: effect of matrix metalloproteinases inhibitors in *in vitro* model [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

ABSTRACT

Bisphosphonates (BPs) are used to treat neoplastic and metabolic bone diseases, controlling bone tissue resorption. These medications have high adhesion capacity to mineralized tissues and, from a traumatic and/or inflammatory event, can be released. Osseointegrated dental implants installation in patients undergoing BP treatment is uncertain, since a local traumatic event induction may trigger areas of osteonecrosis. Overexpression of matrix metalloproteinases (MMPs) enzymes by oral mucosal cells and osteoblasts in contact with bisphosphonates may also negatively interfere with osseointegration and biological sealing of dental implants. Thus, modulation of MMPs activity could improve such tissue events. The aim of this study was to evaluate the potential of two MMPs inhibitors – Proanthocyanidins (PA) (natural grape seed extract from *Vitis vinifera*) and Naringenin (NA) (synthetic), on controlling of these enzymes synthesis and activity by human gingival fibroblasts (HGF) and osteoblasts (Ob; Saos-2) seeded on titanium surfaces and treated with zoledronic acid (ZA) BP. Titanium discs were individually placed on cell culture plates, and HGF or Ob were seeded on the discs in DMEM culture medium + 10% fetal bovine serum (FBS) for 24 hours. Then, the cells were treated with non-cytotoxic concentration of PA and NA, previously defined, for 24 hours, followed by the addition of ZA (5 μ M) in DMEM serum free. After different time-points of ZA contact, cells adhesion and proliferation (direct fluorescence microscopy), synthesis of MMP-2 and MMP-9, as well as tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 (ELISA), and gelatinolytic activity (*in situ* zymography) by HGF and Ob were evaluated. Ob mineralization capacity was assessed by alkaline phosphatase (ALP) activity after 7 days of culture. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey post-hoc tests ($\alpha = 0.05$). The treatment with ZA impaired cell adhesion and proliferation, as well as increased the synthesis ($p < 0.05$) and activity of MMPs; the pre-treatment with flavonoids controlled the gelatinolytic effects induced by ZA, negatively regulating the synthesis and activity of MMPs ($p < 0.05$) by HGF and Ob, moreover, cells adhesion and proliferation was favored by flavonoids pre-treatment. For HGF, the pre-treatment with NA and PA did not upregulate TIMP synthesis after exposure to ZA ($p > 0.05$); for Ob, TIMP-2 was upregulated ($p < 0.05$) by flavonoids, followed by exposure to ZA. ALP activity in Ob was markedly decreased by ZA and NA pre-treatment slightly modulated this effect ($p < 0.05$). Therefore, the pre-treatment with the investigated flavonoids promotes interesting results in modulating the deleterious effects of ZA, favoring cell adhesion and proliferation, downregulating the synthesis and activity of MMP-2 and MMP-9 by HGF and Ob and upregulating TIMP- 2 by Ob.

Keywords: Fibroblasts. Osteoblasts. Zoledronic acid. Dental implants. Matrix metalloproteinases. Flavonoids.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 PROPOSIÇÃO.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
4 MATERIAL E MÉTODO.....	22
4.1 Preparo de discos de titânio (Ti) e padronização de rugosidade para modelo <i>in vitro</i> de superfície de implante dentário.....	22
4.2 Cultura de fibroblastos de gengiva humana e osteoblastos.....	22
4.3 Modelo <i>in vitro</i> de superfície de implante dentário.....	23
4.4 Análise da viabilidade celular para seleção de concentração não-citotóxica de NA e PA.....	24
4.5 Design experimental.....	25
4.6 Análise da síntese de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2.....	26
4.7 Análise da atividade gelatinolítica.....	28
4.8 Análise da adesão celular.....	28
4.9 Análise da proliferação celular.....	29
4.10 Análise da atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	29
4.11 Análise estatística.....	29
5 RESULTADO.....	31
5.1 Seleção de concentração não-citotóxica de NA e PA sobre cultura de osteoblastos.....	31
5.2 Seleção do tempo de avaliação para as os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs).....	32
5.3 Análise da rugosidade superficial dos discos de Ti.....	33
5.4 Efeito do pré-tratamento com NA e PA na síntese de MMPs e TIMPs.....	34
5.5 Análise da atividade gelatinolítica.....	37
5.6 Análise da adesão celular.....	38
5.7 Análise da proliferação celular.....	40

5.8 Análise da atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	41
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO A	59

1 INTRODUÇÃO

O ácido zoledrônico (AZ) é um bisfosfonato (BF) de uso intravenoso com potente ação farmacológica e afinidade aos ossos, especialmente aos ossos maxilares, onde um alto metabolismo ósseo é observado¹. Esse fármaco é recomendado para o tratamento da osteoporose, doença de Paget, tumor de célula gigante ósseo, hipercalcemia induzida por tumor, prevenção de metástases ósseas de tumores malignos e controle de mieloma múltiplo².

Dentre todos os BFs, o AZ apresenta a maior afinidade ao tecido ósseo e é comumente associado ao desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares associada à medicamentos (MRONJ)³⁻⁵. Essa condição patológica pode ser caracterizada clinicamente como osso exposto ou osso que pode ser sondado através de fístula(s) intraoral ou extraoral na região maxilofacial por mais de oito semanas, sem histórico de radioterapia nos maxilares ou doença metastática nos maxilares, associado a um tratamento atual ou anterior com agentes antirreabsortivos (como BFs) isoladamente ou em combinação com medicamentos imunomoduladores ou antiangiogênicos⁵. Embora o primeiro caso da MRONJ relacionada à BF tenha sido relatado em 2003⁶, a patogênese desta condição permanece incerta.

Os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da MRONJ incluem o tipo de BF utilizado (potência e via de administração), duração do tratamento, fatores locais (presença de infecção ou inflamação), cirurgia dentoalveolar (extração dentária ou colocação de implante dentário) e comorbidades sistêmicas^{5,7}. Assim, a indicação de colocação de implantes dentários osseointegrados em pacientes que usam AZ permanece controversa, pois a administração intravenosa desse BF pode aumentar as chances de um paciente desenvolver MRONJ desencadeada pela colocação de implantes^{7,8}. Além disso, foi demonstrado anteriormente que pacientes com implantes dentários osseointegrados que iniciam terapia intravenosa com BFs apresentam risco aumentado de desenvolver MRONJ⁹.

Consequentemente, pacientes com histórico de regime de BFs, independentemente de ser utilizado para tratamento de osteoporose ou malignidade óssea, apresentam risco de desenvolvimento de MRONJ após a colocação de implantes dentários⁸. Outro fato importante a ser considerado é a ausência de biomarcadores validados para indicar ou não a instalação de implantes em pacientes

sob regime de BFs, o que significa que nenhum marcador de remodelação óssea pode prever o risco de MRONJ⁵.

Embora o efeito do AZ nos osteoclastos tenha sido bem estabelecido, os seus efeitos em outros tipos de células ainda não foram totalmente elucidados. Estudos demonstraram que esse fármaco causa efeitos citotóxicos em osteoblastos, diminuindo a capacidade de mineralização dessas células, que estão diretamente envolvidas nos processos de síntese e mineralização da matriz óssea, além de efeitos inibitórios na diferenciação osteoblástica, o que pode favorecer o desenvolvimento de MRONJ^{10,11}. O papel dos tecidos moles na patogênese da MRONJ também foi avaliado, uma vez que as principais características desta condição são a perda de cobertura dos tecidos moles e exposição óssea¹². Assim, a toxicidade sobre tecidos moles dos BFs tem sido indicada como um possível fator capaz de favorecer a MRONJ.

Outrossim, investigações demonstraram que o AZ pode aumentar os níveis de metaloproteinases da matriz (MMPs) por fibroblastos gengivais em um modelo *in vitro* de superfície de implante dentário^{13,14}, em osso alveolar em um modelo *in vivo*¹⁵ e na saliva de pacientes que desenvolveram MRONJ¹⁶. Dessa forma, o aumento da síntese e atividade de MMPs pode contribuir para o estabelecimento de MRONJ em pacientes sob terapia com AZ. As MMPs são enzimas responsáveis pela degradação e renovação da maioria dos componentes da matriz extracelular (MEC), apresentando a capacidade de fragmentar colágenos fibrilares em condições fisiológicas normais; entretanto, em condições patológicas, como doenças periodontais, o desequilíbrio entre as MMPs e seus inibidores teciduais (TIMPs) aumenta a degradação da MEC e a destruição tecidual¹⁷. No tecido periodontal, os TIMPs não são suficientes para regular negativamente as MMPs patologicamente elevadas¹⁸; assim, diferentes estratégias para regulação de MMPs estão sendo investigadas, como o uso de flavonoides.

Os flavonoides são compostos bioativos que compõem uma importante classe de metabólitos secundários vegetais de baixo peso molecular, apresentando estrutura polifenólica e ocorrendo amplamente em frutas, vegetais, ervas, bebidas, especiarias e óleos¹⁹. Entre os diferentes flavonoides, o potencial da naringenina (NA) e das proantocianidinas (PA) na regulação das MMPs foi demonstrado em modelos pré-clínicos²⁰⁻²⁵, bem como seu potencial para promover aumento da viabilidade celular e modulação de mediadores pró-inflamatórios por fibroblastos gengivais e

queratinócitos orais^{24,25}. NA e PA são encontrados em diferentes fontes naturais e dependendo de sua origem, condições de cultivo, clima e protocolo de extração, esses flavonoides podem ter formulações diferentes, resultando em efeitos terapêuticos variáveis, o que pode resultar em resultados não padronizados²⁶. Assim, flavonoides cujas variáveis sintéticas podem ser obtidas comercialmente, como a NA, são candidatos interessantes para uso em análises biológicas.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos individuais do pré-tratamento com PA natural, do extrato da semente de uva da espécie *Vitis vinifera*, e NA sintética na adesão e proliferação celular, síntese de MMP-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B), TIMP-1 e TIMP-2, atividade gelatinolítica de MMPs por fibroblastos gengivais e osteoblastos humanos e atividade de fosfatase alcalina (ALP) por osteoblastos expostos ao AZ em um modelo *in vitro* de superfície de implante dentário.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o tratamento com AZ prejudicou a adesão e proliferação celular, aumentou significativamente a síntese e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 pelos HGF e Ob, induzindo também uma diminuição significativa de TIMP-1 e TIMP-2 pelos HGF, além de promover marcada diminuição de ALP pelos Ob. O pré-tratamento de células com NA e PA modulou os efeitos deletérios do AZ, melhorando a adesão e proliferação celular, regulando negativamente a síntese e atividade de MMP-2 e MMP-9 pelos HGF e Ob e aumentando a produção de TIMP-2 pelos Ob. Entretanto, o pré-tratamento com os flavonoides não foi capaz de contrapor os efeitos deletérios do AZ sobre a atividade de ALP pelos Ob.

REFERÊNCIAS*

1. Lawson MA, Xia Z, Barnett BL, Triffitt JT, Phipps RJ, Dunford JE, et al. Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 92(1): 149-55.
2. Nicolatou-Galitis O, Schiodt M, Mendes RA, Ripamonti C, Hope S, Drudge-Coates L, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: definition and best practice for prevention, diagnosis, and treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2019; 127(2): 117-35.
3. Bullock G, Miller CA, McKechnie A, Hearnden V. A review into the effects of pamidronic acid and zoledronic acid on the oral mucosa in medication-related osteonecrosis of the jaw. *Front Oral Health*. 2022; 2: 822411.
4. Granate-Marques A, Polis-Yanes C, Seminario-Amez M, Jane-Salas E, Lopez-Lopez J. Medication-related osteonecrosis of the jaw associated with implant and regenerative treatments: systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019; 24(2): e195-e203.
5. Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American association of oral and maxillofacial surgeons' position paper on medication-related osteonecrosis of the jaws-2022 update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2022; 80(5): 920-43.
6. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61(9): 1115-7.
7. Gelazius R, Poskevicius L, Sakavicius D, Grimuta V, Juodzbaly G. Dental implant placement in patients on bisphosphonate therapy: a systematic review. *J Oral Maxillofac Res*. 2018; 9(3): e2.
8. Sher J, Kirkham-Ali K, Luo JD, Miller C, Sharma D. Dental implant placement in patients with a history of medications related to osteonecrosis of the jaws: a systematic review. *J Oral Implantol*. 2021; 47(3): 249-68.
9. Giovannacci I, Meleti M, Manfredi M, Mortellaro C, Greco Lucchina A, Bonanini M, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw around dental implants: implant surgery-triggered or implant presence-triggered osteonecrosis? *J Craniofac Surg*. 2016; 27(3): 697-701.
10. Basso FG, Silveira Turrioni AP, Hebling J, de Souza Costa CA. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology*. 2013; 59(6): 534-41.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

11. Patntirapong S, Singhatanadgit W, Chanruangvanit C, Lavanrattanakul K, Satravaha Y. Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. *J Oral Pathol Med*. 2012; 41(9): 713-20.
12. Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone*. 2007; 41(3): 318-20.
13. Basso FG, Cardoso LM, Ribeiro IM, Rizzi E, Pansani TN, Hebling J, et al. Influence of bisphosphonates on oral implantology: sodium alendronate and zoledronic acid enhance the synthesis and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts seeded on titanium. *Arch Oral Biol*. 2021; 127: 105134.
14. Pansani TN, Cardoso LM, Augusto LA, Ribeiro IM, de Souza Costa CA, Basso FG. Effects of EGF-coated titanium surfaces on adhesion and metabolism of bisphosphonate-treated human keratinocytes and gingival fibroblasts. *Clin Oral Investig*. 2021; 25(10): 5775-84.
15. Basi DL, Hughes PJ, Thumbigere-Math V, Sabino M, Mariash A, Lunos SA, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in alveolar extraction sockets of zoledronic acid-treated rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011; 69(11): 2698-707.
16. Thumbigere-Math V, Michalowicz BS, de Jong EP, Griffin TJ, Basi DL, Hughes PJ, et al. Salivary proteomics in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Dis*. 2015; 21(1): 46-56.
17. Paiva KBS, Granjeiro JM. Matrix metalloproteinases in bone resorption, remodeling, and repair. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017; 148: 203-303.
18. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1996; 23(12): 1127-32.
19. Ramesh P, Jagadeesan R, Sekaran S, Dhanasekaran A, Vimalraj S. Flavonoids: classification, function, and molecular mechanisms involved in bone remodelling. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 779638.
20. Deziel BA, Patel K, Neto C, Gottschall-Pass K, Hurta RA. Proanthocyanidins from the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) inhibit matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in human prostate cancer cells via alterations in multiple cellular signalling pathways. *J Cell Biochem*. 2010; 111(3): 742-54.
21. Chang HL, Chang YM, Lai SC, Chen KM, Wang KC, Chiu TT, et al. Naringenin inhibits migration of lung cancer cells via the inhibition of matrix metalloproteinases-2 and -9. *Exp Ther Med*. 2017; 13(2): 739-44.
22. Fan R, Pan T, Zhu AL, Zhang MH. Anti-inflammatory and anti-arthritic properties of naringenin via attenuation of NF-kappaB and activation of the heme oxygenase (HO)-1/related factor 2 pathway. *Pharmacol Rep*. 2017; 69(5): 1021-9.

23. Nawrot-Hadzik I, Matkowski A, Hadzik J, Dobrowolska-Czopor B, Olchowy C, Dominiak M, et al. Proanthocyanidins and flavan-3-ols in the prevention and treatment of periodontitis-antibacterial effects. *Nutrients*. 2021; 13(1): 165.
24. Villas Boas SB, Sousa LS, Cardoso LM, Tavella-Silva NC, de Souza Costa CA, Basso FG. Grape seed extract down-modulates oxidative and inflammatory responses of oral mucosa cells. *J. Int. Acad. Periodontol*. 2021; 23(3): 7.
25. Cardoso LM, Pansani TN, de Souza Costa CA, Basso FG. Regulation of interleukin-6 and matrix metalloproteinases syntheses by bioflavonoids and photobiomodulation in human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2022; 37(7): 2973-87.
26. Oroian M, Escriche I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res Int*. 2015; 74: 10-36.
27. Body JJ, Mancini I. Bisphosphonates for cancer patients: why, how, and when? *Support Care Cancer*. 2002; 10: 399-407.
28. Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo S. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis. *J Am Dent Assoc*. 2005; 136: 1658-68.
29. Woo S, Hellstein JW, Kalmar JR. Systematic review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med*. 2006; 144: 753-61.
30. Diel IJ, Fogelman I, Al-Nawas B, Hoffmeister B, Migliorati C, Gligorov J, et al. Pathophysiology, risk factors and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: is there a diverse relationship of amino and non-aminobisphosphonates? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007; 64: 198-207.
31. Otto S, Pautke C, Opelz C, Westphal I, Drosse I, Schwager J, et al. Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 68: 2837-45.
32. Landesberg R, Woo V, Cremers S, Cozin M, Marolt D, Vunjak-Novakovic G, et al. Potential pathophysiological mechanism in osteonecrosis of the jaw. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1218: 62-9.
33. Migliorati CA, Woo S, Hewson I, Barasch A, Elting L, Spjikervet FKL, et al. A systematic review of bisphosphonate osteonecrosis (BON) in cancer. *Support Care Cancer*. 2009; 18: 1099-106.
34. Walter C, Klein MO, Pabst A, Al-Nawas B, Duschner H, Ziebart T. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Invest*. 2010; 14: 35-41.
35. Simon MJK, Niehoff P, Kimming B, Açil Y. Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III and V of human gingiva fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Invest*. 2010; 14: 51-8.

36. Basso FG, Pansani TN, Oliveira CF, Turrioni APS, Soares DG, Hebling J, et al. Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. *Braz Dent J*. 2013; 24: 551-8.
37. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011; 49: 2-19.
38. Scheper MA, Badros A, Salama AR, Warburton G, Cullen KJ, Weikel DS, et al. A novel bioassay model to determine clinically significant bisphosphonate levels. *Support Care Cancer*. 2009; 17(12): 1553-7.
39. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol*. 2009; 144(5): 667-76.
40. Scheper M, Chaisuparat R, Cullen K, Meiller T. A novel soft-tissue in vitro model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2010; 3:6.
41. Ohnuki H, Izumi K, Terada M, Saito T, Kato H, Suzuki A, et al. Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(7): 906-17.
42. Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 43(8): 1030-4.
43. Basso FG, Soares DG, Pansani TN, Turrioni AP, Scheffel DL, Hebling J, et al. Response of a co-culture model of epithelial cells and gingival fibroblasts to zoledronic acid. *Braz Oral Res*. 2016; 30(1): e122.
44. Coxon JP, Oades GM, Kirby RS, Colston KW. Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU Int*. 2004; 94(1): 164-70.
45. Fliefel RM, Entekhabi SA, Ehrenfeld M, Otto S. Geranylgeraniol (GGOH) as a mevalonate pathway activator in the rescue of bone cells treated with zoledronic acid: an in vitro study. *Stem Cells Int*. 2019; 2019: 4351327.
46. Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2011; 56(5): 491-8.
47. Saito T, Izumi K, Shiomi A, Uenoyama A, Ohnuki H, Kato H, et al. Zoledronic acid impairs re-epithelialization through down-regulation of integrin $\alpha\beta 6$ and transforming growth factor beta signalling in a three-dimensional in vitro wound healing model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 43(3): 373-80.
48. Bullock G, Miller C, McKechnie A, Hearnden V. Synthetic hydroxyapatite inhibits bisphosphonate toxicity to the oral mucosa in vitro. *Materials (Basel)*. 2020; 13(9): 2086.

49. Kim RH, Lee RS, Williams D, Bae S, Woo J, Lieberman M, et al. Bisphosphonates induce senescence in normal human oral keratinocytes. *J Dent Res*. 2011; 90(6): 810-6.
50. Alsalih A, Dam A, Lindberg P, Truedsson A. Medication-related osteonecrosis of the jaws initiated by zoledronic acid and potential pathophysiology. *Dent J (Basel)*. 2021; 9(8): 85.
51. Benhamou C. Effects of osteoporosis medications in bone quality. *Joint Bone Spine*. 2007; 74: 39-47.
52. Madrid C, Sanz M. What impact do systemically administered bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review. *Clin Oral Impl Res*. 2009; 20: 87-95.
53. Javed F, Almas K. Osseointegration of dental implants in patients undergoing bisphosphonate treatment: a literature review. *J Periodontol*. 2010; 81: 479-84.
54. Chadha G, Ahmadiéh A, Kumar S, Sedghzadeh PP. Osseointegration of dental implants and osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate therapy: a systematic review. *J Oral Implantol*. 2013; 39: 510-20.
55. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67: 61-70.
56. Basso FG, Turrioni APS, Soares DG, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. Low-level laser therapy for osteonecrotic lesions: effects on osteoblasts treated with zoledronic acid. *Support Care Cancer*. 2014; 22: 2741-48.
57. Idris AI, Rojas J, Greis IR, van't Hof RJ, Ralston SH. Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. *Calif Tissue Int*. 2008; 82: 191-201.
58. Taxel P, Ortiz D, Shafer D, Pendrys D, Reisine S, Rengasamy K, et al. The relationship between implant stability and bone health markers in post-menopausal women with bisphosphonate exposure. *Clin Oral Invest*. 2014; 18: 49-57.
59. Sun J, Song F, Zhang W, Sexton BE, Windsor LJ. Effects of alendronate on human osteoblast-like MG63 cells and matrix metalloproteinases. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(6): 728-36.
60. Tokuhara CK, Santesso MR, Oliveira GSN, Ventura TMDS, Doyama JT, Zambuzzi WF, et al. Updating the role of matrix metalloproteinases in mineralized tissue and related diseases. *J Appl Oral Sci*. 2019; 27: e20180596.
61. Basso FG, Pansani TN, Soares DG, Cardoso LM, Hebling J, de Souza Costa CA. Influence of bisphosphonates on the adherence and metabolism of epithelial cells and gingival fibroblasts to titanium surfaces. *Clin Oral Investig*. 2018; 22(2): 893-900.

62. An N, Rausch-fan X, Wieland M, Matejka M, Andrukhov O, Schedle A. Initial attachment, subsequent cell proliferation/viability and gene expression of epithelial cells related to attachment and wound healing in response to different titanium surfaces. *Dent Mater.* 2012; 28(12): 1207-14.
63. Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann NY Acad Si.* 2002; 957: 260-70.
64. De la Iglesia R, Milagro FI, Capión J, Boqué N, Martínez A. Healthy properties of proanthocyanidins. *Biofactors.* 2010; 36: 159-68.
65. Kurauchi M, Niwano Y, Shirato M, Kanno T, Nakamura K, Egusa H, et al. Cytoprotective effect of short-term pretreatment with proanthocyanidin on human gingival fibroblasts exposed to harsh environmental conditions. *Plos One.* 2014; 9: 1-5.
66. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115: 64-70.
67. Tipton DA, Cho S, Zacharia N, Dabbous MK. Inhibition of interleukin-17-stimulated interleukin-6 and -8 production by cranberry components in human gingival fibroblasts and epithelial cells. *J Periodontal Res.* 2013; 48: 638-46.
68. Bedran TBL, Spolidorio DP, Grenier D. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate and cranberry proanthocyanidins act in synergy with cathelicidin (LL-37) to reduce the LPS-induced inflammatory response in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2015; 60: 845-53.
69. Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Das KD, Ray SD, Kuszynski CA, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology.* 2000; 148: 187-97.
70. Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, et al. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mut Res.* 2003; 523-4: 87-97.
71. Gaggeri R, Rossi D, Daglia M, Leoni F, Avanzini MA, Mantellu M, et al. An eco-friendly enantioselective access to (R)-naringenin as inhibitor of proinflammatory cytokine release. *Chem Biodivers.* 2013; 10: 1531-38.
72. Wang Y, Bai S, Cheng Q, Zeng Y, Xu X, Guan G. Naringenin promotes SDF-1/CXCR4 signaling pathway in BMSCs osteogenic differentiation. *Folia Histochem Cytobiol.* 2021; 59(1): 66-73.
73. Wang W, Wu C, Tian B, Liu X, Zhai Z, Qu X, et al. The inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis through the suppression of p38 signaling pathway by naringenin and attenuation of titanium-particle-induced osteolysis. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(12): 21913-34.

74. Mariscal-Munoz E, Costa CA, Tavares HS, Bianchi J, Hebling J, Machado JP, et al. Osteoblast differentiation is enhanced by a nano-to-micro hybrid titanium surface created by Yb:YAG laser irradiation. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(3): 503-11.
75. Cardoso LM, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA, Basso FG. Chemotherapy drugs and inflammatory cytokines enhance matrix metalloproteinases expression by oral mucosa cells. *Arch Oral Biol*. 2021; 127: 105159.
76. Rech CA, Pansani TN, Cardoso LM, Ribeiro IM, Silva-Sousa YTC, de Souza Costa CA, et al. Photobiomodulation using LLLT and LED of cells involved in osseointegration and peri-implant soft tissue healing. *Lasers Med Sci*. 2022; 37(1): 573-80.
77. Chua CC, Chua BH. Tumor necrosis factor-alpha induces mRNA for collagenase and TIMP in human skin fibroblasts. *Connect Tissue Res*. 1990; 25(2): 161-70.
78. Tsai CL, Chen WC, Hsieh HL, Chi PL, Hsiao LD, Yang CM. TNF-alpha induces matrix metalloproteinase-9-dependent soluble intercellular adhesion molecule-1 release via TRAF2-mediated MAPKs and NF-kappaB activation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J Biomed Sci*. 2014; 21(1): 12.
79. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices. In Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: ISO; 2009. p. 1-33.
80. Ross AM, Jiang Z, Bastmeyer M, Lahann J. Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and elasticity. *Small*. 2012; 8(3): 336-55.
81. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*. 2005; 38(1): 73-83.
82. Franco C, Patricia HR, Timo S, Claudia B, Marcela H. Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(2): 440.
83. Sapna G, Gokul S, Bagri-Manjrekar K. Matrix metalloproteinases and periodontal diseases. *Oral Dis*. 2014; 20(6): 538-50.
84. Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004; 10(6): 311-8.
85. Chtourou Y, Fetoui H, Jemai R, Ben Slima A, Makni M, Gdoura R. Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor kappaB pathway. *Eur J Pharmacol*. 2015; 746: 96-105.
86. Wang CC, Guo L, Tian FD, An N, Luo L, Hao RH, et al. Naringenin regulates production of matrix metalloproteinases in the knee-joint and primary cultured articular chondrocytes and alleviates pain in rat osteoarthritis model. *Braz J Med Biol Res*. 2017; 50(4): e5714.

87. La VD, Howell AB, Grenier D. Cranberry proanthocyanidins inhibit MMP production and activity. *J Dent Res*. 2009; 88(7): 627-32.
88. Hantke B, Lahmann C, Venzke K, Fischer T, Kocourek A, Windsor LJ, et al. Influence of flavonoids and vitamins on the MMP- and TIMP-expression of human dermal fibroblasts after UVA irradiation. *Photochem Photobiol Sci*. 2002; 1(10): 826-33.
89. Lin YC, Tsai PH, Lin CY, Cheng CH, Lin TH, Lee KP, et al. Impact of flavonoids on matrix metalloproteinase secretion and invadopodia formation in highly invasive A431-III cancer cells. *PLoS One*. 2013; 8(8): e71903.
90. Pereira SC, Parente JM, Belo VA, Mendes AS, Gonzaga NA, do Vale GT, et al. Quercetin decreases the activity of matrix metalloproteinase-2 and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertension. *Atherosclerosis*. 2018; 270: 146-53.
91. Guglielmotti MB, Olmedo DG, Cabrini RL. Research on implants and osseointegration. *Periodontol 2000*. 2019; 79(1): 178-89.
92. Stefflik DE, Parr GR, Sisk AL, Lake FT, Hanes PJ, Berkery DJ, et al. Osteoblast activity at the dental implant-bone interface: transmission electron microscopic and high voltage electron microscopic observations. *J Periodontol*. 1994; 65(5): 404-13.
93. Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron*. 2005; 36(7-8): 630-44.
94. Kampa RP, Sęk A, Bednarczyk P, Szewczyk A, Calderone V, Testai L. Flavonoids as new regulators of mitochondrial potassium channels: contribution to cardioprotection. *J Pharm Pharmacol*. 2023; 75(4): 466-81.
95. Sadek KM, Mahmoud SFE, Zeweil MF, Abouzed TK. Proanthocyanidin alleviates doxorubicin-induced cardiac injury by inhibiting NF- κ B pathway and modulating oxidative stress, cell cycle, and fibrogenesis. *J Biochem Mol Toxicol*. 2021; 35(4): e22716.
96. Kampa RP, Kicinska A, Jarmuszkiewicz W, Pasikowska-Piwko M, Dolegowska B, Debowska R, et al. Naringenin as an opener of mitochondrial potassium channels in dermal fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2019; 28(5): 543-50.
97. Liang J, Halipu Y, Hu F, Yakeya B, Chen W, Zhang H, et al. Naringenin protects keratinocytes from oxidative stress injury via inhibition of the NOD2-mediated NF- κ B pathway in pemphigus vulgaris. *Biomed Pharmacother*. 2017; 92: 796-801.
98. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020; 754: 144855.
99. Nor Muhamad ML, Ekeuku SO, Wong SK, Chin KY. A scoping review of the skeletal effects of naringenin. *Nutrients*. 2022; 14(22): 4851.

100. Wang Y, Bai S, Cheng Q, Zeng Y, Xu X, Guan G. Naringenin promotes SDF-1/CXCR4 signaling pathway in BMSCs osteogenic differentiation. *Folia Histochem Cytobiol.* 2021; 59(1): 66-73.