

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/02/2027.



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



Ana Carolina Chagas

**Análise de hidrogel contendo naringenina e seu efeito sobre osteoblastos:
estudo in vitro**

**Araraquara
2025**



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



Ana Carolina Chagas

**Análise de hidrogel contendo naringenina e seu efeito sobre osteoblastos:
estudo in vitro**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de mestre em Odontologia, na Área de Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

**Araraquara
2025**

C433a Chagas, Ana Carolina
Análise de hidrogel contendo naringenina e seu
efeito sobre osteoblastos: estudo in vitro / Ana
Carolina Chagas. -- Araraquara, 2025
45 p.

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

1. Titânio. 2. Flavonóides. 3. Metaloproteinases da
Matriz. 4. Osteoblastos. I. Título.

Ana Carolina Chagas

**Análise de hidrogel contendo naringenina e seu efeito sobre osteoblastos:
estudo invitro**

Comissão julgadora

Defesa para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

2º Examinador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

3º Examinador: Profa. Dra. Telma Blanco Lombardo Bedran

Araraquara, 26 de fevereiro de 2025.

DADOS CURRICULARES

Ana Carolina Chagas

NASCIMENTO: 12/01/1998 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Antonio Carlos Cury Chagas e Lucimara Aparecida de Oliveira Chagas

2018/2022

Graduada no curso de Odontologia pela Universidade de Odontologia de Ribeirão Preto (UNAERP)

2022/2025 Mestrado no programa de Odontologia na FOAr/Unesp na área de concentração em Periodontia.

Dedico esse trabalho aos meus pais que com muita oração, esforço e trabalho fizeram com que eu trilhasse meu caminho e realizasse todos os meus sonhos. À minha irmã, um dos maiores motivos de eu ser quem sou hoje e ao meu noivo, por apoiar minhas conquistas e me ajudar a conquistá-las.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas bençãos que tive em toda a minha vida e à Nossa Senhora das Graças e Nossa senhora Aparecida por iluminar meus caminhos.

Aos meus pais e minha irmã por todo apoio, suporte e confiança desde o começo da minha caminhada pela vida, me ensinaram que o caminho pode ser árduo mas sempre engrandecedor.

Ao meu noivo, pela parceria e cumplicidade, por estar ao meu lado todos os dias.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, por todo o conhecimento que pude adquirir enquanto estive nesse lugar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pelo aprendizado e experiência obtidos nesses dois anos.

À minha orientadora, por todo o conhecimento transmitido e compartilhado, me auxiliando em toda a trajetória acadêmica desde a minha iniciação científica.

À CAPES, o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – 88887.827459/2023-00.

“[...] Porque se chamavam homens
Também se chamavam sonhos
E sonhos não envelhecem [...]”
Lô Borges e Milton Nascimento*

* Borges L. e Nascimento M. Música Clube da esquina II . Albúm Clube da Esquina. Belo Horizonte: EMI-Odeon Brasil; 1972.

Chagas AC. Análise de hidrogel contendo naringenina e seus efeitos sobre os osteoblastos: estudo in vitro [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

RESUMO

A incidência de falhas na instalação de implantes osseointegrados na cavidade oral pode estar relacionada ao aumento da expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs). A super-expressão destas enzimas pode resultar em intensa degradação da matriz extracelular, atrasando ou impedindo o processo de reparo. As MMPs são endogenamente controladas por proteínas chamadas de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Assim, o equilíbrio entre a síntese de MMPs e TIMPs garante a homeostasia tecidual e também o processo de reparo e remodelação dos tecidos. Considerando esses conceitos, diferentes terapias adjuvantes tem sido propostas e avaliadas, visando auxiliar no reparo dos tecidos peri-implantares, por meio da modulação da resolução da fase inflamatória. Dentre estas estratégias, o uso de bioflavonóides, como a naringenina, tem demonstrado efetividade na resposta de osteoblastos e fibroblastos de gengiva, além de outras células, modulando positivamente a proliferação celular e negativamente a expressão gênica e protéica de mediadores pró-inflamamatórios. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um hidrogel contendo sobre osteoblastos. Inicialmente, foi realizada a incorporação da naringenina ao hidrogel de metacrilato de gelatina em duas concentrações, 1 e 2% e o cultivo dos osteoblastos sobre os mesmos. Após análise da viabilidade celular, o hidrogel contendo 1% de NA foi selecionado para as análises subsequentes, que consistiram da análise de adesão e síntese e expressão de MMPs e TIMPs. Então, após o preparo do hidrogel, foram realizadas análises de morfologia, taxa de degradação e hidrofiliabilidade, liberação de NA. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio dos testes ANOVA e Tukey. O hidrogel demonstrou estabilidade de aproximadamente 7 dias e liberação de NA por 21 dias. A viabilidade celular foi semelhante ao grupo controle, sendo que a síntese de MMPs foi negativamente modulada na presença de NA. Portanto a aplicação do hidrogel contendo NA 1% foi efetiva na melhora da adesão de osteoblastos sobre a superfície de titânio, bem como na modulação da resposta dessas células.

Palavras – chave: Titânio. Flavonoides. Metaloproteinases da matriz. Osteoblastos.

Chagas AC. Analysis of hydrogel containing naringenin and its effects on osteoblasts: in vitro study [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

ABSTRACT

The failure of osseointegrated implant placement in the oral cavity may be associated with increased expression of matrix metalloproteinases (MMPs). The overexpression of these enzymes can lead to extensive extracellular matrix degradation, thereby delaying or impairing the tissue repair process. MMPs are endogenously regulated by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), and the balance between MMP and TIMP synthesis is essential for maintaining tissue homeostasis, as well as for the repair and remodeling of peri-implant tissues. In this context, various adjunctive therapies have been proposed and investigated to promote the resolution of the inflammatory phase and enhance peri-implant tissue repair. Among these strategies, the use of bioflavonoids, such as naringenin, has demonstrated promising effects on osteoblasts and gingival fibroblasts, as well as other cell types, by positively modulating cell proliferation and downregulating the gene and protein expression of pro-inflammatory mediators. Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of a naringenin-containing hydrogel on osteoblasts. Initially, naringenin was incorporated into a gelatin methacrylate hydrogel at concentrations of 1% and 2%, followed by osteoblast culture on these substrates. Based on cell viability analysis, the hydrogel containing 1% naringenin was selected for further investigations, including adhesion assessment and the synthesis and expression of MMPs and TIMPs. Subsequently, the hydrogel was characterized in terms of morphology, degradation rate, hydrophilicity, and naringenin release profile. The obtained data were statistically analyzed using ANOVA and Tukey's test. The hydrogel exhibited stability for approximately seven days and sustained naringenin release for 21 days. Cell viability was comparable to that of the control group, while MMP synthesis was downregulated in the presence of naringenin. Therefore, the application of the hydrogel containing 1% naringenin proved to be effective in enhancing osteoblast adhesion to titanium surfaces, as well as in modulating the cellular response, suggesting its potential as a biomaterial for improving peri-implant tissue repair.

Keywords: Titanium. Flavonoids. Matrix metalloproteinases. Osteoblasts.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO.....	13
2.1 Objetivos Específicos.....	13
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
4 MATERIAL E MÉTODO.....	18
4.1 Estudo.....	18
4.1.1 Obtenção dos hidrogéis.....	18
4.1.2 Recobrimento dos discos de Ti com os hidrogéis.....	19
4.1.3 Cultura de osteoblastos.....	19
4.1.4 Análise da viabilidade de osteoblastos cultivados sobre Ti com as diferentes formulações de hidrogéis.....	20
4.1.5 Análise da adesão celular sobre discos recobertos com as diferentes formulações de hidrogéis.....	20
4.1.6 Efeito do recobrimento de Ti com as diferentes formulações de hidrogéis sobre a modulação da produção de MMPs e TIMPs por osteoblastos.....	21
4.1.7 Efeito do recobrimento de Ti com as diferentes formulações de hidrogéis sobre a expressão gênica de MMP- 2.....	22
4.2 Estudo 2.....	22
4.2.1 Caracterização morfológica do hidrogel.....	22
4.2.2 Perfil de degradação e absorção das amostras.....	23
4.2.3 Análise da liberação de NA.....	24
4.2.4 Análise estatística.....	24
5 RESULTADO.....	26
5.1 Estudo 1.....	26
5.1.1 Análise da viabilidade de osteoblastos cultivados sobre os discos de Ti com as diferentes formulações de hidrogéis.....	26
5.1.2 Análise da adesão celular cultivados sobre os discos de Ti com as diferentes formulações de hidrogéis.....	27

5.1.3 Efeito do recobrimento de Ti com as diferentes formulações de hidrogéis sobre a modulação da produção de MMPs e TIMPs por osteoblastos.....	28
5.1.4 Efeito do recobrimento de Ti com as diferentes formulações de hidrogéis sobre a expressão gênica de MMP-2 por osteoblastos.....	30
5.2 Estudo 2.....	30
5.2.1 Caracterização morfológica do hidrogel.....	30
5.2.2 Perfil de degradação das amostras.....	31
5.2.3 Perfil de absorção (hidrofilicidade) das amostras.....	32
5.2.4 Análise da liberação de NA.....	33
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO	45

1 INTRODUÇÃO

O reparo peri-implantar depende da adesão de osteoblastos à superfície do implante, bem como da deposição e mineralização da matriz extracelular ao redor dos mesmos, dando estabilidade e longevidade aos implantes osseointegrados. Portanto, o processo de osseointegração dos implantes endo-ósseos se caracteriza como um contato direto entre o implante e o tecido ósseo maduro, que permite que este seja submetido a cargas funcionais^{1,2}.

Diversos fatores podem influenciar no processo de osseointegração, como o sítio anatômico, volume de tecido ósseo disponível, trauma cirúrgico, tipo de material utilizado, condição periodontal do paciente, além da capacidade de reparo do tecido receptor³. A migração dos osteoblastos para a superfície dos implantes, sua adesão, proliferação e síntese de matriz óssea são eventos cruciais na obtenção de um tecido ósseo maduro, cuja interface peri-implantar deve ter potencial para suportar cargas mastigatórias. Desta forma, eventos que possam interferir nestas funções celulares podem resultar no atraso ou em falhas no processo de osseointegração⁴.

Sabe-se que a manutenção prolongada da fase inflamatória pós-implante resulta em aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios no sítio cirúrgico, podendo resultar em atraso do reparo peri-implantar, tal evento também pode estar relacionado à maior síntese e atividade de metaloproteinases da matriz (MMPs).

A síntese e atividade de metaloproteinases da matriz (MMPs) parece exercer papel importante na remodelação da matriz extracelular dos tecidos ósseo e mucoso peri-implantar⁵. Essas enzimas têm atividade proteolítica, mais evidentemente colagenolítica e são capazes de degradar proteínas da matriz extracelular. Porém, em níveis exacerbados, as MMPs podem promover intensa degradação da matriz colágena, o que parece estar diretamente associado com o aumento da severidade das peri-implantites⁵⁻⁹. Estudos anteriores demonstraram uma correlação positiva entre a presença de mediadores inflamatórios e a síntese e atividade de MMPs¹⁰. Além disso, as MMPs também parecem exercer um feedback positivo na síntese de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Estes achados confirmam a relação entre as MMPs e a doença peri-implantar¹¹.

Devido a preocupação com o reparo peri-implantar e osseointegração do implante, lançar mão de tratamentos coadjuvantes para efetividade e sucesso do

reparo pode ser uma alternativa pertinente. Os flavonóides são derivados de plantas, de acordo com Bae et al¹² (1999) e Havsteen et al¹³ (1983), foram considerados terapêuticos e preventivos pois são eficazes contra doenças. A naringenina (NA), um flavonóide cítrico é encontrada em frutas cítricas como toranja, lima, limão, tangerina e apresenta atividades anti-inflamatórias, anti-oxidantes, anti-carcinogênicas e antimicrobianas¹⁴ e também tem se apresentado como potente inibidora de MMPs e capaz de modular a síntese e expressão de TIMPs¹⁵⁻²¹.

Para que estes compostos sejam considerados agentes promissores no reparo peri-implantar, é importante avaliar e otimizar sua forma de distribuição nos tecidos peri-implantares. Os hidrogéis, em particular, tem se mostrado eficazes quanto a distribuição de diferentes moléculas e medicamentos, permitindo a liberação lenta e controlada deles, o que pode resultar em maior segurança e efetividade para esta forma de tratamento²².

O hidrogel a base de metacrilato de gelatina tem apresentado efeitos positivos como carregador de moléculas para o reparo do tecido ósseo. O GelMa é um exemplo de hidrogel a base de metacrilato e vem sendo uma ótima opção para administração dos flavonóides na prevenção de várias doenças^{23, 24}.

Diante disso, aplicar o hidrogel do tipo GelMA contendo NA sobre a superfície de titânio modificada, pode oferecer uma liberação controlada no composto, modulando a síntese de mediadores inflamatórios e assim auxiliar no reparo peri-implantar.

7 CONCLUSÃO

O GelMA apresentou estabilidade e liberação controlada de NA.

A aplicação do GelMA contendo NA apresentou citocompatibilidade sobre osteoblastos quando aplicado sobre os discos de titânio.

Os osteoblastos cultivados sobre o GelMA contendo NA 1% apresentaram menor síntese de mediadores pró-inflamatórios MMP- 2 e MMP-9 e TIMP-1 e TIMP-2.

REFERÊNCIAS*

1. Guglielmotti MB, Olmedo DG, Cabrini RL. Research on implants and osseointegration. *Periodontol*. 2000. 2019; 79: 178-89.
2. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977; 16:1-132
3. Kullar AS, Miller CS. Are There contraindications for placing dental implants? *Dent Clin North Am*. 2019; 63(3): 345-62.
4. Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron*. 2005; 36(7-8): 630 – 44.
5. Sorsa T, TJaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004; 10(6): 311 – 8.
6. Ma J, Kittu U, Hanemaaijer R, Teronen OP, Sorsa TA, Natah S, Tensing EK, Konttinen YT. Gelatinase B is associated with peri-implant bone loss. *Clin Oral Implant Res*. 2003, 14(6): 709–13.
7. Gonçalves PF, Huang H, Mc Aninley S, Alfant B, Harrison P, Aukhil I, Walker C, Shaddox LM. Periodontal treatment reduces matrix metalloproteinase levels in localized aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2013; 84(12): 1801-8.
8. Dursun E, Tozum TF. Peri-Implant Crevicular Fluid Analysis, Enzymes and Biomarkers: a Systemetic Review. *J. Oral Maxillofac Res*. 2016, 7(3): e9
9. Alassy H, Parachuru P, Wolff L. Peri-implantitis diagnosis and prognosis using biomarkers in peri- implant crevicular fluid: a narrative review. *Diagnostics (Basel)*. 2019; 9(4): 214.
10. Basso FG, Pansani TN, Cardoso LM, Hebling J, Real RVP, Costa CAS. Influence of bisphosphonates on the behavior of osteoblasts seeded onto titanium discs. *Braz Dent J*. 2020; 31(3): 304-9.
11. Yucel-Lindberg T, Bage T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*. 2013; 15: e7
12. Bae EA, Han MJ, Kim DH. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Med*. 1999; 65(5): 442-3.

* 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>

13. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol.* 1983; 32(7):1141-8.
14. Joshi R, Kulkarni YA, Wairkar S. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin: An update. *Life Sci.* 2018; 215: 43–56.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Fan R, Pan T, Zhu A, Zhang M. Anti-inflammatory and anti-arthritic properties of naringenin via attenuation of NF- κ B and activation of the heme oxygenase (HO)-1/related factor 2 pathway. *Pharmacol Rep.* 2017; 69(5): 1021-29.
19. Nawrot-Hadzik I, Matkowski A, Kubasiewicz-Ross, P. & Hadzik J. Proanthocyanidins and flavan-3-ols in the prevention and treatment of periodontitisimmunomodulatory effects, animal and clinical studies. *Nutrients.* 2021; 13(1): 239.
20. Villas Boas SB, S. L., Cardoso, L. M., Tavella-Silva, N. C., de Souza Costa, C. A., & Basso, F. G. (2021). Grape seed extract down-modulates oxidative and inflammatory responses of oral mucosa cells. *J Internat. Acad Periodontol.* 2021; 23 (3): 301-7.
21. Cardoso LM, Pansani TN, de Souza Costa CA, Basso FG. Naringenin and proanthocyanidins pre-treatment decreases synthesis and activity of gelatinases induced by zoledronic acid in a dental implant surface in vitro model. *Arch Oral Biol.* 2023; 151: 105703.
22. Zhang X, Peng Yang ZL, Duan G, Liu X, Gu Z, Li Y. Polyphenol scaffolds in tissue engineering. *Mater Horz.* 2021; 8(1): 145 – 67.
23. Kulkarni NS, Chauhan G, Goyal M, Sarvepalli S, Gupta V. Development of gelatin methacrylate (GelMa) hydrogels for versatile intracavitary applications. *Biomater Sci.* 2022; 10(16): 4492–507.
24. Kurian AG, Singh RK, Patel KD, Lee JH, Kim HW. Multifunctional GelMA platforms with nanomaterials for advanced tissue therapeutics. *Bioact Mater.* 2021; 8: 267–95.

25. Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol* 2014; 41: S6–S22.
26. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016; 86:119-30.
27. Newman H, Shih YV, Varghese S. Resolution of inflammation in bone regeneration: From understandings to therapeutic applications. *Biomaterials*. 2021; 277: 121114.
28. Vila Real RP, Pansani TN, Cardoso LM, de Souza Costa CA, Basso FG. Titanium alkalization improves response of osteoblasts to zoledronic acid. *Biointerphases*. 2022; 17(3): 031004.
29. Nibali L, Gkraniias N, Mainas G, Di Pino A. Periodontitis and implant complications in diabetes. *Periodontol 2000*. 2022; 90(1): 88–105.
30. Moreira AC, Barreto FC, Dempster DW. New insights on diabetes and bone metabolism. *Brazilian Journal of Nephrology*. 2015; 37(4): 490-5.
31. Otto S, Pautke C, Van den Wyngaert T, Niepel D, Schiødt M. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Prevention, diagnosis and management in patients with cancer and bone metastases. *Cancer Treat Rev*. 2018; 69: 177–87.
32. Yang G, Singh S, Chen Y, Hamadeh IS, Langaee T, McDonough CW, Holliday LS, Lamba JK, Moreb JS, Katz J, Gong Y. Pharmacogenomics of osteonecrosis of the jaw. *Bone*. 2019; 124: 75–82.
33. Sartori R, Corrêa CB, Fernandes Filho RB, Marcantonio Jr E, Vaz LG. Mechanical properties of dental implants submitted to fluoride ions action. *Rev Odontol UNESP*. 2007; 36(4): 317-22.
34. Glied A, Mundiya J. *Implant Material Sciences*. *Dent Clin North Am*. 2021; 65(1): 81–8.
35. Sales PHDH, Barros AWP, Oliveira-Neto OB, de Lima FJC, Carvalho AAT, Leão JC. Do zirconia dental implants present better clinical results than titanium dental implants? A systematic review and meta-analysis. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2023; 124(1S): 101324.
36. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20 Suppl 4:172-84.
37. Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *Biomed Res Int.*; 2015: 791725.
38. Nishiguchi S, Fujibayashi S, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Biology of alkali- and heat-treated titanium implants. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 67(1): 26-35.
39. Tugulu S, Löwe K, Scharnweber D, Schlottig F. Preparation of superhydrophilic microrough titanium implant surfaces by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med*. 2010; 21(10): 2751-63

40. Camargo WA, Takemoto S, Hoekstra JW, Leeuwenburgh SCG, Jansen JA, van den Beucken JJJP, Alghamdi HS. Effect of surface alkali-based treatment of titanium implants on ability to promote in vitro mineralization and in vivo bone formation. *Acta Biomater.* 2017; 57:511-23
41. Zeng W, Jin L, Zhang F, Zhang C, Liang W. Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics. *Pharmacol Res.* 2018; 135: 122–26
42. López-Valverde N, Aragonese J, López-Valverde A, Quispe-López N, Rodríguez C, Aragonese JM. Effectiveness of biomolecule-based bioactive surfaces, on osseointegration of titanium dental implants: A systematic review and meta-analysis of in vivo studies. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10: 986112
43. Alam F, Mohammadin K, Shafique Z, Amjad ST, Asad MHHB. Citrus flavonoids as potential therapeutic agents: a review. *Phytother Res.* 2022; 36(4): 1417–41.
44. Ramesh P, Jagadeesan R, Sekaran S, Dhanasekaran A, Vimalraj S. Flavonoids: Classification, Function, and Molecular Mechanisms Involved in Bone Remodelling. *Front Endocrinol.* 2021; 12:779638.
45. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Potentiel pathogénique de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* et *Tannerella forsythia*, le complexe bactérien rouge associé à la parodontite [Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis]. *Pathol Biol.* 2007; 55(3-4):154-62.
46. De la Iglesia R, Milagro FI, Capión J, Boqué N, Martínez A. Healthy properties of proanthocyanidins. *Biofactors.* 2010; 36(3): 159-68
47. 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(5): 638-46.
48. Lombardo Bedran TB, Palomari Spolidorio D, 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(6):845-53
49. 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.
50. Ejeil An, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Gogeanu G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol.* 2003; 74(2): 188-95.

51. Nguyen DC, Dowling J, Ryan R, McLoughlin P, Fitzhenry L. Controlled release of naringenin from soft hydrogel contact lens: An investigation into lens critical properties and in vitro release. *Int J Pharm.* 2022; 621: 121793
52. Rahali K, Ben Messaoud G, Kahn CJF, Sanchez-Gonzalez L, Kaci M, Cleymand F, Fleutot S, Linder M, Desobry S, Arab-Tehrany E. Synthesis and Characterization of Nanofunctionalized Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(12): 2675.
53. Ribeiro JS, Bordini EAF, Ferreira JA, Mei L, Dubey N, Fenno JC, Piva E, Lund RG, Schwendeman A, Bottino MC. Injectable MMP-Responsive Nanotube-Modified Gelatin Hydrogel for Dental Infection Ablation. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020; 12(14): 16006-17.
54. Bordini EAF, Ferreira JA, Dubey N, Ribeiro JS, de Souza Costa CA, Soares DG, Bottino MC. Injectable Multifunctional Drug Delivery System for Hard Tissue Regeneration under Inflammatory Microenvironments. *ACS Appl Bio Mater.* 2021; 4(9): 6993-7006
55. Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials.* 2015; 73: 254-71.
56. Pansani TN, Basso FG, Souza IDR, Hebling J, de Souza Costa CA. Characterization of titanium surface coated with epidermal growth factor and its effect on human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2019; 102: 48-54.
57. Ribeiro IM, Cardoso LM, Pansani TN, Chagas AC, de Souza Costa CA, Basso FG. Development of a bioactive titanium surface via alkalization and naringenin coating for peri-implant repair: In vitro study. *Coatings.* 2024; 14(10): 1303.
58. Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, Price P, Reid YA, Simone F. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017; 53(8): 669-72
59. Wu J, Chen H, Li L, Wu W, Sung KL. Influence of different-sized titanium particles loading on osteoblastic differentiation and mineralization. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2005; 22(1): 30-4.
60. Sommer U, Laurich S, de Azevedo L, Viehoff K, Wenisch S, Thormann U, Alt V, Heiss C, Schnettler R. In Vitro and In Vivo Biocompatibility Studies of a Cast and Coated Titanium Alloy. *Molecules.* 2020; 25(15): 3399.
61. Prado RF, de Oliveira FS, Nascimento RD, de Vasconcellos LM, Carvalho YR, Cairo CA. Osteoblast response to porous titanium and biomimetic surface: In vitro analysis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015; 52: 194-203.
62. Viswanatha GL, Shylaja H, Moolemath Y. The beneficial role of naringin—a citrus bioflavonoid—against oxidative stress-induced neurobehavioral disorders and cognitive dysfunction in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Pharmacother.* 2017; 94: 909–29.

63. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc.* 2010; 69(3): 273–78.
64. Cardoso LM, de Carvalho ABG, Anselmi C, Mahmoud AH, Dal-Fabbro R, Basso FG, Bottino MC. Bifunctional naringenin-laden gelatin methacryloyl scaffolds with osteogenic and anti-inflammatory properties. *Dent Mater.* 2024; 40(9):1353-63.
65. Yamaguchi S, Nath S, Sugawara Y, Divakarla K, Das T, Manos J, Chrzanowski W, Matsushita T, Kokubo T. Two-in-One Biointerfaces—Antimicrobial and Bioactive Nanoporous Gallium Titanate Layers for Titanium Implants. *Nanomaterials.* 2017; 7(8): 229.
66. Miao X, Wang D, Xu L, Wang J, Zeng D, Lin S, Huang C, Liu X, Jiang X. The Response of Human Osteoblasts, Epithelial Cells, Fibroblasts, Macrophages and Oral Bacteria to Nanostructured Titanium Surfaces: A Systematic Study [Corrigendum]. *Int J Nanomedicine.* 2020;15: 2351-52.
67. Ansar EB, Ravikumar K, Suresh Babu S, Fernandez FB, Komath M, Basu B, Harikrishna Varma PR. Inducing apatite pre-layer on titanium surface through hydrothermal processing for osseointegration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019; 105: 110019.
68. Liddell RS, Liu ZM, Mendes VC, Davies JE. Relative contributions of implant hydrophilicity and nanotopography to implant anchorage in bone at Early Time Points. *Clin Oral Implants Res.* 2020; 31(1): 49-63.