RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/03/2022

UNESP - Universidade Estadual Paulista

"Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Jhonatan de Souza Carvalho

Ingestão de flavonoides cítricos sobre a modulação da resposta inflamatória e nível de perda óssea promovida por periodontite induzida em camundongos saudáveis

Araraquara

2020

UNESP - Universidade Estadual Paulista

"Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Jhonatan de Souza Carvalho

Ingestão de flavonoides cítricos sobre a modulação da resposta inflamatória e nível de perda óssea promovida por periodontite induzida em camundongos saudáveis

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

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio
Coorientador: Prof. Dr. Vinícius de Paiva Gonçalves

Araraquara

2020

Carvalho, Jhonatan de Souza
Ingestão de flavonoides cítricos sobre a modulação da resposta inflamatória e nível de perda óssea promovida por periodontite induzida em camundongos saudáveis / Jhonatan de Souza Carvalho.-- Araraquara: [s.n.], 2020
75 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio
Coorientador: Prof. Dr. Vinícius de Paiva Gonçalves

1. Flavonoides 2. Flavanonas 3. Doenças periodontais 4. Anti-Inflamatórios I. Título

.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB/5646
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Jhonatan de Souza Carvalho

Ingestão de flavonoides cítricos sobre a modulação da resposta inflamatória e nível de perda óssea promovida por periodontite induzida em camundongos saudáveis

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

2º Examinador: Profa. Dra. Thais Borges Cesar

3º Examinador: Profa. Dra. Patricia Almeida Miguez

Araraquara, 30 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

Jhonatan de Souza Carvalho

NASCIMENTO: 17/11/1995 – Três Lagoas/MS

FILIAÇÃO: Jecivaldo Alves Dias do Nascimento Carvalho
Edilene de Souza Dias Carvalho

2014 – 2017
Graduação em Odontologia
Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca, São Paulo

2018 – 2020
Mestrado em Odontologia – Área de Concentração: Periodontia

Dedico este trabalho àqueles que são tudo para mim,

Deus, é tudo sobre você
Jecivaldo Alves Dias do Nascimento Carvalho, meu pai
Edilene de Souza Dias Carvalho, minha mãe
Luis Felliphe de Souza Carvalho, meu irmão

AGRADECIMENTOS

À *DEUS*, pela vida, pela saúde e pela força para superar as dificuldades. Obrigado por estar presente em todos os momentos e sempre conduzir os meus passos para o melhor caminho. Sou grato por colocar pessoas maravilhosas na minha vida no qual posso compartilhar meus dias.

Aos meus pais *Jecivaldo Alves Dias do Nascimento Carvalho e Edilene de Souza Dias Carvalho.* Obrigado por confiarem em mim e apoiarem minhas decisões. Obrigado por toda paciência nos meus momentos mais críticos, por todo amor e carinho que dedicam em minha vida. Amo muito vocês.

Ao meu irmão *Luis Felliphe de Souza Carvalho* por toda paciência, carinho e apoio em todos os momentos. Obrigado pela parceria e compreensão nos momentos em que eu estava muito estressado ou cansado. Eu te amo.

Ao meu orientador *Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio*, com quem tive a feliz oportunidade e imenso prazer em conviver nos últimos 2 anos. Obrigado pela amizade, confiança, respeito, competência e disposição que me orientou durante a realização desta dissertação. Espero ter correspondido às suas expectativas. Obrigado pela paciência e por acreditar em mim.

À *Profa. Dra. Denise Palomari Spolidorio* pelo carinho que sempre demonstrou por nós e por disponibilizar os seus laboratórios para realização de parte dos nossos experimentos.

Ao meu Coorientador e amigo *Prof. Dr. Vinicius de Paiva Gonçalves* pela amizade, companheirismo e paciência com que me ajudou na elaboração desta dissertação. Obrigado por todos os conselhos, palavras de apoio e força. Você tem um coração incrível meu amigo.

À minha dupla de trabalho *Dania Ramadan.* Obrigado por me ajudar a crescer tanto na área profissional quanto pessoal. Obrigado pelos conselhos, pelas risadas,

pelo companheirismo em todos os momentos. Foi lindo ver a nossa amizade ser construída ao longo desses dois anos. Todo sucesso a você!

À *Profa. Dra. Thais Borges*, por todo apoio e disponibilidade ao longo de todo trabalho. Obrigado pela confiança e por abrir as portas de seu laboratório.

Ao *Prof. Dr. Jonh Manthey,* contribuir com os flavonoides utilizados no presente trabalho, obrigado pela confiança. Seu apoio e contribuição foram fundamentais para execução deste trabalho.

Aos docentes do departamento de Periodontia *Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, Profa. Dra. Rosemery Adriana Chiéri Marcantonio, Prof. Dr. Élcio Marcantonio Júnior, Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior, Profa. Dra. Daniela Leal Zandim Barcelos, Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili* pela amizade, formação profissional, competência e sucesso.

Ao *Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti* por ter aberto as portas do seu laboratório e as e suas alunas *Taira e Renata* pela disposição e por toda ajuda na realização das análises da atividade de metalopreteinase.

À *Patricia Huacho* pela amizade, carinho, conselhos e por toda ajuda na execução das etapas in vitro. Patty você é um exemplo de foco e compromisso para mim.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Térreo *José Antônio Zuanon e Juliana Pirola.* Obrigado por toda ajuda, conselhos, risadas e todo carinho que demonstraram ao longo da realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia, em especial a *Carla Molina* por sempre me ajudar com prontidão nas burocracias administrativas e por todo carinho que sempre demostrou.

À *Romilda (Nininha) e Sandra (Sandrinha)* pelo carinho e respeito que sempre tiveram por mim. Agradeço por me presentearem todas as manhãs com um empolgado *bom dia* e um grande sorriso no rosto.

A todos meus colegas de mestrado *Amanda Favoreto, Carolina Malzoni, Flávia Gomes Matos, Marco Hidalgo, Lorena Gutierrez, Mariely Godoi, Natalie Fernandes, Julio Sanches, Dania Ramadan e Renata Silva* pelo companheirismo e por todos momentos compartilhados. Graças a vocês os dias foram mais leves e divertidos! Em especial a meus amigos *Ingra Gagno Nicchio e Gabriel Carvalho* pelo apoio, conselhos, companhia e amizade. Vocês estarão sempre no meu coração.

Ao Prof. Dr. *Marcell Medeiros*, pela paciência e disponibilidade em ajudar, inclusive nos fins de semana.

À *Beatriz Fuller* pelas orientações quanto ao manuseio e armazenamento dos animais e preparo das rações suplementadas com flavonoides utilizados neste trabalho e a *Valéria Malavolta* por toda ajuda durante o fim do período experimental.

A todos meus professores da graduação pelo apoio, em especial ao meu orientador de TCC *Prof. Dr. Antonio Carlos Pereira Gomes*, à *Profa. Dra. Emanuela Prado Ferraz* e à *Profa. Dra. Márcia Alvarez* por toda confiança que foi em mim depositada um dia. Graças as oportunidades que vocês me ofereceram cheguei até aqui.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/12260-0) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Agradeço em especial àqueles que foram fundamentais para a realização deste trabalho, **os animais.**

Monumento em homenagem aos ratos sacrificados em pesquisas científicas, em Novosibirsk, Rússia.

Fonte: Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*

* Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences [homepage na internet]. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; [acesso em 2020 abril 15]. Disponível em: https://www.sbras.ru/en/photo/gallery/41618

“A **persistência** é o menor caminho do **êxito”***

Charles Chaplin

* Charles Chaplin, Vida e Pensamentos. Editora Martin Claret. 1997. p. 118

Carvalho JS. Ingestão de flavonoides cítricos sobre a modulação da resposta inflamatória e nível de perda óssea promovida por periodontite induzida em camundongos saudáveis [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito dos flavonoides cítricos eriocitrina e eriodictiol sobre a periodontite experimental induzida por injeção de LPS de *E. coli* em camundongos. Setenta camundongos BALB/c foram submetidos a diferentes tratamentos: dieta convencional, dieta enriquecida com eriocitrina, dieta enriquecida com eriodictiol, ambas nas concentrações de 25 e 50 mg/kg de peso corporal/dia e dieta enriquecida com naproxeno 10mg/kg de peso corporal/dia. Após 30 dias de suplementação os animais foram submetidos a indução de periodontite experimental por injeção bilateral de LPS de *Escherichia coli* 3x/semana por 4 semanas. Avaliou-se o peso corporal, consumo alimentar e energético ao longo de todo período experimental. No fim do período experimental os animais foram eutanasiados e coletados fígado e maxila para, realização de análise microscópica, quantificação de perda óssea por micro-Ct, análise microscópica e estereométrica dos maxilares, perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias do tecido gengival por imunoensaio multiplex e avaliação da atividade de mieloperoxidase. In vitro foi avaliada a viabilidade celular por MTT em um período de 48 horas e avaliação da proliferação celular de cultura de fibroblastos L929 através do método de AlamarBlue® por 1, 3 e 7 dias. Ao longo do experimento os animais que consumiram ração enriquecida com flavonoides ou naproxeno apresentaram ganho de peso e consumo alimentar/energético semelhante aos grupos controles. Na análise microscópica do fígado não foram observadas alterações hepáticas. A análise microtomográfica demonstrou que a suplementação com flavonoides cítricos preveniu a perda óssea periodontal comparando-se ao grupo de animais submetidos apenas a injeção de LPS. Na análise estereométrica observou-se redução do infiltrado de células inflamatórias no tecido gengival adjacente ao primeiro molar superior dos animais que receberam dieta suplementada com eriocitrina, eriodictiol ou naproxeno. Observou-se que a suplementação alimentar com eriocitrina de 50mg/kg de peso corporal/dia e ambas concentrações de eriodictiol atenuaram a expressão de IL-1β. Eriocitrina 25 e 50mg/kg de peso corporal/dia e somente 50mg/kg de peso corporal/dia de eriodictiol reduziram a produção de TNF-α. Todos os tratamentos com exceção do eriodictiol 50mg/kg de peso corporal/dia e naproxeno aumentaram a expressão de IL-10 e a suplementação com eriocitrina e eriodictiol em todas as concentrações reduziram a atividade de MPO com clara atividade anti-inflamatória. Os resultados in vitro demonstraram que a eriocitrina e eriodictiol nas concentrações de 500 µM, 600 µM, 700µM e 1 µM, 10 µM e 50µM respectivamente, não apresentaram efeitos citotóxicos sobre fibroblastos, enquanto apenas a eriocitrina nas mesmas concentrações aumentou a atividade metabólica de fibroblastos L929 após 7 dias de tratamento. Os resultados permitem concluir que a proteção oferecida pelas flavanonas cítricas parece estar ligada à sua ação anti-inflamatória, como constatado neste estudo pela diminuição do infiltrado inflamatório, queda da expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumento da produção de IL-10 protegendo os tecidos envolvidos pela modulação positiva da resposta inflamatória.

Palavras – chave: Flavonoides. Flavanonas. Doenças periodontais. Anti-inflamatórios.

Carvalho JS. Ingestion of citrus flavonoids on the modulation of inflammatory response and level of bone loss promoted by periodontite induced in healthy mice [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of citrus flavonoids eriocitrin and eriodictyol on experimental periodontitis induced by injection of *E. coli* LPS in mice. Seventy BALB/c mice were submitted to different treatments: conventional diet, diet enriched with eriocitrin, diet enriched with eriodictyol, both at concentrations of 25 and 50 mg/kg per body weight / day and diet enriched with naproxen 10 mg/kg per body weight/day. After 30 days of supplementation, the animals were subjected to induction of experimental periodontitis by bilateral injection of LPS of *Escherichia coli* 3x/week for 4 weeks. Body weight, food and energy consumption were evaluated throughout the experimental period. At the end of the trial period the animals were euthanized and liver and maxilla were collected for microscopic analysis, quantification of bone loss by micro-Ct, microscopic and stereometric analysis of the jaws, pro and anti-inflammatory cytokine profile from the tissue gingival by multiplex immunoassay and evaluation of myeloperoxidase activity. In vitro cell viability was evaluated by MTT over a period of 48 hours and evaluation of cell proliferation of L929 fibroblast culture using the AlamarBlue® method for 1, 3 and 7 days. Throughout the experiment, animals that consumed food enriched with flavonoids or naproxen showed weight gain and food/energy consumption similar to the control groups. Microscopic analysis of the liver showed no hepatic changes. The microtomographic analysis showed that supplementation with citrus flavonoids prevented periodontal bone loss compared to the group of animals submitted only to LPS injection. In the stereometric analysis, there was a reduction in the infiltration of inflammatory cells in the gingival tissue adjacent to the upper first molar of the animals that received a diet supplemented with eriocitrin, eriodictyol or naproxen. It was observed that dietary supplementation with eriocitrin of 50mg/kg of body weight / day and both concentrations of eriodictyol attenuated the expression of IL-1β. Eriocitrin 25 and 50mg/kg per body weight/day and only 50mg/kg per body weight/day of eriodictyol reduced TNF-α production. All treatments except of eriodictyol 50m/kg per body weight/day and naproxen increased the expression of IL-10 and supplementation with eriocitrin and eriodictyol in all concentrations reduced the activity of MPO with clear anti-inflammatory activity. The in vitro results demonstrated that eriocitrin and eriodictyol at concentrations of 500 µM, 600 µM, 700 µM and 1 µM, 10 µM and 50 µM respectively, did not show cytotoxic effects on fibroblasts, while only eriocitrin at the same concentrations increased the fibroblast metabolic activity L929 after 7 days of treatment. The results allow us to conclude that the protection offered by the citrus flavanones seem to be linked to its anti-inflammatory action, as evidenced in this study by the reduction of the inflammatory infiltrate, a decrease in the expression of pro-inflammatory cytokines and an increase in IL-10 production protecting the tissues involved by the positive modulation of the inflammatory response.

Keywords: Flavonoids. Flavanones. Periodontal diseases. Anti-inflammatory agents.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA: Análise de Variância

ATP: Adenosina 5’-trifosfato

BCA: Método do Ácido Bicinconínico

CLR: Receptores do Tipo Lectina do Tipo C

CO_2: Dióxido de Carbono

COX: Ciclo-oxigenase

DAMP: Padrões Moleculares Associados a Danos Endógenos

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de Dimetilo

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EPO: Peroxidase de Eosinófilo

FBS: Soro Fetal Bovino

G-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos

GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

H/E: Hematoxilina e Eosina

HCL: Ácido Clorídrico

IFN- γ: Interferon-γ

IL: Interleucina

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível

IκB: Inibidor do Fator Nuclear *kappa* B

LDL-ox: LDL Oxidada

LPS: Lipopolissacarídeo

NFATc1: Fator Nuclear de Células T Ativadas

MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MCP-1: Proteína Quimeoatrativa de Macrófagos

MDA: Malondialdeído

MPO: Mieloperoxidase

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NF-κB: Fator Nuclear *kappa* B

NOD: Proteínas com Domínio de Ligação a Nucleotídeos e Oligomerização

Nrf2: Fator Nuclear Eritroide 2-relacionado ao Fator 2

OH: Radical Hidroxila

PAMP: Padrões Exógenos Moleculares Associados a Patógenos

PBS: Tampão Salina-Fosfato

PGE2: Prostaglandina E2

RANK: Receptor Ativador do NF-κB

RANK-L: Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear *kappa* B

RLR: Receptores Semelhantes ao Gene-I Induzido por Ácido Retinóico

SDH: Enzima Desidrogenase Succínica

SOD: Enzima Superóxido Dismutase

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TLR: Receptor de Reconhecimento Padrão Toll-like

µCT: Microtomografia Computadorizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença imuno-inflamatória multifatorial caracterizada pela destruição progressiva das estruturas de suporte dos dentes decorrente da resposta imune do hospedeiro frente a ação de microrganismos[1–5]. Durante a resposta imuno-inflamatória, várias classes de mediadores químicos oriundos do plasma, dos leucócitos, das plaquetas, do endotélio e do tecido conjuntivo interagem de maneira complexa no periodonto. Destaca-se aminas vasoativas, os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leoucotrienos e lipoxinas), as citocinas (fator de necrose tumoral, interleucina-1 e quimiocinas), as espécies reativas do oxigênio (ERO), o óxido nítrico (NO), as enzimas lisossômicas dos leucócitos e os neuropeptídios (substância P)[3]. Está bem estabelecido que a modulação da resposta imune-inflamatória pode atenuar o desenvolvimento da doença periodontal. Desta forma quando a resposta do hospedeiro é atenuada pela aplicação de inibidores ou por manipulação genética, a severidade da doença periodontal é reduzida, mesmo que as defesas antibacterianas possam ser enfraquecidas[3,6]. Isso sugere que a resposta do hospedeiro seja fundamental para a evolução da doença periodontal induzida por bactérias. Várias terapias coadjuvantes que promovam melhora dos resultados do tratamento periodontal convencional têm sido propostas, como por exemplo a utilização de flavonoides[1,7].

Os flavonoides são importantes produtos naturais que pertencem a uma classe de metabólitos secundários de plantas. Possuem estrutura polifenólica e são amplamente encontrados em frutas, legumes, nozes, sementes de grãos, cacau, chocolate, chá, soja, vinho tinto e ervas[8,9]. É conhecido que um litro de suco de laranja ou limão contém aproximadamente 450mg de hesperidina e 170mg de eriocitrina respectivamente[9,10]. Apresentam diversos e favoráveis efeitos bioquímicos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antiangiogênico, antiapoptótico, antimutagênico e neuroprotetor que estão associados a doenças inflamatórias, cânceres e doenças neurodegenerativas[8,11,12]. Também são conhecidos por serem potentes inibidores para várias enzimas, como xantina oxidase (XO), cicloxigenase (COX), lipoxigenase e fosfoinositídeo 3-quinase[7,13,14]. Essas preeminências apoiam os efeitos promotores da saúde dos flavonoides e como componentes indispensáveis em uma variedade de produtos nutracêuticos, farmacêuticos e aplicações cosméticas[1,14].

Os flavonoides cítricos são divididos em subgrupos de acordo com suas estruturas químicas destacando-se as flavanonas (hesperidina e eriocitrina, eriodictiol), flavonas (apigenina, diosmina), flavonois (quercetina, Isoquercetina), e antiocinas (cianidina, delfinidina, petunidina). Eriocitrina e sua forma aglicona eriodictiol são flavanonas abundantes em limas e limões que tem despertado interesse dos pesquisadores devido seus variados efeitos biológicos benéficos destacando suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias[15,16].

Com base nessas informações, o objetivo deste trabalho foi estabelecer fundamentos para o desenvolvimento de novas estratégias tanto para o controle quanto para a prevenção da doença periodontal inflamatória.

6 CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que a proteção oferecida pelas flavanonas cítricas eriocitrina e eriodictiol parece estar ligada à sua ação anti-inflamatória, como constatado neste estudo pela diminuição do infiltrado inflamatório, queda da expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumento da produção de IL-10 protegendo os tecidos envolvidos pela modulação positiva da resposta inflamatória. Esses achados suportam ainda mais a investigação contínua de flavonoides cítricos como possíveis agentes terapêuticos no tratamento da doença periodontal.

REFERÊNCIAS*

1. Kuo PJ, Fu E, Lin CY, Ku CT, Chiang CY, Fu MM, et al. Ameliorative effect of hesperidin on ligation-induced periodontitis in rats. J Periodontol. 2019; 90(3): 271–80.

2. da Costa TA, Silva MJ, Alves PM, Chica JE, Barcelos EZ, Giani MA et al. Inflammation biomarkers of advanced disease in nongingival tissues of chronic periodontitis patients. Mediators Inflamm. 2015; 2015: 983782.

3. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. J Dent Res. 2011; 90(2): 143–53.

4. Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG; Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol. 2011; 38(11): 44–8.

5. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. J Periodontol. 2005; 76(11): 2033–41.

6. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. J Periodontol. 2008; 79(8): 1585–91.

7. Fernández-Rojas B, Gutiérrez-Venegas G. Flavonoids exert multiple periodontic benefits including anti-inflammatory, periodontal ligament-supporting, and alveolar bone-preserving effects. Life Sci. 2018; 209: 435–54.

8. Caro-Ordieres T, Marín-Royo G, Opazo-Ríos L, Jiménez-Castilla L, Moreno JA, Gómez-Guerrero C, et al. The coming age of flavonoids in the treatment of diabetic complications. J Clin Med. 2020; 9(2): 346.

9. Barreca D, Gattuso G, Bellocco E, Calderaro A, Trombetta D, Smeriglio A et al. Flavanones: citrus phytochemical with health-promoting properties. Biofactors. 2017; 43(4): 495–506.

10. Caristi C, Bellocco E, Panzera V, Toscano G, Vadalà R, Leuzzi U. Flavonoids detection by HPLC-DAD-MS-MS in lemon juices from Sicilian cultivars. J Agric Food Chem. 2003; 51(12): 3528–34.

11. Zvaigzne G, Karkliņa D. Health promoting chemical components of orange juice. Proc Latv Acad Sci Sect B Nat Exact, Appl Sci. 2013; 67(4–5): 329–33.

12. Pfeiffer P, Hegedus A. Review of the molecular genetics of flavonoid biosynthesis in fruits. Acta Alimentaria. 2011; 40: 150-63.

* 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. Gutiérrez-Venegas G, Contreras-Sánchez A, Ventura-Arroyo JA. Anti-inflammatory activity of fisetin in human gingival fibroblasts treated with lipopolysaccharide. J Asian Nat Prod Res. 2014; 16(10): 1009–17.

14. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. J Nutr Sci. 2016; 5: e47.

15. He P, Yan S, Wen X, Zhang S, Liu Z, Liu X, et al. Eriodictyol alleviates lipopolysaccharide-triggered oxidative stress and synaptic dysfunctions in BV-2 microglial cells and mouse brain. J Cell Biochem. 2019; 120(9): 14756–70.

16. Liu H, Dong Y, Gao Y, Zhao L, Cai C, Qi D, et al. Hesperetin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and ameliorates lipopolysaccharide-induced bone loss. J Cell Physiol. 2019; 234(7): 11009–22.

17. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 197-216.

18. Mills KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. Nat Rev Immunol. 2011; 11(12): 807–22.

19. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. ScientificWorldJournal. 2013; 2013: 162750.

20. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. Phytother Res. 2015; 29(3): 323–31.

21. Nones J, Stipursky J, Costa SL, Gomes FC. Flavonoids and astrocytes crosstalking: implications for brain development and pathology. Neurochem Res. 2010; 35(7): 955–66.

22. Preethi Soundarya S, Sanjay V, Haritha Menon A, Dhivya S, Selvamurugan N. Effects of flavonoids incorporated biological macromolecules based scaffolds in bone tissue engineering. Int J Biol Macromol. 2018; 110: 74–87.

23. Bakhtiari M, Panahi Y, Ameli J, Darvishi B. Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. Biomed Pharmacother. 2017; 93: 218–29.

24. Ahmad S, Alam K, Hossain MM, Fatima M, Firdaus F, Zafeer MF, et al. Anti-arthritogenic and cardioprotective action of hesperidin and daidzein in collagen-induced rheumatoid arthritis. Mol Cell Biochem. 2016; 423(1-2): 115–27.

25. Babukumar S, Vinothkumar V, Velu P, Ramachandhiran D, Ramados Nirmal M. Molecular effects of hesperetin, a citrus flavanone on7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced buccal pouch squamous cell carcinoma in golden Syrian hamsters. Arch Physiol Biochem. 2017; 123(4): 265–78.

26. Al Mamun MA, Hosen MJ, Khatun A, Alam MM, Al-Bari MAA. Tridax procumbens flavonoids: a prospective bioactive compound increased osteoblast differentiation and trabecular bone formation. Biol Res. 2017; 50(1): 28.

27. Rothwell JA, Knaze V, Zamora-Ros R. Polyphenols: dietary assessment and role in the prevention of cancers. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2017; 20(6): 512–21.

28. Trentin MS, Verardi G, De C Ferreira M, de Carli JP, da Silva SO, Lima IF, et al. Most frequent oral lesions in patients with type 2 diabetes mellitus. J Contemp Dent Pract. 2017; 18(2): 107–11.

29. Manthey JA. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. Microcirculation. 2000; 7(6 Pt 2): S29–S34.

30. Shao H, Shen J, Wang M, Cui J, Wang Y, Zhu S, et al. Icariin protects against titanium particle-induced osteolysis and inflammatory response in a mouse calvarial model. Biomaterials. 2015; 60: 92–9.

31. Lee JK. Anti-inflammatory effects of eriodictyol in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 murine macrophages. Arch Pharm Res. 2011; 34(4): 671–9.

32. Sacerdote P, Carrabba M, Galante A, Pisati R, Manfredi B, Panerai AE. Plasma and synovial fluid interleukin-1, interleukin-6 and substance P concentrations in rheumatoid arthritis patients: effect of the nonsteroidal anti inflammatory drugs indomethacin, diclofenac and naproxen. Inflamm Res. 1995; 44(11): 486–90.

33. Al Mamun MA, Hosen MJ, Islam K, Khatun A, Alam MM, Al-Bari MA. Tridax procumbens flavonoids promote osteoblast differentiation and bone formation. Biol Res. 2015; 48: 65.

34. Oršolić N, Goluža E, Dikić D, Lisičić D, Sašilo K, Rođak E, et al. Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat. Eur J Nutr. 2014; 53(5): 1217–27.

35. Xu CQ, Liu BJ, Wu JF, Xu YC, Duan XH, Cao YX, et al. Icariin attenuates LPS-induced acute inflammatory responses: involvement of PI3K/Akt and NF-kappaB signaling pathway. Eur J Pharmacol. 2010; 642(1-3): 146–53.

36. Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, Chen MH. Icariin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF-κB regulated HIF-1α and PGE(2) synthesis. Phytomedicine. 2011; 18(2-3): 176–85.

37. Kim YJ, Bae YC, Suh KT, Jung JS. Quercetin, a flavonoid, inhibits proliferation and increases osteogenic differentiation in human adipose stromal cells. Biochem Pharmacol. 2006; 72(10): 1268–78.

38. Notoya M, Tsukamoto Y, Nishimura H, Woo JT, Nagai K, Lee IS, et al. Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro. Eur J Pharmacol. 2004; 485(1-3): 89–96.

39. Goto T, Hagiwara K, Shirai N, Yoshida K, Hagiwara H. Apigenin inhibits osteoblastogenesis and osteoclastogenesis and prevents bone loss in ovariectomized mice. Cytotechnology. 2015; 67(2): 357–65.

40. Sacco SM, Horcajada MN, Offord E. Phytonutrients for bone health during ageing. Br J Clin Pharmacol. 2013; 75(3): 697–707.

41. Chiba H, Uehara M, Wu J, Wang X, Masuyama R, Suzuki K, et al. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. J Nutr. 2003; 133(6): 1892–97.

42. Habauzit V, Nielsen IL, Gil-Izquierdo A, Trzeciakiewicz A, Morand C, Chee W, et al. Increased bioavailability of hesperetin-7-glucoside compared with hesperidin results in more efficient prevention of bone loss in adult ovariectomised rats. Br J Nutr. 2009; 102(7): 976–84.

43. Xue D, Chen E, Zhang W, Gao X, Wang S, Zheng Q, et al. The role of hesperetin on osteogenesis of human mesenchymal stem cells and its function in bone regeneration. Oncotarget. 2017;8(13):21031–43.

44. Kim JH, Kim N. Regulation of NFATc1 in osteoclast differentiation. J Bone Metab. 2014; 21(4): 233–41.

45. Song F, Zhou L, Zhao J, Liu Q, Yang M, Tan R, et al. Eriodictyol Inhibits RANKL-induced osteoclast formation and function via inhibition of NFATc1 activity. J Cell Physiol. 2016; 231(9): 1983–93.

46. Lee J, Noh AL, Zheng T, Kang JH, Yim M. Eriodicyol inhibits osteoclast differentiation and ovariectomy-induced bone loss in vivo. Exp Cell Res. 2015; 339(2): 380–8.

47. Mulvihill EE, Huff MW. protection from metabolic dysregulation, obesity, and atherosclerosis by citrus flavonoids: activation of hepatic PGC1α-mediated fatty acid oxidation. PPAR Res. 2012; 2012: 857142.

48. O'Neil CE, Nicklas TA, Rampersaud GC, Fulgoni VL 3rd. 100% orange juice consumption is associated with better diet quality, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2006. Nutr J. 2012; 11: 107.

49. Martens S, Mithöfer A. Flavones and flavone synthases [published correction appears in Phytochemistry. 2006; 67(5): 521. Phytochemistry. 2005; 66(20): 2399–2407.

50. Martens S, Preuss A, Matern U. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis thaliana L. Phytochemistry. 2010; 71(10): 1040–9.

51. Elburki MS, Rossa C Jr, Guimarães-Stabili MR, Lee HM, Curylofo-Zotti FA, Johnson F, et al. A chemically modified curcumin (CMC 2.24) inhibits nuclear factor κB activation and inflammatory bone loss in murine models of LPS-induced experimental periodontitis and diabetes-associated natural periodontitis. Inflammation. 2017; 40(4): 1436–49.

52. Ferreira PS, Spolidorio LC, Manthey JA, Cesar TB. Citrus flavanones prevent systemic inflammation and ameliorate oxidative stress in C57BL/6J mice fed high-fat diet. Food Funct. 2016; 7(6): 2675–81.

53. Miyake Y, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinae N, Osawa T. Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriocitrin-treated rats. J Agric Food Chem. 2000; 48(8): 3217–24.

54. Kim SY, Lee JY, Park YD, Kang KL, Lee JC, Heo JS. Hesperetin alleviates the inhibitory effects of high glucose on the osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells. PLoS One. 2013; 8(6): e67504.

55. Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Rémésy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. Eur J Clin Nutr. 2003; 57(2): 235–42.

56. Li F, Chow S, Cheung WH, Chan FL, Chen S, Leung LK. The citrus flavonone hesperetin prevents letrozole-induced bone loss in a mouse model of breast cancer. J Nutr Biochem. 2013; 24(6): 1112–6.

57. Hajialyani M, Hosein Farzaei M, Echeverría J, Nabavi SM, Uriarte E, Sobarzo-Sánchez E. Hesperidin as a neuroprotective agent: a review of animal and clinical evidence. Molecules. 2019; 24(3): 648.

58. Unger RH, Scherer PE. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. Trends Endocrinol Metab. 2010; 21(6): 345–52.

59. Miyake Y, Yamamoto K, Osawa T. Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7-rutinoside) from lemon fruit (citrus limon Burm. f.) and its antioxidative activity. Food Sci Technol Int Tokyo. 1997; 3(1): 84–9.

60. Assini JM, Mulvihill EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. Curr Opin Lipidol. 2013; 24(1): 34–40.

61. Bucolo C, Leggio GM, Drago F, Salomone S. Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. Biochem Pharmacol. 2012; 84(1): 88–92.

62. Miyake Y, Suzuki E, Ohya S, Fukumoto S, Hiramitsu M, Sakaida K, et al. Lipid-lowering effect of eriocitrin, the main flavonoid in lemon fruit, in rats on a high-fat and high-cholesterol diet. J Food Sci. 2006; 71: S633-S637.

63. Minato K, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, Shimomura Y, et al. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. Life Sci. 2003; 72(14): 1609–16.

64. Miyake Y, Mochizuki M, Okada M, Hiramitsu M, Morimitsu Y, Osawa T. Isolation of antioxidative phenolic glucosides from lemon juice and their suppressive effect on the expression of blood adhesion molecules. Biosci Biotechnol Biochem. 2007; 71(8): 1911–9.

65. Hiramitsu M, Shimada Y, Kuroyanagi J, Inoue T, Katagiri T, Zang L, et al. Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis. Sci Rep. 2014; 4: 3708.

66. Huang TC, Tseng KY, Tsai SS, Liu HJ, Ho CT, Lin HY, et al. Eriodictyol decreases very late antigen-4 (VLA-4) expression, cellular adhesion, and migration through an NFκB-dependent pathway in monocytes. J Funct Foods. 2010; 2(4): 263–70.

67. Hu Q, Zhang DD, Wang L, Lou H, Ren D. Eriodictyol-7-O-glucoside, a novel Nrf2 activator, confers protection against cisplatin-induced toxicity. Food Chem Toxicol. 2012; 50(6): 1927–32.

68. Jing X, Ren D, Wei X, Shi H, Zhang X, Perez RG, et al. Eriodictyol-7-O-glucoside activates Nrf2 and protects against cerebral ischemic injury. Toxicol Appl Pharmacol. 2013; 273(3): 672–9.

69. Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. Lipids. 1998; 33(7): 689–95.

70. Lee E, Jeong KW, Shin A, Jin B, Jnawali HN, Jun BH, et al. Binding model for eriodictyol to Jun-N terminal kinase and its anti-inflammatory signaling pathway. BMB Rep. 2013; 46(12): 594–9.

71. Nielsen IL, Chee WS, Poulsen L, Offord-Cavin E, Rasmussen SE, Frederiksen H, et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. J Nutr. 2006; 136(2): 404–8.

72. Yáñez JA, Remsberg CM, Miranda ND, Vega-Villa KR, Andrews PK, Davies NM. Pharmacokinetics of selected chiral flavonoids: hesperetin, naringenin and eriodictyol in rats and their content in fruit juices. Biopharm Drug Dispos. 2008; 29(2): 63–82.

73. Yamamoto M, Jokura H, Suzuki A, Hase T, Shimotoyodome A. Effects of continuous ingestion of hesperidin and glucosyl hesperidin on vascular gene expression in spontaneously hypertensive rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2013; 59(5): 470–3.

74. Yamashita M, Kumazoe M, Nakamura Y, Won YS, Bae J, Yamashita S, et al. The combination of green tea extract and eriodictyol inhibited high-fat/high-sucrose diet-induced cholesterol upregulation is accompanied by suppression of cholesterol synthesis enzymes. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2016; 62(4): 249–56.

75. Wang D, Liu L, Zhu X, Wu W, Wang Y. Hesperidin alleviates cognitive impairment, mitochondrial dysfunction and oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease. Cell Mol Neurobiol. 2014; 34(8): 1209–21.

76. Gonçalves D, Lima C, Ferreira P, Costa P, Costa A, Figueiredo W, et al. Orange juice as dietary source of antioxidants for patients with hepatitis C under antiviral therapy. Food Nutr Res. 2017; 61(1): 1296675.

77. Mulero J, Bernabé J, Cerdá B, García-Viguera C, Moreno DA, Albaladejo MD, et al. Variations on cardiovascular risk factors in metabolic syndrome after consume of a citrus-based juice. Clin Nutr. 2012; 31(3): 372–7.

78. Takumi H, Mukai R, Ishiduka S, Kometani T, Terao J. Tissue distribution of hesperetin in rats after a dietary intake. Biosci Biotechnol Biochem. 2011; 75(8): 1608-10.

79. Kwon EY, Choi MS. Dietary eriodictyol alleviates adiposity, hepatic steatosis, insulin resistance, and inflammation in diet-induced obese mice. Int J Mol Sci. 2019; 20(5): 1227.

80. Ferreira, PS. Biodistribuição e farmacocinética da eriocitrina em ratos e seus efeitos regulatórios em camundongos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmâceuticas da UNESP; 2018.

81. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. 1993; 123(11): 1939–51.

82. Balakrishnan A, Menon VP. Protective effect of hesperidin on nicotine induced toxicity in rats. Indian J Exp Biol. 2007; 45(2): 194–202.

83. Pingili R, Vemulapalli S, Mullapudi SS, Nuthakki S, Pendyala S, Kilaru N. Pharmacokinetic interaction study between flavanones (hesperetin, naringenin) and rasagiline mesylate in wistar rats. Drug Dev Ind Pharm. 2016; 42(7): 1110–7.

84. Kalpana KB, Devipriya N, Srinivasan M, Vishwanathan P, Thayalan K, Menon VP. Evaluating the radioprotective effect of hesperidin in the liver of Swiss albino mice. Eur J Pharmacol. 2011; 658(2-3): 206–12.

85. Kumar P, Kumar A. Protective effect of hesperidin and naringin against 3-nitropropionic acid induced Huntington's like symptoms in rats: possible role of nitric oxide. Behav Brain Res. 2010; 206(1): 38–46.

86. Mahmoud AM, Mohammed HM, Khadrawy SM, Galaly SR. Hesperidin protects against chemically induced hepatocarcinogenesis via modulation of Nrf2/ARE/HO-1, PPARγ and TGF-β1/Smad3 signaling, and amelioration of oxidative stress and inflammation. Chem Biol Interact. 2017; 277: 146–58.

87. Herrera BS, Coimbra LS, da Silva AR, Teixeira SA, Costa SK, Wallace JL, et al. The H2S-releasing naproxen derivative, ATB-346, inhibits alveolar bone loss and inflammation in rats with ligature-induced periodontitis. Med Gas Res. 2015; 5: 4.

88. Sehonova P, Plhalova L, Blahova J, Doubkova V, Prokes M, Tichy F, et al. Toxicity of naproxen sodium and its mixture with tramadol hydrochloride on fish early life stages. Chemosphere. 2017; 188: 414–23.

89. Vane JR, Botting RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. Inflamm Res. 1998; 47(2): S78–S87.

90. Goodrich KM, Dorenkott MR, Ye L, O'Keefe SF, Hulver MW, Neilson AP. Dietary supplementation with cocoa flavanols does not alter colon tissue profiles of native flavanols and their microbial metabolites established during habitual dietary exposure in C57BL/6J mice. J Agric Food Chem. 2014; 62(46): 11190–9.

91. Boivin GP, Bottomley MA, Schiml PA, Goss L, Grobe N. Physiologic, behavioral, and histologic responses to various euthanasia methods in c57bl/6ntac male mice. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2017; 56(1): 69–78.

92. Miao H, Dong Y, Zhang Y, Zheng H, Shen Y, Crosby G, et al. Anesthetic isoflurane or desflurane plus surgery differently affects cognitive function in alzheimer's disease transgenic mice. Mol Neurobiol. 2018; 55(7): 5623–38.

93. Lopes DEM, Jabr CL, Dejani NN, Saraiva AC, de Aquino SG, Medeiros AI, et al. Inhibition of 5-Lipoxygenase (5-Lo) attenuates inflammation and bone resorption in lipopolysaccharide (LPS)-induced periodontal disease. J Periodontol. 2017; 1–18.

94. de Paiva Gonçalves V, Ortega AAC, Steffens JP, Spolidorio DMP, Rossa C, Spolidorio LC. Long-term testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in the ligature-induced periodontal disease model. J Periodontol. 2018; 89(4): 466–75.

95. Wehrend A, Hetzel U, Huchzermeyer S, Klein C, Bostedt H. Sirius red is able to selectively stain eosinophil granulocytes in bovine, ovine and equine cervical tissue. Anat Histol Embryol. 2004; 33(3): 180–2.

96. Romeis B. Mikroskopische technik. 17th ed. München: Urban und Schwarzenberg; 1989. 697 p.

97. Guimarães MR, de Aquino SG, Coimbra LS, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. Innate Immun. 2012; 18(1): 155–63.

98. de Paiva Gonçalves V. Impacto de andrógenos sobre o processo de reparação tecidual e o mecanismo de reabsorção óssea [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

99. Kim HW, Blomkalns AL, Ogbi M, Thomas M, Gavrila D, Neltner BS, et al. Role of myeloperoxidase in abdominal aortic aneurysm formation: mitigation by taurine. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017; 313(6): H1168–H1179.

100. Xia Y, Zweier JL. Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. Anal Biochem. 1997; 245(1): 93–6.

101. Desser RK, Himmelhoch SR, Evans WH, Januska M, Mage M, Shelton E. Guinea pig heterophil and eosinophil peroxidase. Arch Biochem Biophys. 1972; 148(2): 452–65.

102. Mishra P, Singh U, Pandey CM, Mishra P, Pandey G. Application of student's t-test, analysis of variance, and covariance. Ann Card Anaesth. 2019; 22(4): 407–11.

103. Feehan KT, Gilroy DW. Is Resolution the end of inflammation?. Trends Mol Med. 2019; 25(3): 198–214.

104. Di Sanzo M, Cipolloni L, Borro M, La Russa R, Santurro A, Scopetti M, et al. Clinical applications of personalized medicine: a new paradigm and challenge. Curr Pharm Biotechnol. 2017; 18(3): 194–203.

105. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. Food Chem. 2019; 299: 125124.

106. Lopes Pires ME, Clarke SR, Marcondes S, Gibbins JM. Lipopolysaccharide potentiates platelet responses via toll-like receptor 4-stimulated Akt-Erk-PLA2 signalling. PLoS One. 2017; 12(11): e0186981.

107. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. Front Oral Biol. 2012; 15: 117–32.

108. de Aquino SG, Guimaraes MR, Stach-Machado DR, da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C Jr. Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats. Arch Oral Biol. 2009; 54(7): 609–17.

109. Kirkwood KL, Li F, Rogers JE, Otremba J, Coatney DD, Kreider JM, et al. A p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. J Pharmacol Exp Ther. 2007; 320(1): 56–63.

110. Ekuni D, Yamamoto T, Yamanaka R, Tachibana K, Watanabe T. Proteases augment the effects of lipopolysaccharide in rat gingiva. J Periodontal Res. 2003; 38(6): 591–6.

111. Oliveira SHP, Brito VGB, Frasnelli SCT, Ribeiro BDS, Ferreira MN, Queiroz DP, et al. Aliskiren attenuates the inflammatory response and wound healing process in diabetic mice with periodontal disease. Front Pharmacol. 2019; 10: 708.

112. Anbinder AL, Moraes RM, Lima GMG, Oliveira FE, Campos DRC, Rossoni RD, et al. Periodontal disease exacerbates systemic ovariectomy-induced bone loss in mice. Bone. 2016; 83: 241–7.

113. Johnson L, Almeida-da-Silva CLC, Takiya CM, Figliuolo V, Rocha GM, Weissmüller G, et al**.** Oral infection of mice with Fusobacterium nucleatum results in macrophage recruitment to the dental pulp and bone resorption. Biomed J. 2018; 41(3): 184–93.

114. Chen W, Gao B, Hao L, Zhu G, Jules J, MacDougall MJ, et al. The silencing of cathepsin K used in gene therapy for periodontal disease reveals the role of cathepsin K in chronic infection and inflammation. J Periodontal Res. 2016; 51(5): 647–60.

115. Baker PJ, Dixon M, Roopenian DC. Genetic control of susceptibility to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in mice. Infect Immun. 2000; 68(10): 5864–8.

116. de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, Finoti LS, Toffoli GB, Spolidorio DM, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. Clin Oral Investig. 2016; 20(6): 1203–16.

117. Marchesan J, Girnary MS, Jing L, Miao MZ, Zhang S, Sun L, et al. An experimental murine model to study periodontitis. Nat Protoc. 2018; 13(10): 2247–67.

118. Zaidi P, Kamal S. Radioimmunoassay: principle and technique. J Pak Med Assoc. 1993; 43(12): 264–7.

119. Kitagawa S. Liquid chromatography. Anal Sci. 2019; 35(9): 949–50.

120. Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress. Contemp Top Lab Anim Sci. 2004; 43(6): 42–51.

121. Vandenberg LN, Welshons WV, Vom Saal FS, Toutain PL, Myers JP. Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors?. Environ Health. 2014; 13(1): 46.

122. Walker MK, Boberg JR, Walsh MT, Wolf V, Trujillo A, Duke MS, et al. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. Toxicol Appl Pharmacol. 2012; 260(1): 65–9.

123. Bieger J, Cermak R, Blank R, de Boer VC, Hollman PC, Kamphues J, et al. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. J Nutr. 2008; 138(8): 1417–20.

124. Hsueh MF, Bolognesi MP, Wellman SS, Kraus VB. Anti-inflammatory effects of naproxen sodium on human osteoarthritis synovial fluid immune cells. Osteoarthritis Cartilage. 2020; S1063-4584(20): 30045-5.

125. He P, Yan S, Zheng J, Gao Y, Zhang S, Liu Z et al. Eriodictyol attenuates LPS-induced neuroinflammation, amyloidogenesis, and cognitive impairments via the inhibition of NF-κB in male C57BL/6J mice and BV2 microglial cells. J Agric Food Chem. 2018; 66(39): 10205–14.

126. Aras H, Cağlayan F, Güncü GN, Berberoğlu A, Kilinç K. Effect of systemically administered naproxen sodium on clinical parameters and myeloperoxidase and elastase-like activity levels in gingival crevicular fluid. J Periodontol. 2007; 78(5): 868–73.

127. Howell TH, Jeffcoat MK, Goldhaber P, Reddy MS, Kaplan ML, Johnson HG, et al. Inhibition of alveolar bone loss in beagles with the NSAID naproxen. J Periodontal Res. 1991; 26(6): 498–501.

128. Wojcieszyńska D, Guzik U. Naproxen in the environment: its occurrence, toxicity to nontarget organisms and biodegradation. Appl Microbiol Biotechnol. 2020; 104(5): 1849–57.

129. Liebelt R, Herron R. Stereometric analysis in the field of anatomy. Quantitative Imagery Biomed Sci. 1971; 26: 111-4.

130. Souza JAC, Magalhães FAC, Oliveira GJPL, DE Molon RS, Zuanon JA, Souza PPC. Pam2CSK4 (TLR2 agonist) induces periodontal destruction in mice. Braz Oral Res. 2020; 34: e012.

131. Buduneli E, Vardar-Sengül S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. J Periodontol. 2007; 78(1): 127–34.

132. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of inflammation. Methods Mol Biol. 2018; 1803: 57–79.

133. Chusid MJ. Eosinophils: friends or foes?. J Allergy Clin Immunol Pract. 2018; 6(5): 1439–44.

134. Peterson MW, Monick M, Hunninghake GW. Prognostic role of eosinophils in pulmonary fibrosis. Chest. 1987; 92(1): 51–6.

135. Bertão JM, de Almeida OP, do Nascimento A, Novaes PD, Bozzo L. Eosinophils during developing periodontal disease of rats. J Periodontal Res. 1985; 20(5): 467–74.

136. Wen T, Rothenberg ME. The regulatory function of eosinophils. Microbiol Spectr. 2016; 4(5): 10.1128/microbiolspec.MCHD-0020-2015.

137. Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, et al. Eosinophils from physiology to disease: a comprehensive review. Biomed Res Int. 2018; 2018: 9095275.

138. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. Annu Rev Immunol. 2015; 33: 643–75.

139. Olmos-Ortiz A, Déciga-García M, Preciado-Martínez E, Bermejo-Martínez L, Flores-Espinosa P, Mancilla-Herrera I**,** et al. Prolactin decreases LPS-induced inflammatory cytokines by inhibiting TLR-4/NFκB signaling in the human placenta. Mol Hum Reprod. 2019; 25(10): 660–7.

140. Zhang HX, Liu SJ, Tang XL, Duan GL, Ni X, Zhu XY, et al. H2S Attenuates LPS-induced acute lung injury by reducing oxidative/nitrative stress and inflammation. Cell Physiol Biochem. 2016; 40(6): 1603–12.

141. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. J Periodontol. 2014; 85(3): 465–77.

142. Maryam S, Khan MR, Shah SA, Zahra Z, Batool R, Zai JA. Evaluation of anti-inflammatory potential of the leaves of Wendlandia heynei (Schult.) Santapau & Merchant in Sprague Dawley rat. J Ethnopharmacol. 2019; 238: 111849.

143. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. J Exp Med. 2020; 217(1): e20190418.

144. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. Cytokine Growth Factor Rev. 2010; 21(5): 331–44.

145. Takanaski S, Nonaka R, Xing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. J Exp Med. 1994; 180(2): 711–5.

146. Joyce DA, Gibbons DP, Green P, Steer JH, Feldmann M, Brennan FM. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. Eur J Immunol. 1994; 24(11): 2699–705.

147. Hart PH, Hunt EK, Bonder CS, Watson CJ, Finlay-Jones JJ. Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. J Immunol. 1996; 157(8): 3672–80.

148. Jenkins JK, Malyak M, Arend WP. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. Lymphokine Cytokine Res. 1994; 13(1): 47–54.

149. Kwak SC, Baek JM, Lee CH, Yoon KH, Lee MS, Kim JY. umbelliferone prevents lipopolysaccharide-induced bone loss and suppresses RANKL-Induced osteoclastogenesis by attenuating Akt-c-Fos-NFATc1 Signaling. Int J Biol Sci. 2019; 15(11): 2427–37.

150. Kuritani M, Sakai N, Karakawa A, Isawa M, Chatani M, Negishi-Koga T, et al. Anti-mouse RANKL antibodies inhibit alveolar bone destruction in periodontitis model mice. Biol Pharm Bull. 2018; 41(4): 637–43.

151. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. Infect Immun. 1996; 64(7): 2371-80.

152. Deyhim F, Garica K, Lopez E, Gonzalez J, Ino S, Garcia M, et al. Citrus juice modulates bone strength in male senescent rat model of osteoporosis. Nutrition. 2006; 22(5): 559–63.

153. Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W, Key L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. J Biol Chem. 2001; 276(8): 5452–8.

154. Habauzit V, Sacco SM, Gil-Izquierdo A, Trzeciakiewicz A, Morand C, Barron D, et al. Differential effects of two citrus flavanones on bone quality in senescent male rats in relation to their bioavailability and metabolism. Bone. 2011; 49(5): 1108–16.

155. Gómez-Florit M, Monjo M, Ramis JM. Identification of quercitrin as a potential therapeutic agent for periodontal applications. J Periodontol. 2014; 85(7): 966–74.

156. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. Sensors (Basel). 2012; 12(9): 12347–60.

157. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem. 20000; 267(17): 5421–6.

158. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. Curr Pharm Biotechnol. 2016; 17(14): 1213–21.

159. Lv P, Yu J, Xu X, Lu T, Xu F. Eriodictyol inhibits high glucose-induced oxidative stress and inflammation in retinal ganglial cells. J Cell Biochem. 2019; 120(4): 5644–56.

160. San Miguel SM, Opperman LA, Allen EP, Zielinski J, Svoboda KK. Bioactive antioxidant mixtures promote proliferation and migration on human oral fibroblasts. Arch Oral Biol. 2011; 56(8): 812–22.

161. Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K., & Kaneko, T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. Biological & pharmaceutical bulletin. 2005; *28*(2), 253–9.

162. Mokdad-Bzeouich I, Mustapha N, Sassi A, Bedoui A, Ghoul M, Ghedira K, et al. Investigation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects of eriodictyol through its cellular anti-oxidant activity. Cell Stress Chaperones. 2016; 21(5): 773–81.

163. Saeidnia S, Manayi A, Abdollahi M. From in vitro experiments to in vivo and clinical studies; pros and cons. Curr Drug Discov Technol. 2015; 12(4): 218–24.

164. Ferreira de Oliveira JMP, Santos C, Fernandes E. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: Cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models. Phytomedicine. 2019; 152887.

165. Naz H, Tarique M, Ahamad S, Alajmi MF, Hussain A, Rehman MT, et al. Hesperidin-CAMKIV interaction and its impact on cell proliferation and apoptosis in the human hepatic carcinoma and neuroblastoma cells. J Cell Biochem. 2019; 120(9): 15119–30.

166. Wang Y, Yu H, Zhang J, Gao J, Ge X, Lou G. Hesperidin inhibits HeLa cell proliferation through apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress pathways and cell cycle arrest. BMC Cancer. 2015; 15: 682.

167. Gugliandolo E, Fusco R, D'Amico R, Peditto M, Oteri G, Di Paola R, et al. Treatment with a flavonoid-rich fraction of bergamot juice improved lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats. Front Pharmacol. 2019; 9: 1563.

168. Chen L, Wei Y, Zhao S, Zhang M, Yan X, Gao X, et al. Antitumor and immunomodulatory activities of total flavonoids extract from persimmon leaves in H_{22} liver tumor-bearing mice. Sci Rep. 2018; 8(1): 10523.

169. Marcouiller P, Pelletier JP, Guévremont M, Martel-Pelletier J, Ranger P, Laufer S, et al. Leukotriene and prostaglandin synthesis pathways in osteoarthritic synovial membranes: regulating factors for interleukin 1beta synthesis. J Rheumatol. 2005; 32(4): 704–12.

170. Kumar R, Caruso IP, Ullah A, Cornelio ML, Fossey MA, de Souza FP, et al. Exploring the binding mechanism of flavonoid quercetin to phospholipase A2: fluorescence spectroscopy and computational approach. Eur Exp Biol. 2017; 5: 33.

171. Novo Belchor M, Hessel Gaeta H, Fabri Bittencourt Rodrigues C, Ramos da Cruz Costa C, de Oliveira Toyama D, Domingues Passero LF, et al. Evaluation of rhamnetin as an inhibitor of the pharmacological effect of secretory phospholipase A2. Molecules. 2017; 22(9): 1441.

172. González Mosquera DM, Hernández Ortega Y, Fernández PL, González Y, Doens D, Vander Heyden Y, et al. Flavonoids from Boldoa purpurascens inhibit proinflammatory cytokines (TNF-α and IL-6) and the expression of COX-2. Phytother Res. 2018; 32(9): 1750–4.

173. Hanáková Z, Hošek J, Kutil Z, Temml V, Landa P, Vaněk T, et al. Anti-inflammatory activity of natural geranylated flavonoids: cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitory properties and proteomic analysis. J Nat Prod. 2017; 80(4): 999–1006.

174. Basu A, Masek E, Ebersole JL. Dietary polyphenols and periodontitis-a mini-review of literature. molecules. 2018; 23(7): 1786.