

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



Dania Ramadan

**O efeito da ingestão de hesperidina sobre a modulação da resposta
inflamatória e nível de perda óssea em camundongos com doença periodontal
induzida**

Araraquara

2020



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



Dania Ramadan

**O efeito da ingestão de hesperidina sobre a modulação da resposta
inflamatória e nível de perda óssea em camundongos com doença periodontal
induzida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de concentração em Periodontia.

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

Araraquara

2020

Ramadan, Dania

O efeito da ingestão de hesperidina sobre a modulação da resposta inflamatória e nível de perda óssea em camundongos com doença periodontal induzida / Dania Ramadan.-- 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. Doenças periodontais 3. Hesperidina
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

Dania Ramadan

**O efeito da ingestão de hesperidina sobre a modulação da resposta
inflamatória e nível de perda óssea em camundongos com doença periodontal
induzida**

Comissão julgadora

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio.

2º Examinador: Prof^a. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

3º Examinador: Prof^a. Dra. Thais Borges Cesar

Araraquara, 30 de março de 2020.

DADOS CURRICULARES

Dania Ramadan

NASCIMENTO: 17/05/1989 – Barretos/SP

FILIAÇÃO: Mohamad Ahmad Ramadan
Rola Mohamad Ahmad Ramadan

2007 - 2010

Graduação em Odontologia
Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, São Paulo,
Barretos

2012 - 2015

Especialização em Ortodontia
Centro Universitário Ingá, Minas Gerais, Uberaba.

2018 - 2020

Mestrado em Odontologia – Área de Concentração: Periodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, Araraquara, São Paulo.

Com amor, dedico este trabalho aqueles que são minha força, meu suporte e amor verdadeiro. Durante esses dois anos, sempre estiveram ao meu lado, confiando e acreditando em mim. Sem eles, nada seria possível.

A nossa maior recompensa é o apoio e reconhecimento daqueles que se importam verdadeiramente conosco!

Rola Ramadan, minha mãe.

Mohamad Ahmad Ramadan, meu pai.

Lina Ramadan, minha irmã.

Mohamad Nader Ramadan, meu irmão.

Abdul Hafiz El Moullem, meu noivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que está comigo em todos os momentos, iluminando, abençoando e permitindo a realização dos meus sonhos. “[...] Ele sabe o que há na terra e no mar; e não cai uma folha sem que Ele dissesse tenha ciência [...]” (6ª surata, versículo 59, Alcorão Sagrado).

Aos meus pais por sempre estarem ao meu lado, sendo o meu equilíbrio emocional, a força que eu preciso todos os dias e os dois maiores incentivadores das concretizações de meus objetivos. Ou seja, aqueles aos quais devo tudo o que me tornei. Pai, meu exemplo de docente e maior motivador, aquele que sempre acreditou e estimulou seus filhos ao caminho do saber. Minha gratidão a vocês, amores da minha vida.

Aos meus irmãos Lina e Mohamad Nader, que são minha fonte de inspiração e que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis, acreditando e reconhecendo meu trabalho, até mesmo quando eu não era capaz de acreditar. Em especial a minha irmã, pois, se não fosse ela, eu não teria trilhado o caminho acadêmico neste momento. Saibam que amo vocês incondicionalmente.

Ao meu noivo Abdul, por caminhar ao meu lado com amor, paciência, apoio e suporte, entendendo minha ausência em alguns momentos. Obrigada por sempre me incentivar na realização dos meus sonhos.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelas condições oferecidas para minha formação acadêmica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio, o qual tenho imensa admiração e tive o prazer de conhecer. Agradeço pela amizade, confiança, paciência e disposição com que me orientou para conclusão deste trabalho. Obrigada por acreditar em mim e por motivar-me em busca de novos desafios.

Ao meu amigo e coorientador Prof. Dr. Vinícius de Paiva Gonçalves pela amizade, paciência estímulo, colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Apreendi muito com você. Saiba da admiração que tenho por você.

À Profª Drª Denise Madalena Palomari Spolidorio por disponibilizar seus laboratórios e contribuir de forma direta e indireta na conclusão deste trabalho.

Ao meu amigo e parceiro de estudos Jhonatan de Souza Carvalho, pela companhia diária, amizade e parceria nos momentos de alegria e dificuldades. Certamente aprendemos muito um com o outro e vivemos momentos que serão sempre lembrados com muito carinho. Ter você ao meu lado tornou essa caminhada mais fácil e prazerosa!

Aos docentes do Departamento de Periodontia, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof^a Dr^a. Silvana Regina Perez Orrico, Prof^a Dr^a Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Prof. Dr. Élcio Marcantonio Júnior, Prof^a Dr^a Daniela Leal Zandin-Barcelos, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Prof^a Dr^a Morgana Rodrigues Guimarães Stabili, exemplos de competência e sucesso.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Periodontia pelo convívio alegre e enriquecedor. Uma turma que me proporcionou viver os melhores momentos. Em especial as minhas companheiras diárias: Flávia, Karen, Lorena e Renata, as quais estiveram comigo nos momentos de dificuldades e de alegria, sendo apoio e suporte.

À Prof^a.Dr^a Thais Borges Cesar por ter cedido seu laboratório e por toda colaboração e suporte no início do trabalho

Ao Prof. Dr. John Manthey por ter cedido os flavonoides para realização e desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti por ter cedido seu laboratório e permitido que suas alunas Tayra e Renata colaborassem em uma das análises deste trabalho.

À equipe de trabalho e amigos do Departamento de Patologia: Juliana Pirola e, José Antônio Zuanon, pelo convívio diário, momentos de alegria, apoio e auxílio em tudo que foi necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À Beatriz Fuller pela paciência, dedicação em ensinar todo protocolo de suplementação e cuidado com os animais, e Valéria Mallavolta pela colaboração ao final do período experimental.

Ao Prof. Dr. Marcell Medeiros pela disponibilidade em ensinar e ajudar.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Huacho pelo auxílio e colaboração em tudo que foi preciso para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários da FOAR: porteiros, secretários da seção de pós-graduação, equipe de recepção aos pacientes, bibliotecárias e equipe de limpeza, em especial a Romilda Medrado e Sandra Rodrigues, que sempre cuidaram do nosso departamento de Patologia com muito amor e carinho, além da amizade e das prazerosas conversas.

À minha amiga Rafaella da Cruz Polizelli Scannavino pela amizade, carinho, incentivo e por, mesmo à distância, ter estado sempre ao meu lado.

Aos meus professores do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, em especial ao Prof. Dr. Alex Martins e Prof. Dr. Fábio Scannavino, que sempre acreditaram em mim, incentivando e apoiando mesmo à distância. Saibam de todo carinho que tenho por vocês. Ao Prof. Me. Marcelo Vieira, que despertou em mim o amor pela Periodontia.

Ao meu amigo e Prof. Dr. Marcelo Lancelloti por ter aguçado em mim o caminho da pesquisa, além de auxiliar em todo meu percurso desses dois anos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, pois, o presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq).

Ao Jhonatan de Souza Carvalho pela contribuição de todo material utilizado em nossa pesquisa, cujo projeto de pesquisa teve financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/12260-0).

Enfim, a todos que colaboraram direta e indiretamente para que o resultado fosse a conclusão deste trabalho. Muito obrigada.

Aos **camundongos**, que deram suas vidas para que fosse possível a realização deste trabalho.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas sim o que ele se torna com isso.”

John Ruskin.

Ramadan D. O efeito da ingestão de hesperidina sobre a modulação da resposta inflamatória e nível de perda óssea em camundongos com doença periodontal induzida [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da hesperidina(Hesp) sobre a periodontite experimental induzida por injeção de LPS de *E. coli* em camundongos. 50 camundongos BALB/c foram submetidos a diferentes tratamentos: dieta convencional, dieta enriquecida com hesperidina (25 e 50 mg/kg de peso corporal/dia) e dieta com naproxeno 10mg/kg de peso corporal/dia. Após 30 dias de suplementação os animais foram submetidos a periodontite induzida pela injeção bilateral de *Escherichia coli* 3x/semana por 4 semanas. Avaliou-se o peso corporal, consumo alimentar e energético ao longo de todo período experimental. Depois de 3 dias da última injeção de LPS os animais foram eutanasiados, coletados fígado e maxila e realizada a análise microscópica do fígado, quantificação de perda óssea por micro-Ct, análise microscópica e estereométrica dos maxilares, perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias por imunoensaio multiplex e avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO). In vitro foi avaliada a viabilidade celular por MTT e avaliação da proliferação celular através do método de AlamarBlue®, em cultura de fibroblastos L929 em 1,3 e 7 dias. Ao final do experimento os animais que consumiram ração enriquecida com hesperidina ou naproxeno apresentaram ganho de peso e consumo alimentar e energético semelhante ao grupo controle. Na análise microscópica do fígado não foram encontradas alterações hepáticas. O micro-CT revelou significativo aumento da perda óssea no grupo LPS, no qual foi prevenida pela hesperidina ou naproxeno. A análise estereométrica revelou menor infiltrado de células inflamatórias na mucosa palatina da região de primeiro molar superior direito nos grupos que foram suplementados com hesperidina ou naproxeno. Observou-se que a suplementação alimentar com hesperidina 50mg/kg de peso corporal/dia atenuou a expressão de IL-1 β . As duas concentrações de hesperidina ou naproxeno não alteraram a expressão deTNF- α quando comparadas ao grupo LPS enquanto que, a suplementação com hesperidina em ambas concentrações aumentaram a expressão de IL-10. A suplementação alimentar com hesperidina ou naproxeno reduziram a atividade de MPO com clara atividade anti-inflamatória. Os resultados in vitro não mostram efeitos citotóxicos nas concentrações mais baixas. A hesperidina não mostrou atividade metabólica de fibroblastos L929 após 7 dias de tratamento. Os resultados permitem concluir que a suplementação com hesperidina em sua dose mais alta reduziu perda óssea e infiltrado inflamatório na doença periodontal experimental sugerindo, portanto que, a hesperidina apresente ação promissora na modulação do processo inflamatório associado a doença periodontal experimental.

Palavras-chave: Flavonoides. Doenças Periodontais. Hesperidina. Anti-Inflamatórios.

Ramadan D. The effect of hesperidin intake on the modulation of the inflammatory response and level of bone loss in mice with induced periodontal disease [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of hesperidin (Hesp) on experimental periodontitis induced by injection of *E. coli* LPS in mice. 50 BALB /c mice were submitted to different treatments: conventional diet, enriched diet with hesperidin (25 and 50 mg / kg of body weight / day) and diet with naproxen 10 mg / kg of body weight / day. After 30 days of supplementation, the animals were submitted to periodontitis induced by bilateral injection of *Escherichia coli* 3x / week for 4 weeks. Body weight, food and energy consumption were evaluated throughout the experimental period. After 3 days of the last LPS injection, the animals were euthanized, liver and maxilla were collected and microscopic analysis of the liver was carried out, quantification of bone loss by micro-Ct, microscopic and stereometric analysis of the jaws, pro and anti-inflammatory cytokine profile by multiplex immunoassay and evaluation of myeloperoxidase (MPO) activity. In vitro cell viability was evaluated by MTT and evaluation of cell proliferation using the AlamarBlue method, in culture of L929 fibroblasts in 1.3 and 7 days. At the end of the experiment, the animals that consumed enriched food with hesperidin or naproxen showed weight gain and food and energy consumption similar to the control group. Microscopic analysis of the liver showed no liver abnormalities. The micro-CT revealed a significant increase in bone loss in the LPS group, in which it was prevented by hesperidin or naproxen. The stereometric analysis revealed a lower infiltration of inflammatory cells in the palatal mucosa of the upper right first molar region in groups that were supplemented with hesperidin or naproxen. It was observed that food supplementation with hesperidin 50mg / kg of body weight / day attenuated the expression of IL-1 β . The two concentrations of hesperidin or naproxen did not alter the expression of TNF- α when compared to the LPS group, whereas supplementation with hesperidin in both concentrations increased the expression of IL-10. Food supplementation with hesperidin or naproxen reduced the activity of MPO with clear anti-inflammatory activity. In vitro results do not show cytotoxic effects at lower concentrations. Hesperidin did not show metabolic activity of L929 fibroblasts after 7 days of treatment. The results allow us to conclude that supplementation with hesperidin in its highest dose reduced bone loss and inflammatory infiltrate in experimental periodontal disease, suggesting, therefore, that hesperidin presents a promising action in modulating the inflammatory process associated with experimental periodontal disease.

Keywords: Flavonoids. Periodontal diseases. Hesperidin. Anti-Inflammatory Agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica dos flavonoides	24
Figura 2 - Peso dos animais por grupo em gramas	41
Figura 3 - Média do consumo alimentar e consumo energético diário	42
Figura 4 - Cortes histológicos do tecido hepático.....	43
Figura 5 - Ação da hesperidina sobre a perda óssea	44
Figura 6 - Análise Estereométrica e aspectos microscópicos com coloração em H&E	46
Figura 7 - Análise Estereométrica e aspectos microscópicos corados com Picrosirius Red modificado	47
Figura 8 - Análise Estereométrica e aspectos microscópicos corados com Tricrômico de masson.....	48
Figura 9 - Concentração tecidual de citocinas inflamatórias	49
Figura 10 - Atividade de mieloperoxidase.....	50
Figura 11 - Efeitos citotóxicos da hesperidina	51
Figura 12 - Atividade metabólica celular após tratamento com hesperidina.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Levantamento de estudos que realizaram dieta suplementada com flavonoides cítricos em modelos in vivo	29
Quadro 2 - Composição da dieta padrão AIN 93M.....	31
Quadro 3 - Distribuição dos grupos de estudo e protocolo experimental	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA: Análise de Variância

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

BCA: Método do ácido bicinconínico

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CLR: Receptores do tipo lectina do tipo C

CO₂: Dióxido de carbono

CONCEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX: Cicloxigenase

DAMP: Padrões moleculares associados a danos endógenos

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPO: Peroxidase eosinofílica

FBS: Soro fetal bovino

G-CSF: Fator estimulante de colônias de granulócitos

GM-CSF: Fator estimulante de colônias de granulócitos-monócitos

H/E: hematoxilina e eosina

HCL: Ácido clorídrico

Hesp25: Hesperidina 25mg/kg/dia

Hesp50: Hesperidina 50mg/kg/dia

IFN- γ : Interferon- γ

IL: Interleucina

iNOS: Isoforma indutível da NOS

I κ B: Inibidor do NF- κ B

LDL-ox: LDL oxidada

LPS: Lipopolissacarídeo

MCP-1: Proteína quimioatrativa de macrófagos

MDA: Malondialdeído

MPO: Mieloperoxidase

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

NF- κ B: Fator de transcrição nuclear *kappa* B

NOD-like receptors: Receptor de domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo

Nrf2: Fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2

OH: Radical hidroxil

PAMP: Padrões exógenos moleculares associados a patógenos

PBS: Solução salina de fosfato tamponada

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

TRL: Receptor de reconhecimento padrão toll-like

μCT: Microtomografia Computadorizada

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
2 PROPOSIÇÃO	20
2.1 Hipótese	20
2.2 Objetivo Geral	20
2.3 Objetivo Específico	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Ação dos Flavonoides sobre a Inflamação	21
3.2 Ação dos Flavonoides sobre o Metabolismo Ósseo	22
3.3 Flavanonas - Hesperidina, Eriodictiol e Eriocitrina	23
3.4 Fundamentos dos Efeitos da Suplementação de Flavonoides em Experimentos In Vivo Considerando como Componentes da Dieta	27
4 MATERIAL E MÉTODO	30
4.1 Animais	30
4.2 Composição da Dieta	30
4.3 Suplementos	31
4.4 Consumo Alimentar e Energético	32
4.5 Peso Corporal	33
4.6 Indução de Doença Periodontal	33
4.7 Eutanásia, Coleta de Análise das Amostras	33
4.8 Microtomografia Computadorizada (μCT)	34
4.9 Picro Sirius Red Modificado para Coloração de Eosinófilos	35
4.10 Análise Estereométrica	35
4.11 Expressão de Citocinas no Tecido Gengival (Multiplex)	36
4.12 Atividade de Mieloperoxidase (MPO)	36
4.13 Análises In Vitro	37
4.13.1 Soluções testes	37
4.13.2 Cultura celular	37
4.13.3 Citotoxicidade da hesperidina	38
4.13.4 Efeito da hesperidina sobre a proliferação celular	39
4.14 Análise Estatística dos Resultados	39
5 RESULTADOS	41
5.1 A Adição dos Suplementos na Ração Padrão não Modificou a Média do Peso Corporal	41
5.2 A Suplementação Alimentar com hesperidina e Naproxeno não Induziu Alterações Hepáticas	42

5.3 A Suplementação Alimentar com Hesperidina Inibiu Perda Óssea Induzida pelo LPS de <i>E. coli</i>	43
5.4 Aspectos Microscópicos	44
5.5 Análise Estereométrica	45
5.5.1 Suplementação de hesperidina ou naproxeno na ração padrão diminuiu a quantidade de figuras que participam do processo inflamatório e favoreceu a formação de matriz extracelular	45
5.6 A Suplementação Alimentar Com Hesperidina Atenuou a Expressão de Citocinas Inflamatórias na Mucosa Palatina da Região de Primeiro Molar Superior Direito de Camundongos que Receberam Injeções de LPS	48
5.7 Houve Queda da Atividade de MPO Quando os Animais Receberam Dieta Enriquecida com Flavonoides Cítricos	50
5.8 Citotoxicidade da Hesperidina	50
5.9 Atividade Metabólica de Fibroblastos L929	51
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	75

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença imune-inflamatória multifatorial caracterizada pela destruição progressiva das estruturas de suporte dos dentes decorrente da resposta imune do hospedeiro frente a ação de microrganismos¹⁻⁵. Durante a resposta imune-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, leucotrienos 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 neuropeptídeos (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 uma classe importante de 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 de grãos, cacau, chocolate, chá, soja, vinho tinto e ervas^{8,9}. Apresentam diversos e favoráveis efeitos bioquímicos, antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-angiogênico, anti-apoptótico, anti-mutagênico, neuroprotetor e anti-hiperlipídico que estão associados a doenças inflamatórias, câncer e doenças neurodegenerativas^{8,10,11}. Também são conhecidos por serem potentes inibidores para várias enzimas, como xantina oxidase (XO), ciclo-oxigenase (COX), lipoxigenase e fosfoinositídeo 3-quinase^{7,12,13}. Essas preeminências apoiam os efeitos promotores da saúde dos flavonoides e são um componente indispensável em uma variedade de produtos nutracêuticos, farmacêuticos e aplicações cosméticas^{1,13}.

Os flavonoides cítricos são divididos em subgrupos de acordo com suas estruturas químicas destacando-se as flavanonas (hesperidina, e eriodictiol), flavonas

(apigenina, diosmina), flavonóis (quercetina, Isoquercetina), e antiocinas (cianidina, delphinidina e 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^{14,15}.

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 de doença periodontal inflamatória. A hipótese é que a complementação ou suplementação de flavonoides cítricos como a hesperidina na dieta, corrobore para que o equilíbrio na relação LPS bacteriano-resposta imunoinflamatória, perdido na periodontite, possa ser recuperado pelo favorecimento da ação desses compostos na modulação da resposta imune.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais utilizadas no presente estudo conclui-se que:

A suplementação alimentar com hesperidina ou naproxeno mostrou preservar o tecido ósseo comparado ao grupo que recebeu injeções de LPS na análise da porcentagem de volume ósseo periodontal por microtomografia computadorizada (μ CT);

Os animais que receberam suplementação com a flavonona hesperidina ou naproxeno não apresentaram efeito hepatotóxico;

A flavanona hesperidina ou naproxeno demonstraram uma diminuição do infiltrado de células inflamatórias na região adjacente ao primeiro molar superior, podendo sugerir ação promissora no processo inflamatório;

A flavanona hesperidina ou naproxeno diminuíram a expressão de marcadores inflamatórios como a citocina IL-1 β e aumentaram a expressão de IL-10, entretanto apenas o naproxeno demonstrou aumento da citocina IL-1 β sugerindo a hipótese de que a queda de prostaglandinas indiretamente elevou o aumento da expressão de IL-1 β .

REFERÊNCIAS*

1. Kuo PJ, Fu E, Lin CY, 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, 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(Suppl 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(Suppl 11): 2033–41.
6. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008; 79(8 Suppl): 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, 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, et al. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *Biofactors.* 2017; 43(4): 495–506.
10. 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.
11. Pfeiffer P, Hegedus A. Review of the molecular genetics of flavonoid biosynthesis in fruits. *Acta Alimentaria.* 2011; (40): 150-63.
12. 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.
13. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016; 5: e47.

* 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>

14. He P, Yan S, Wen 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.
15. Liu H, Dong Y, Gao Y, et al. Hesperetin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and ameliorates lipopolysaccharide-induced bone loss. *J Cell Physiol.* 2019; 234(7): 11009–22.
16. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 197-216.
17. Mills KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(12): 807–22.
18. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal.* 2013; 2013: 162750.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Ahmad S, Alam K, Hossain MM, et al. Anti-arthritis and cardioprotective action of hesperidin and daidzein in collagen-induced rheumatoid arthritis. *Mol Cell Biochem.* 2016; 423(1-2): 115–27.
24. Babukumar S, Vinothkumar V, Velu P, Ramachandhiran D, Ramados Nirmal M. Molecular effects of hesperetin, a citrus flavanone on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced buccal pouch squamous cell carcinoma in golden Syrian hamsters. *Arch Physiol Biochem.* 2017; 123(4): 265–78.
25. 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.
26. 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.
27. Trentin MS, Verardi G, De C Ferreira M, et al. Most Frequent Oral Lesions in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Contemp Dent Pract.* 2017; 18(2): 107–11.

28. Manthey JA. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation*. 2000; 7(6 Pt 2): S29–S34.
29. Shao H, Shen J, Wang M, et al. Icariin protects against titanium particle-induced osteolysis and inflammatory response in a mouse calvarial model. *Biomaterials*. 2015; (60): 92–9.
30. Lee JK. Anti-inflammatory effects of eriodictyol in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 murine macrophages. *Arch Pharm Res*. 2011; 34(4): 671–9.
31. 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.
32. 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.
33. Oršolić N, Goluža E, Dikić D, 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.
34. Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, Chen MH. Icariin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF- κ B regulated HIF-1 α and PGE(2) synthesis. *Phytomedicine*. 2011; 18(2-3): 176–85.
35. Xu CQ, Liu BJ, Wu JF, 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. 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.
37. Notoya M, Tsukamoto Y, Nishimura H, et al. Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro. *Eur J Pharmacol*. 2004; 485(1-3): 89–96.
38. 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.
39. Sacco SM, Horcajada MN, Offord E. Phytonutrients for bone health during ageing. *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 75(3): 697–707.
40. Chiba H, Uehara M, Wu J, et al. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. *J Nutr*. 2003; 133(6): 1892–7.

41. Habauzit V, Nielsen IL, Gil-Izquierdo A, 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.
42. Xue D, Chen E, Zhang W, 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.
43. Kim JH, Kim N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab.* 2014; 21(4): 233–41.
44. Song F, Zhou L, Zhao J, et al. Eriodictyol Inhibits RANKL-Induced Osteoclast Formation and Function Via Inhibition of NFATc1 Activity. *J Cell Physiol.* 2016; 231(9): 1983–93.
45. Mulvihill EE, Huff MW. Protection from Metabolic Dysregulation, Obesity, and Atherosclerosis by Citrus Flavonoids: Activation of Hepatic PGC1 α -Mediated Fatty Acid Oxidation. *PPAR Res.* 2012; 2012: 857142.
46. 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.
47. Martens S, Mithöfer A. Flavones and flavone synthases [published correction appears in *Phytochemistry.* 2006; 67(5): 521. *Phytochemistry.* 2005; 66(20): 2399–407.
48. Martens S, Preuss A, Matern U. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry.* 2010; 71(10): 1040–9.
49. Elburki MS, Rossa C Jr, Guimarães-Stabili MR, et al. A Chemically Modified Curcumin (CMC 2.24) Inhibits Nuclear Factor κ B Activation and Inflammatory Bone Loss in Murine Models of LPS-Induced Experimental Periodontitis and Diabetes-Associated Natural Periodontitis. *Inflammation.* 2017; 40(4): 1436–49.
50. 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.
51. Miyake Y, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinai 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.
52. 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.
53. 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.

54. 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.
55. Unger RH, Scherer PE. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(6):345–352.
56. Miyake, Y., Yamamoto, K., & Osawa, T. (1997). 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.
57. Assini JM, Mulvihill EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2013; 24(1): 34–40.
58. 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.
59. Miyake, Y., Suzuki, E., Ohya, S., Fukumoto, S., Hiramitsu, M., Sakaida, K., Osawa, T. and Furuichi, Y. Lipid-Lowering Effect of Eriocitrin, the Main Flavonoid in Lemon Fruit, in Rats on a High-Fat and High-Cholesterol Diet. *Journal of Food Science*, 2006; (71): S633-7.
60. 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.
61. 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.
62. Hiramitsu M, Shimada Y, Kuroyanagi J, et al. Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis. *Sci Rep*. 2014; (4): 3708.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. Lee E, Jeong KW, Shin A, et al. Binding model for eriodictyol to Jun-N terminal kinase and its anti-inflammatory signaling pathway. *BMB Rep*. 2013; 46(12): 594–99.

68. Nielsen IL, Chee WS, Poulsen L, 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.
69. 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.
70. 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.
71. Yamashita M, Kumazoe M, Nakamura Y, 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.
72. 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.
73. Gonçalves D, Lima C, Ferreira P, et al. Orange juice as dietary source of antioxidants for patients with hepatitis C under antiviral therapy. *Food Nutr Res*. 2017; 61(1): 1296675.
74. Mulero J, Bernabé J, Cerdá B, et al. Variations on cardiovascular risk factors in metabolic syndrome after consume of a citrus-based juice. *Clin Nutr*. 2012; 31(3): 372–7.
75. 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.
76. 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.
77. 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 Farmacêuticas da UNESP; 2018.
78. 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.
79. Balakrishnan A, Menon VP. Protective effect of hesperidin on nicotine induced toxicity in rats. *Indian J Exp Biol*. 2007; 45(2): 194–202.

80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. Mahmoud AM, Mohammed HM, Khadrawy SM, Galaly SR. Hesperidin protects against chemically induced hepatocarcinogenesis via modulation of Nrf2/ARE/HO-1, PPAR γ and TGF- β 1/Smad3 signaling, and amelioration of oxidative stress and inflammation. *Chem Biol Interact*. 2017; 277: 146–58.
84. Herrera BS, Coimbra LS, da Silva AR, 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.
85. Sehonova P, Pihalova L, Blahova J, et al. Toxicity of naproxen sodium and its mixture with tramadol hydrochloride on fish early life stages. *Chemosphere*. 2017; (188): 414–23.
86. Vane JR, Botting RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm Res*. 1998; 47(2): S78–S87.
87. 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.
88. 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.
89. Miao H, Dong Y, Zhang Y, 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.
90. Lopes DEM, Jabr CL, Dejadi 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.
91. 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.
92. Romeis B. *Mikroskopische technik*. 17th ed. München: Urban und Schwarzenberg; 1989. 697 p.

93. Kim HW, Blomkalns AL, Ogbi M, et al. Role of myeloperoxidase in abdominal aortic aneurysm formation: mitigation by taurine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017; 313(6): H1168–79.
94. Xia Y, Zweier JL. Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. *Anal Biochem*. 1997; 245(1): 93–6.
95. 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.
96. Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Mercier S, et al. Molecular mechanism of hesperetin-7-O-glucuronide, the main circulating metabolite of hesperidin, involved in osteoblast differentiation. *J Agric Food Chem*. 2010; 58(1): 668–75.
97. Feehan KT, Gilroy DW. Is Resolution the End of Inflammation?. *Trends Mol Med*. 2019; 25(3): 198–214.
98. Di Sanzo M, Cipolloni L, Borro M, et al. Clinical Applications of Personalized Medicine: A New Paradigm and Challenge. *Curr Pharm Biotechnol*. 2017; 18(3): 194–203.
99. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem*. 2019; (299): 125124.
100. 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.
101. 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.
102. Kirkwood KL, Li F, Rogers JE, et al. A p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 320(1): 56–63.
103. 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.
104. de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, 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.
105. Marchesan J, Girnary MS, Jing L, et al. An experimental murine model to study periodontitis. *Nat Protoc*. 2018; 13(10): 2247–67.
106. Zaidi P, Kamal S. Radioimmunoassay: principle and technique. *J Pak Med Assoc*. 1993; 43(12): 264–7.

107. Kitagawa S. Liquid Chromatography. *Anal Sci.* 2019; 35(9): 949–50.
108. Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2004; 43(6): 42–51.
109. 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.
110. Walker MK, Boberg JR, Walsh MT, et al. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 260(1): 65–9.
111. Bieger J, Cermak R, Blank R, et al. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J Nutr.* 2008; 138(8): 1417–20.
112. 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.
113. Goldstein JL, Cryer B. Gastrointestinal injury associated with NSAID use: a case study and review of risk factors and preventative strategies. *Drug Healthc Patient Saf.* 2015 Jan 22; (7): 31–41.
114. Aras H, Çağlayan F, Güncü GN, Berberoğlu A, Kiliç 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.
115. Howell TH, Jeffcoat MK, Goldhaber P, et al. Inhibition of alveolar bone loss in beagles with the NSAID naproxen. *J Periodontal Res.* 1991; 26(6): 498–501.
116. Wojcieszńska D, Guzik U. Naproxen in the environment: its occurrence, toxicity to nontarget organisms and biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020; 104(5): 1849–57.
117. Liebelt, Robert & Herron, R. *Stereometric Analysis in the field of anatomy. Quantitative imagery in the biomedical Sci.* 1971; (26): 111-4.
118. 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.
119. 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.
120. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of Inflammation. *Methods Mol Biol.* 2018; 1803: 57–79.

121. Chusid MJ. Eosinophils: Friends or Foes? *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018; 6(5): 1439–44.
122. Peterson MW, Monick M, Hunninghake GW. Prognostic role of eosinophils in pulmonary fibrosis. *Chest.* 1987; 92(1): 51–6.
123. 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.
124. Wen T, Rothenberg ME. The regulatory function of eosinophils. *Microbiol Spectr.* 2016; 4(5): 10.1128/microbiolspec.MCHD-0020-2015.
125. 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 Jan 28; 2018: 9095275. doi: 10.1155/2018/9095275.
126. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol.* 2015; (33): 643–75.
127. Olmos-Ortiz A, Déciga-García M, Preciado-Martínez E, 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.
128. Zhang HX, Liu SJ, Tang XL, et al. H₂S Attenuates LPS-induced acute lung injury by reducing oxidative/nitrative stress and inflammation. *Cell Physiol Biochem.* 2016; 40(6): 1603–12.
129. 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): 155–163.
130. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol.* 2014; 85(3): 465–477.
131. 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 Jun 28; 238: 111849. doi: 10.1016/j.jep.2019.111849. Epub 2019 Apr 4.
132. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med.* 2020 Jan 6; 217(1). pii: e20190418. doi:10.1084/jem.20190418.
133. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21(5): 331–44.
134. Takanashi 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.

135. 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.
136. 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.
137. 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.
138. 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.
139. Kuritani M, Sakai N, Karakawa A, et al. Anti-mouse RANKL Antibodies Inhibit Alveolar Bone Destruction in Periodontitis Model Mice. *Biol Pharm Bull.* 2018; 41(4): 637–43.
140. 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.
141. Deyhim F, Garica K, Lopez E, et al. Citrus juice modulates bone strength in male senescent rat model of osteoporosis. *Nutrition.* 2006; 22(5): 559–63.
142. 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.
143. Habauzit V, Sacco SM, Gil-Izquierdo A, 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.
144. 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.
145. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel).* 2012 Sept 10; 12(9): 12347–60.
146. 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.* 2000; 267(17): 5421–6.
147. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016; 17(14): 1213–21.

148. Chen MC, Ye YY, Ji G, Liu JW. Hesperidin upregulates heme oxygenase-1 to attenuate hydrogen peroxide-induced cell damage in hepatic L02 cells. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(6): 3330–5.
149. Gómez-Zorita S, Lasa A, Abendaño N, Fernández-Quintela A, Mosqueda-Solís A, Garcia-Sobreviela MP et al.. Phenolic compounds apigenin, hesperidin and kaempferol reduce in vitro lipid accumulation in human adipocytes. *J Transl Med.* 2017; 15(1): 237. doi: 10.1186/s12967-017-1343-0.
150. Wessels Q, Pretorius E, Smith CM, Nel H. The potential of a niacinamide dominated cosmeceutical formulation on fibroblast activity and wound healing in vitro. *Int Wound J.* 2014; 11(2): 152–8.
151. 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.
152. 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.
153. 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; 10: 152887. doi: 10.1016/j.phymed.2019.152887.
154. Naz H, Tarique M, Ahamad S, 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.
155. 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.
156. Gugliandolo E, Fusco R, D'Amico R, et al. Treatment With a Flavonoid-Rich Fraction of Bergamot Juice Improved Lipopolysaccharide-Induced Periodontitis in Rats. *Front Pharmacol.* 2019; (9): 1563.
157. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017 Jul 14; (2): 17023.
158. Chen L, Wei Y, Zhao S, et al. Antitumor and immunomodulatory activities of total flavonoids extract from persimmon leaves in H₂₂ liver tumor-bearing mice. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 10523.
159. Marcouiller P, Pelletier JP, Guévremont M, et al. Leukotriene and prostaglandin synthesis pathways in osteoarthritic synovial membranes: regulating factors for interleukin 1beta synthesis. *J Rheumatol.* 2005; 32(4): 704–12.
160. 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.

161. Kumar R, Caruso IP, Ullah A, Lopes Cornelio M, Andres Fossey M, Pereira de Souza F, et al. Exploring the binding mechanism of flavonoid quercetin to phospholipase A2: fluorescence spectroscopy and computational approach. *Eur Exp Biol.* 2017; 5: 33.
162. Novo Belchor M, Hessel Gaeta H, Fabri Bittencourt Rodrigues C, et al. Evaluation of rhamnetin as an inhibitor of the pharmacological effect of secretory phospholipase A2. *Molecules.* 2017; 22(9): 1441.
163. González Mosquera DM, Hernández Ortega Y, Fernández PL, 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.
164. Hanáková Z, Hošek J, Kutil Z, 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.
165. Basu A, Masek E, Ebersole JL. Dietary Polyphenols and Periodontitis-A Mini-Review of Literature. *Molecules.* 2018; 23(7): 1786.