

# RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 30/09/2026.



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



**Jhonatan de Souza Carvalho**

Investigação do potencial terapêutico da eriocitrina na modulação da inflamação periodontal  
em modelos pré-clínicos

**Araraquara**

**2024**



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



**Jhonatan de Souza Carvalho**

Investigação do potencial terapêutico da eriocitrina na modulação da inflamação periodontal em modelos pré-clínicos

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

**Orientador:** Professor Doutor Luís Carlos Spolidório

**Araraquara**

**2024**

C331i

Carvalho, Jhonatan de Souza

Investigação do potencial terapêutico da eriocitrina na modulação da inflamação periodontal em modelos pré-clínicos / Jhonatan de Souza Carvalho. -- Araraquara, 2024

114 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Luís Carlos Spolidorio

1. Flavonoides. 2. Inflamação. 3. Anti-Inflamatórios. I. Título.

**Jhonatan de Souza Carvalho**

**Investigação do potencial terapêutico da eriocitrina na modulação da inflamação periodontal em modelos pré-clínicos**

**Comissão julgadora**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia**

Presidente e orientador Professor Doutor Luís Carlos Spolidorio

2º Examinador Professor Doutor Daniel Cláudio Gomes

3º Examinador Professora Doutora Daniela Leal Zandin-Barcelos

4º Examinador Professora Doutora Renata Pires de Assis

Araraquara, 30 de setembro de 2024.

## **DADOS CURRICULARES**

### **Jhonatan de Souza Carvalho**

- NASCIMENTO:** 17 de novembro de 1995. Três Lagoas, Mato Grosso do Sul, Brasil.
- FILIAÇÃO:** Jecivaldo Alves Dias do Nascimento Carvalho.  
Edilene de Souza Dias Carvalho.
- 2014-2017 Graduação em Odontologia. Universidade de Franca, São Paulo, Brasil.
- 2017-2017 Atualização em cirurgia oral menor. Universidade de Franca, São Paulo, Brasil.
- 2017-2017 Atualização em implantodontia. Universidade de Franca, São Paulo, Brasil.
- 2018-2020 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia – Nível Mestrado. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, São Paulo, Brasil.
- 2021-2023 Especialização em Periodontia. Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas (APCD), Araraquara, São Paulo, Brasil.
- 2022-2023 Especialização em Implantodontia. Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas (APCD), Araraquara, São Paulo, Brasil.
- 2022-2023 Pesquisador visitante. Divisão de Medicina. University College London (UCL), Londres, Inglaterra.
- 2020-2024 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia – Nível Doutorado. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, São Paulo, Brasil.

## AGRADECIMENTOS

À Deus,

Teu amor, bondade e cuidado me acompanham. Obrigado por estar presente em todos os momentos e por me surpreender com as melhores coisas ao longo desses quase cinco anos. Teus caminhos são perfeitos e tua presença é real. Tudo vem de você e tudo vai para você. A glória é sua.

Aos meus pais e irmão,

Amores, obrigado por me amarem incondicionalmente, por me apoiarem e por todo suporte durante não só durante esses anos, mas por toda minha vida. Perdoem-me pelos meus dias de estresse e ausência. Vocês sempre foram pacientes e presentes independente de tudo. Obrigado pelo suporte e orações. *Eu amo vocês.*

À minha esposa,

Minha amiga e namorada, você esteve presente durante todo esse processo e hoje como minha esposa, tenho certeza de que não teria pessoa melhor para estar ao meu lado. Obrigado por me suportar, me amar, me compreender, me desacelerar, me motivar, por cuidar de mim e por SEMPRE me apoiar. Você enfrentou grandes desafios comigo nos últimos anos e o nosso próximo capítulo será maravilhoso. *Te amo infinito.*

Ao meu orientador Professor Doutor Luís Carlos Spolidorio,

Durante a escrita dos meus agradecimentos, deixei escrever esse por último. Todas as vezes que passava pelo seu nome, eu sentia um nó na garganta e meu olho enchia de água. Meu Professor, Orientador e Amigo. Obrigado por lá em 2018, confiar em um aluno recém-formado sem nenhuma referência prévia. O senhor me apoiou e deu suporte em todas as minhas ideias e sonhos. Fiz a minha primeira viagem internacional com o senhor, morei no exterior, pois o senhor me incentivou desde o primeiro minuto que compartilhei esse objetivo. Professor Luís, obrigado por tanto. Esse é um mais um capítulo das nossas vidas que se finaliza, mas sou feliz em dizer que não é o fim. Nosso carinho, respeito e amizade é para sempre. Admiro o senhor e vou sempre levar os seus ensinamentos comigo.

Às minhas avós,

Por me amarem e cuidarem de mim independente da distância e das limitações de tempo.

Obrigado pelas orações e por tanto carinho. *Amo muito vocês.*

Ao meu sogro, sogra e cunhado,

Obrigado por compartilharem essa jornada comigo, me dar suporte e serem compreensivos nos meus dias de ausência. Obrigado por sempre me cercarem de amor e cuidado. *Amo vocês.*

À Professora Denise Spolidorio,

Obrigado por todo carinho e suporte que sempre teve comigo. Admiro sua ética, competência, seriedade e praticidade. De Professora á uma amiga muito querida. Vou sentir muita saudade em compartilhar dias com você.

Aos meus amigos do laboratório José Zuanon e Juliana Pirola,

Zézinho e Ju, vocês fizeram meus dias leves e cheios de grandes emoções. Obrigado por demonstrarem tanto carinho e cuidado por mim. Obrigado pelos conselhos e por todo apoio. Sentirei muita saudade do nosso laboratório/família! Desejo tudo de melhor, vocês merecem!

Aos meus amigos do grupo de pesquisa,

Maria Julia Mancini, Leticia Durão, Álvaro Pelegrin, Flávia Bione, Patrícia Maquera, Vinícius Paiva, Vinicius Lucca e Luana Basseti obrigado por me ensinarem tanto e por compartilharem tantos momentos juntos. Desejo todo sucesso a vocês.

Ao Professor Derek Gilroy,

Obrigado por me aceitar em seu laboratório, pelos ensinamentos e por toda confiança depositada durante meu período de estágio e após o fim dele. Você é uma grande referência para mim D.

Ao meu amigo Dr. George Collins,

Nunca imaginei que te chamaria de amigo e aqui estamos, obrigado por toda paciência, cuidado, conselhos, ensinamentos e *Pints* compartilhadas.

Ao Prof. Dr. Jonh Manthey,

Por fornecer os flavonoides para este estudo. Obrigado pela confiança. Este é só mais um dos frutos que iremos colher.

Aos docentes do departamento de Periodontia,

Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Profa. Dra. Rosemary 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.

A todos meus colegas e funcionários do programa de Pós-Graduação em Odontologia por todos os momentos compartilhados. Agradeço em especial aos meus amigos Ingra Nicchio, Gabriel Carvalho, Nicolas Nicchio pelo apoio, conselhos, companhia e amizade. Vocês estarão sempre no meu coração.

À FOAr – UNESP, pelo apoio institucional.

À CAPES:

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

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos nº 2020/11672-3; 2020/16682-7 e 2022/07485-9) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. \*

---

\*Newton, Isaac, citado em Hawking, Stephen. O Universo numa Casca de Noz. São Paulo: Mandarim, 2005

Carvalho JS. Investigação do potencial terapêutico da eriocitrina na modulação da inflamação periodontal em modelos pré-clínicos [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

## RESUMO

A nutrição é reconhecida como um componente essencial na prevenção de diversas doenças. Em especial, flavonoides cítricos, como a eriocitrina (ERIOC), mostram potencial no controle de inflamações orais e sistêmicas, incluindo doenças periodontais. Este estudo investigou os efeitos da ERIOC sobre fatores pró-inflamatórios, anti-inflamatórios e pró-resolutivos em modelos *in vitro* e *in vivo*. Para isso, macrófagos da linhagem RAW 264.7 e macrófagos derivados de monócitos humanos foram estimulados com LPS+IFN- $\gamma$  e tratados com ERIOC por 24 e 48 horas, respectivamente. Avaliou-se a expressão dos genes característicos dos fenótipos M1 (NOS2/iNOS) e M2 (MMR e ARG-1) por qPCR. Também foram analisadas as expressões dos marcadores de superfície para os fenótipos M1 (CD80 e CCR7) e M2 (CD163 e CD206) por citometria de fluxo, além das vias de sinalização intracelular STAT1, STAT3, p65 NF- $\kappa$ B e p38 MAPK. Em neutrófilos humanos, avaliou-se o efeito de ERIOC sobre marcadores relacionados ao fenótipo, atividade fagocítica e apoptose também utilizando citometria de fluxo. Adicionalmente, foi investigada a capacidade da ERIOC e seu metabólito eriodictiol (ERIOD) na captura dos radicais livres ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e Ânion Radical Superóxido (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>). *In vivo*, camundongos foram tratados com ERIOC nas doses de 25 e 50 mg/kg de peso corporal/dia por 60 dias. No 30º dia, a doença periodontal foi induzida por injeção bilateral de LPS de *Escherichia coli* nos tecidos gengivais próximos aos primeiros molares superiores. Após a eutanásia, foram coletadas amostras para análise de citocinas pró e anti-inflamatórias por imunensaio multiplex, quantificação de leucotrieno B4 por ELISA, análise histológica e avaliação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) no tecido gengival e mensuração da peroxidação lipídica no tecido gengival e no plasma. O tratamento com ERIOC reduziu a expressão gênica de NOS2 e a intensidade média de fluorescência (MFI) de CD80 e da via NF- $\kappa$ B em comparação ao grupo estimulado apenas com LPS+IFN- $\gamma$  (M1). Sobre neutrófilos humanos, ERIOC aumentou a atividade fagocítica e a porcentagem de células apoptóticas, além de elevar a expressão de CD33, uma proteína transmembrana que previne autorreatividade inadequada durante respostas inflamatórias. Tanto ERIOC quanto ERIOD apresentaram alta capacidade de captura dos radicais ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>•</sup> e O<sub>2</sub><sup>-•</sup>. No estudo *in vivo*, o tratamento com ERIOC reduziu significativamente o infiltrado de células inflamatórias, a atividade de EPO, os níveis de leucotrieno B4 e a expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido gengival dos animais submetidos as injeções de LPS. Além disso, observou-se redução do estresse oxidativo, medido pela peroxidação lipídica no tecido gengival e no plasma. O tratamento também aumentou a atividade das enzimas antioxidantes endógenas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) no tecido gengival. Esses resultados mostraram que o tratamento com ERIOC foi eficaz em reduzir a expressão de marcadores pró-inflamatórios em macrófagos e melhorou a atividade dos neutrófilos *ex vivo*. Em complemento, reduziu o infiltrado de células inflamatórias *in vivo* e mostrou eficácia na neutralização de radicais sugerindo potencial proteção sobre o estresse oxidativo. A redução da peroxidação lipídica no plasma e no tecido gengival dos animais com periodontite experimental e aumento das enzimas SOD, CAT e GPx corroboram com esses achados. Essas descobertas destacam a eriocitrina como um potente antioxidante e agente anti-inflamatório, capaz de reduzir marcadores pró-inflamatórios e melhorar o perfil oxidativo. Esses efeitos tornam a eriocitrina uma candidata promissora para a prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e inflamação crônica.

**Palavras-chave:** Flavonoides. Inflamação. Anti-Inflamatórios.

Carvalho JS. Investigating the therapeutic potential of eriocitrin in the modulation of periodontal inflammation in preclinical models [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

## ABSTRACT

Nutrition is recognised as an essential component in the prevention of various diseases. Citrus flavonoids, especially eriocitrin (ERIOC), can potentially control oral and systemic inflammation, including periodontal disease. This study investigated the effects of ERIOC on pro-inflammatory, anti-inflammatory, and pro-resolutive factors in both in vitro and in vivo models. RAW 264.7 macrophages and human monocyte-derived macrophages were stimulated with LPS+IFN- $\gamma$  and treated with ERIOC for 24 and 48 hours, respectively. The expression of genes characteristic of M1 (NOS2/iNOS) and M2 (MMR and ARG-1) phenotypes was evaluated by qPCR. Surface markers for M1 (CD80 and CCR7) and M2 (CD163 and CD206) phenotypes were also analysed by flow cytometry, as well as intracellular signalling pathways STAT1, STAT3, p65 NF-kB, and p38 MAPK. In human neutrophils, the effect of ERIOC on phenotype-related markers, phagocytic activity, and apoptosis was also evaluated using flow cytometry. Additionally, ERIOC and its metabolite eriodictyol (ERIOD) were investigated for their ability to scavenge ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, and superoxide radical anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) free radicals. In vivo, mice were treated with ERIOC at 25 and 50 mg/kg body weight/day doses for 60 days. On day 30, periodontal disease was induced by bilateral injection of *Escherichia coli* LPS into the gingival tissues near the upper first molars. After euthanasia, samples were collected for analysis of pro- and anti-inflammatory cytokines by multiplex immunoassay, quantification of leukotriene B4 by ELISA, histological analysis and evaluation of eosinophil peroxidase (EPO) activity in gingival tissue, and measurement of lipid peroxidation in gingival tissue and plasma. ERIOC treatment reduced NOS2 gene expression and the mean fluorescence intensity (MFI) of CD80 and the NF-kB pathway compared to the group stimulated with LPS+IFN- $\gamma$  alone (M1). In human neutrophils, ERIOC increased phagocytic activity, the percentage of apoptotic cells, and the expression of CD33, a transmembrane protein that prevents inappropriate autoreactivity during inflammatory responses. Both ERIOC and ERIOD demonstrated high scavenging capacity for ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, and O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radicals. In the in vivo study, ERIOC treatment significantly reduced inflammatory cell infiltration, EPO activity, leukotriene B4 levels, and pro-inflammatory cytokine expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the gingival tissue of animals subjected to LPS injections. Additionally, a reduction in oxidative stress was observed, measured by lipid peroxidation in gingival tissue and plasma. Treatment also increased the activity of endogenous antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) in gingival tissue. These results demonstrated that ERIOC treatment was effective in reducing pro-inflammatory marker expression in macrophages and improved neutrophil activity ex vivo. In addition, it reduced inflammatory cell infiltration in vivo and showed efficacy in radical scavenging, suggesting potential protection against oxidative stress. The reduction in lipid peroxidation in plasma and gingival tissue of animals with experimental periodontitis and increased SOD, CAT, and GPx enzymes support these findings. These discoveries highlight eriocitrin as a potent antioxidant and anti-inflammatory agent capable of reducing pro-inflammatory markers and improving the oxidative profile. These effects make eriocitrin a promising candidate for preventing diseases related to oxidative stress and chronic inflammation.

**Keywords:** Flavonoids. Inflammation. Anti-Inflammatory Agents.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Separação de monócitos por meio de seleção negativa utilizando RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail.....	40
<b>Figura 2</b> - Monócitos isolados do sangue utilizando RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail e analisados por citometria de fluxo.....	41
<b>Figura 3</b> - Macrófagos derivados de monócitos humanos após 7 dias de estímulo com 20ng/ml de M-CSF e analisados por citometria de fluxo.....	42
<b>Figura 4</b> - Sequência técnica para isolamento de neutrófilos por seleção negativa utilizando EasySep™ Direct Human Neutrophil Isolation Cocktail.....	43
<b>Figura 5</b> - Estabilização, anestesia inalatória e injeções bilaterais de solução de contendo 10mg/ml de LPS de <i>E. coli</i> .....	57
<b>Figura 6</b> - Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7, macrófagos derivados de monócitos humanos e neutrófilos humanos utilizando o ensaio MTT.....	62
<b>Figura 7</b> - Efeito da eriocitrina na expressão genética de marcadores associados aos fenótipos M1 e M2 em resposta ao tratamento com LPS+IFN- $\gamma$ ou IL-4.....	63
<b>Figura 8</b> - Macrófagos derivados de monócitos de 3 voluntários saudáveis incubados com LPS + IFN- $\gamma$ +ERIOC ex vivo por 48 horas.....	65
<b>Figura 9</b> - Macrófagos derivados de monócitos de 3 voluntários saudáveis incubados com LPS+IFN- $\gamma$ +ERIOC ex vivo por 48 horas e marcados intracelularmente para avaliação das vias de sinalização p65 NF-kB, STAT1, p38 MAPK e STAT3.....	67
<b>Figura 10</b> - Neutrófilos isolados de 3 voluntários saudáveis foram incubados com eriocitrina ex vivo por 6 horas e amostrados em 5 pontos temporais.....	68
<b>Figura 11</b> - Heatmap da expressão escalada dos marcadores para todos os participantes e todas as condições e Boxplot mostra as mudanças na expressão de marcadores em nível populacional que ocorrem nos neutrófilos humanos durante a incubação ex vivo, separados por marcador e coloridos por condição.....	69
<b>Figura 12</b> - Gráfico de área delta estimando o número natural de <i>clusters</i> nestes dados, gráfico UMAP colorido por 15 <i>clusters</i> gerados automaticamente, gráficos UMAP coloridos por 15 <i>clusters</i> gerados automaticamente separados por condição, abundância de cada cluster em cada condição e heatmap da expressão escalada dos marcadores para os quinze <i>clusters</i> de neutrófilos.....	70
<b>Figura 13</b> - Sete clusters de neutrófilos agrupados manualmente a partir de 15 clusters gerados automaticamente, separados por condição.....	73
<b>Figura 14</b> - Neutrófilos isolados de 3 voluntários saudáveis e incubados com eriocitrina ex vivo por 6 horas para avaliação da apoptose celular.....	76
<b>Figura 15</b> - Fagocitose de biopartículas de <i>E.coli</i> -Phrodo Green por neutrófilos incubados com eriocitrina.....	78
<b>Figura 16</b> - Capacidade de captura do ABTS <sup>•+</sup> pelo trolox e pelos flavonoides cítricos eriocitrina e eriodictiol.....	79
<b>Figura 17</b> - Porcentagem de inibição (captura) do DPPH• pelo trolox e pelos flavonoides cítricos eriocitrina e eriodictiol.....	80
<b>Figura 18</b> - Porcentagem de inibição (captura) do ânion radical superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) pelo trolox e pelos flavonoides cítricos eriocitrina e eriodictiol.....	81
<b>Figura 19</b> - Peso dos animais durante todo período experimental.....	82
<b>Figura 20</b> - Cortes histológicos dos estômagos dos animais suplementados com eriocitrina.....	83
<b>Figura 21</b> - Aspectos microscópicos do tecido gengival (H&E).....	85
<b>Figura 22</b> - Atividade da EPO no tecido gengival dos camundongos de todos os grupos experimentais.....	85

<b>Figura 23</b> - Fold-change da expressão de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4 e IL-5 no tecido gengival dos camundongos de todos os grupos experimentais .....	86
<b>Figura 24</b> - Fold-change da expressão leucotrieno B4 no tecido gengival dos camundongos de todos os grupos experimentais.....	87
<b>Figura 25</b> - Avaliação da peroxidação lipídica no plasma e no tecido gengival dos camundongos suplementados com eriocitrina e submetidos a periodontite experimental.....	88
<b>Figura 26</b> - Avaliação das concentrações das enzimas antioxidantes endógenas SOD, CAT e GPx no tecido gengival dos camundongos suplementados com eriocitrina e submetidos a periodontite experimental .....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido araquidônico

ANOVA: Análise de Variância (do inglês *Analysis of Variance*)

ATP: Adenosina 5'-trifosfato (do inglês *Adenosine Triphosphate*)

BCA: Método do Ácido Bicinchonínico (do inglês *Bicinchoninic Acid Method*)

cAMP: Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês *Cyclic Adenosine Monophosphate*)

CLR: Receptores do Tipo Lectina do Tipo C (do inglês *C-type Lectin Receptors*)

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

COX: Ciclo-oxigenase (do inglês *Cyclooxygenase*)

DAMP: Padrões Moleculares Associados a Danos Endógenos (do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*)

DMEM: Meio Modificado de Eagle de Dulbecco (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DMSO: Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de Dimetilo (do inglês *Dimethyl Sulfoxide*)

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (do inglês *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

EPO: Peroxidase de Eosinófilo (do inglês *Eosinophil Peroxidase*)

G-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos (do inglês *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*)

GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (do inglês *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

H&E: Hematoxilina e Eosina (do inglês *Hematoxylin and Eosin*)

HCl: Ácido Clorídrico (do inglês *Hydrochloric Acid*)

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*)

IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$  (do inglês *Interferon-Gamma*)

IL: Interleucina

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível (do inglês *Inducible Nitric Oxide Synthase*)

I $\kappa$ B: Inibidor do Fator Nuclear kappa B (do inglês *Inhibitor of Nuclear Factor kappa B*)

LC-MS: Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

LDL-ox: LDL Oxidada (do inglês *Oxidized Low-Density Lipoprotein*)

LOX: Lipoxina

LPS: Lipopolissacarídeo

LT: Leucotrieno

MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MCP-1: Proteína Quimioatratante de Monócitos 1 (do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein-1*)

MDA: Malondialdeído (do inglês *Malondialdehyde*)

MFI: Média de Intensidade de Fluorescência (do inglês *Mean Fluorescence Intensity*)

MPO: Mieloperoxidase (do inglês *Myeloperoxidase*)

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (do inglês *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*)

NET: Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*)

NF- $\kappa$ B: Fator Nuclear kappa B (do inglês *Nuclear Factor kappa B*)

NFATc1: Fator Nuclear de Células T Ativadas (do inglês *Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmic 1*)

NOD: Proteínas com Domínio de Ligação a Nucleotídeos e Oligomerização (do inglês *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain proteins*)

Nrf2: Fator Nuclear Eritroide 2-relacionado ao Fator 2 (do inglês *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*)

OH: Radical Hidroxila (do inglês *Hydroxyl Radical*)

PAMP: Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PBS: Tampão Salina-Fosfato (do inglês *Phosphate-Buffered Saline*)

PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E2

PMN: Leucócito Polimorfonuclear

PSR: Fosfatidilserina (do inglês *Phosphatidylserine*)

PUFAs: Ácidos Graxos Poli-insaturados (do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*)

RLR: Receptores Similares ao Gene-I Induzido por Ácido Retinóico (do inglês *Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors*)

RRP: Receptores de Reconhecimento Padrão

SDH: Enzima Desidrogenase Succínica (do inglês *Succinate Dehydrogenase*)

SFB: Soro Fetal Bovino

SOD: Enzima Superóxido Dismutase (do inglês *Superoxide Dismutase*)

STAT: Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição (do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription*)

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

TIM-4: Domínio de Mucina-4 (do inglês *T-cell Immunoglobulin and Mucin Domain-4*)

TLR: Receptor do Tipo Toll (do inglês *Toll-Like Receptor*)

TNF: Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*)

UVKEc: *Escherichia coli* Inativada por Luz Ultravioleta (do inglês Ultraviolet-Killed *E. coli*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>19</b>
2.1 Objetivos Específicos In Vitro .....	19
2.2 Objetivos Específicos In Vivo .....	19
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
3.1 Processo Inflamatório.....	21
3.2 Resolução da Inflamação Como uma Nova Perspectiva de Abordagem.....	24
3.3 Fenótipo de Macrófagos Determinam sua Função na Promoção ou Resolução da Inflamação .....	25
3.4 Atividade Bioativa dos Flavonoides Sobre a Inflamação.....	26
3.5 Propriedades Terapêuticas da Eriocitrina e seu Metabólito Eriodictiol sobre Doenças Inflamatórias .....	27
3.6 Efeito dos Flavonoides Sobre o Processo Pró-Resolutivo da Inflamação.....	28
3.7 Atividade dos Flavonoides sobre a Polarização de Macrófagos na Inflamação .....	29
3.8 O Ciclo de Vida dos Neutrófilos .....	30
3.9 Efeitos da Suplementação de Flavonoides em Experimentos In Vivo Considerando como Componentes da Dieta.....	33
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 Estudo In Vitro .....	38
4.1.1 Flavonoides cítricos .....	38
4.1.2 Cultura celular de macrófagos RAW 264.7 .....	39
4.1.3 Cultura de macrófagos derivados de monócitos humanos .....	39
4.1.4 Isolamento e cultura de neutrófilos.....	42
4.1.5 Viabilidade celular e determinação das concentrações de trabalho da eriocitrina.	43
4.1.6 Preparo dos controles de referência ( <i>single stain control</i> ) para os ensaios realizados utilizando citometria de fluxo .....	45
4.1.7 Extração do RNA, transcriptase reversa e qPCR de macrófagos de linhagem RAW 264.7 polarizados para fenótipo M1 e tratados com eriocitrina .....	45
4.1.8 Efeitos da eriocitrina sobre macrófagos derivados de monócitos humanos polarizados para fenótipo M1 .....	46
4.1.9 Efeitos da eriocitrina sobre a marcadores fenotípicos, amadurecimento e apoptose de neutrófilos .....	48
4.1.10 Avaliação da atividade fagocítica de neutrófilos tratados com eriocitrina .....	49
4.1.11 Análise de multidimensional dos dados obtidos através da citometria de fluxo....	51
4.1.12 Capacidade de captura da eriocitrina e seu metabólito eriodictiol sobre o radical ABTS <sup>•+</sup> .....	53
4.1.13 Capacidade de captura da eriocitrina e seu metabólito eriodictiol sobre o radical DPPH <sup>•</sup> .....	54
4.1.14 Capacidade de captura da eriocitrina e seu metabólito eriodictiol sobre o radical Ânion Radical Superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) .....	54
4.2 Estudo In Vivo .....	56
4.2.1 Eriocitrina .....	56
4.2.2 Tratamento dos camundongos .....	56
4.2.3 Indução de doença periodontal .....	57
4.2.4 Eutanásia e coleta das amostras .....	57

4.2.5 Preparo das amostras gengivais e sangue para análises bioquímicas.....	58
4.2.6 Análise histológica descritiva do tecido gengival.....	58
4.2.7 Avaliação da atividade antioxidante endógena em tecidos gengivais.....	59
4.2.8 Avaliação da quantidade de leucotrieno B4 no tecido gengival.....	59
4.2.9 Avaliação da peroxidação lipídica do tecido gengival e no plasma.....	59
4.3 Análise Estatística.....	60
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
5.1 Estudo In Vitro.....	61
5.1.1 Ensaio MTT para avaliação da viabilidade celular.....	61
5.1.2 Efeitos da eriocitrina sobre a expressão dos genes NOS2, MMR e ARG-1 em macrófagos RAW 264.7 polarizados para o fenótipo M1.....	62
5.1.3 Efeitos da eriocitrina em macrófagos derivados de monócitos humanos polarizados para o fenótipo M1.....	63
5.1.4 Efeito da eriocitrina sobre marcadores fenotípicos, amadurecimento e apoptose de neutrófilos.....	67
5.1.5 Resumindo as descobertas do UMAP no ensaio de apoptose com a análise convencional.....	75
5.1.6 Efeitos da eriocitrina sobre a atividade fagocítica de neutrófilos.....	77
5.1.7 Capacidade de captura da eriocitrina e seu metabólito eriodictiol sobre o radical ABTS <sup>•+</sup> .....	78
5.1.8 Capacidade de captura da eriocitrina e seu metabólito eriodictiol sobre o radical DPPH <sup>•</sup> .....	79
5.1.9 Capacidade de captura da eriocitrina e seu metabólito eriodictiol sobre o radical ânion radical superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ).....	80
5.2 Estudo In Vivo.....	82
5.2.1 Comportamento e padrão alimentar dos camundongos.....	82
5.2.2 Aspectos microscópicos do estômago.....	82
5.2.3 Aspectos microscópicos do fígado.....	83
5.2.4 Aspectos microscópicos do tecido gengival.....	83
5.2.5 Atividade de EPO no tecido gengival.....	85
5.2.6 Expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias por análise multiplex.....	86
5.2.7 Quantificação de leucotrieno B4 no tecido gengival.....	87
5.2.8 Peroxidação lipídica no plasma e no tecido gengival.....	87
5.2.9 Atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) no tecido gengival.....	88
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>114</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que milhões de pacientes são acometidos por uma infinidade de doenças que podem afetar a boca e se manifestam diante de um grande espectro etiológico e fisiopatológico. Por exemplo, cerca de 2,4 bilhões de pessoas são acometidos por cáries em dentes permanente e 532 milhões de crianças também são afetadas por cáries e dentes decíduos<sup>1</sup>. Além disso, entre os adultos nos EUA, cerca de 40% das pessoas com mais de 30 anos e aproximadamente 60% das pessoas com mais de 65 anos são diagnosticadas com periodontite, uma doença inflamatória crônica caracterizada por disbiose, (mudança no biofilme subgengival em direção à microbiota gram-negativa) levando à destruição das estruturas de suporte dos dentes de maneira mediada pelo hospedeiro<sup>2</sup>. Os cuidados com a saúde bucal podem ser bastante caros. Em países de alta renda, aproximadamente 5% do orçamento total de saúde é destinado a esses cuidados. Em muitos outros países, no entanto, os custos associados a tratamentos odontológicos podem ultrapassar a capacidade financeira da população, tornando o acesso a esses cuidados um desafio significativo<sup>1</sup>. Nesse complexo contexto, discute-se e está cada vez mais aceito, que a nutrição desempenha um papel essencial tanto na saúde bucal quanto na promoção da saúde sistêmica. Uma alimentação adequada, que fornece vitaminas, minerais, fibras, carboidratos, proteínas, gorduras e outros micronutrientes, é fundamental para manter as células e tecidos saudáveis e contribuir para a saúde bucal e consequentemente sistêmica. De fato, nutrição inadequada pode afetar a saúde bucal, incluindo não somente cáries dentárias e doenças periodontais, mas outras importantes doenças como os tumores benignos e malignos da mucosa oral e doenças infecciosas<sup>3</sup>.

A modificação dos padrões alimentares é sugerida como uma maneira de reduzir a carga global de doenças, que, por definição, quantifica a magnitude da perda de saúde causada por doenças, lesões e fatores de risco, considerando variáveis como idade, sexo e localização geográfica. Paralelamente, a literatura especializada destaca o avanço dos medicamentos biológicos, desenvolvidos a partir de plantas ou por biossíntese em organismos vivos, diferenciando-se dos medicamentos sintéticos que são produzidos por meio de reações químicas. De fato, observa-se que a busca por novas abordagens terapêuticas para o tratamento de inúmeras doenças, como por exemplo, aquelas relacionadas aos processos inflamatórios<sup>2,3</sup>. Nesse contexto, os flavonoides se destacam como importantes polifenóis, que são moléculas caracterizados por possuir uma ou mais hidroxilas ligadas a anéis aromáticos<sup>4</sup>. Eles são notáveis por suas potentes atividades bioativas, incluindo o controle do estresse oxidativo por meio da

captura de radicais livres e da inibição da peroxidação lipídica<sup>13</sup>, além de sua capacidade de modular o processo inflamatório presente em diversas doenças. Esses compostos estão amplamente distribuídos na natureza e podem ser encontrados em frutas, legumes, nozes, chocolates, vinhos, chás e café<sup>5,6</sup>.

A eriocitrina (eriodictyol 7-O- $\beta$ -D-rutinoside) e seu metabólito eriodictiol (3',4',5,7-tetrahydroxyflavanone) são flavonoides cítricos encontrados principalmente nas cascas de limões e limas<sup>7</sup>. Dentre suas diversas atividades biológicas, destaca-se por ser um potente composto na supressão do estresse oxidativo em doenças crônicas tais como diabetes mellitus e periodontite<sup>5,8</sup>. Estudos anteriores confirmaram através de análises de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) e espectrometria de massas por cromatografia líquida (LC-MS) que metabólitos da eriocitrina tais como eriodictiol, homo-eriodictiol e hesperitina foram encontrados nos tecidos e no plasma após 4 horas da administração<sup>8-10</sup>. Ainda, Shimoi et al<sup>11</sup> sugeriram que a deglicosilação poderia ocorrer localmente durante um processo inflamatório potencializando sua ação. Com base nessas informações, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da eriocitrina sobre mecanismos celulares e moleculares pró-inflamatórios, anti-inflamatórios e pró-resolutivos.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a eriocitrina e seu metabólito eriodictiol apresentam efeitos inibitórios sobre o metabolismo oxidativo e o processo inflamatório, tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro*. A eriocitrina mostrou reduzir os marcadores pró-inflamatórios em macrófagos derivados de monócitos humanos e melhorar significativamente a atividade dos neutrófilos *ex vivo*. Além disso, esses flavonoides demonstraram eficácia na neutralização direta de radicais não biológicos, como ABTS• e DPPH•, e do radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), sugerindo uma melhoria no perfil oxidativo. Esses resultados foram corroborados pela redução de TBARS tanto no plasma quanto no tecido gengival dos animais submetidos a inflamação periodontal experimental. Embora abordados separadamente, é importante ressaltar que esses eventos ocorrem de forma sinérgica e coordenada. A inflamação é um processo complexo e regulado, cuja compreensão é essencial. Portanto, estudos *in vivo* que avaliem as alterações no perfil celular durante esses processos são necessários para confirmar os efeitos pró-resolutivos da eriocitrina. Além disso, os resultados indicam que a eriocitrina e o eriodictiol desempenham um papel crucial no controle do estresse oxidativo. Eles não apenas capturam diretamente radicais livres, mas também modulam as defesas celulares endógenas. Essas descobertas destacam a importância dos flavonoides como antioxidantes e seu potencial impacto na promoção da saúde celular e na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

**REFERÊNCIAS\***

1. Homayouni Rad A, Pourjafar H, Mirzakhani E. A comprehensive review of the application of probiotics and postbiotics in oral health. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023; 13: 1120995.
2. Aizenbud I, Wilensky A, Almozni G. Periodontal Disease and Its Association with Metabolic Syndrome-A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(16): 13011.
3. Gondivkar SM, Gadbail AR, Gondivkar RS, Sarode SC, Sarode GS, Patil S, et al. Nutrition and oral health. *Dis Mon.* 2019; 65(6): 147-54.
4. 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.
5. Carvalho JS, Ramadan D, de Paiva Goncalves V, Maquera-Huacho PM, Assis RP, Lima TFO, et al. Impact of citrus flavonoid supplementation on inflammation in lipopolysaccharide-induced periodontal disease in mice. *Food Funct.* 2021; 12(11): 5007-17.
6. Caro-Ordieres T, Marin-Royo G, Opazo-Rios L, Jimenez-Castilla L, Moreno JA, Gomez-Guerrero C, et al. The Coming Age of Flavonoids in the Treatment of Diabetic Complications. *J Clin Med.* 2020; 9(2): 346.
7. Manthey JA, Ferreira PS, Cesar TB. Influences of Solubility and Vehicle Carriers on Eriodictyol Pharmacokinetics in Rats. *J Agric Food Chem.* 2022; 70(15): 4667-76.
8. Yao L, Liu W, Bashir M, Nisar MF, Wan CC. Eriocitrin: A review of pharmacological effects. *Biomed Pharmacother.* 2022; 154: 113563.
9. 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.
10. Ferreira PS, Manthey JA, Nery MS, Cesar TB. Pharmacokinetics and Biodistribution of Eriocitrin in Rats. *J Agric Food Chem.* 2021; 69(6): 1796-805.
11. Shimoi K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, Nakayama T, et al. Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29(12): 1521-4.
12. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med.* 2000; 192(8): 1197-204.
13. Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov.* 2016; 15(8): 551-67.
14. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signalling. *J Lipid Res.* 2009; 50 Suppl(Suppl): S237-42.
15. Gilroy DW, Bishop-Bailey D. Lipid mediators in immune regulation and resolution. *Br J Pharmacol.* 2019; 176(8): 1009-23.

\* 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>

16. Pagels WR, Sachs RJ, Marnett LJ, Dewitt DL, Day JS, Smith WL. Immunochemical evidence for the involvement of prostaglandin H synthase in hydroperoxide-dependent oxidations by ram seminal vesicle microsomes. *J Biol Chem.* 1983; 258(10): 6517
17. Hamberg M, Samuelsson B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973; 70(3): 899-903
18. Tanaka Y, Ward SL, Smith WL. Immunochemical and kinetic evidence for two different prostaglandin H-prostaglandin E isomerases in sheep vesicular gland microsomes. *J Biol Chem.* 1987; 262(3): 1374-81.
19. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature.* 2007; 447(7146): 869-74.
20. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 2014; 510(7503): 92-101.
21. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. New pro-resolving n-3 mediators bridge resolution of infectious inflammation to tissue regeneration. *Mol Aspects Med.* 2018; 64: 1-17.
22. Hirano T. The biology of interleukin-6. *Chem Immunol.* 1992; 51: 153-80.
23. Hirano T. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992;62(1 Pt 2): S60-S65.
24. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity.* 2001; 14(6): 705-14.
25. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 2003; 24(1): 25-9.
26. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26(4): 239-57.
27. Wang J, Hossain M, Thanabalasuriar A, Gunzer M, Meininger C, Kubes P. Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science.* 2017; 358(6359): 111-6.
28. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest.* 1989; 83(3): 865-75.
29. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 1997; 61(4): 375-80.
30. Hampton HR, Bailey J, Tomura M, Brink R, Chtanova T. Microbe-dependent lymphatic migration of neutrophils modulates lymphocyte proliferation in lymph nodes. *Nat Commun.* 2015; 6: 7139.
31. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998; 101(4): 890-8.
32. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995; 182(5): 1597-601.

33. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology Today*. 1993; 14(3): 131-6.
34. Santiago C, Ballesteros A, Martinez-Munoz L, Mellado M, Kaplan GG, Freeman GJ, et al. Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-Ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds. *Immunity*. 2007; 27(6): 941-51.
35. Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*. 2007; 450(7168): 435-9.
36. Newson J, Stables M, Karra E, Arce-Vargas F, Quezada S, Motwani M, et al. Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood*. 2014; 124(11): 1748-64.
37. Feehan KT, Gilroy DW. Is Resolution the End of Inflammation? *Trends Mol Med*. 2019; 25(3): 198-214.
38. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of Inflammation. *Methods Mol Biol*. 2018; 1803: 57-79.
39. Eltay EG, Van Dyke T. Resolution of inflammation in oral diseases. *Pharmacol Ther*. 2023; 247: 108453.
40. Panigrahy D, Gilligan MM, Serhan CN, Kashfi K. Resolution of inflammation: An organizing principle in biology and medicine. *Pharmacol Ther*. 2021; 227: 107879.
41. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*. 2004; 9: 283-9.
42. Van Dyke TE, Sima C. Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: Is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve? *Periodontol* 2000. 2020; 82(1): 205-13.
43. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res*. 2011; 90(2): 143-53.
44. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2014; 64(1): 57-80.
45. Germolec DR, Frawley RP, Evans E. Markers of inflammation. *Methods Mol Biol*. 2010; 598: 53-73.
46. Burn T, Alvarez JI. Reverse transendothelial cell migration in inflammation: to help or to hinder? *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(10): 1871-81.
47. Brown JR, Goldblatt D, Buddle J, Morton L, Thrasher AJ. Diminished production of anti-inflammatory mediators during neutrophil apoptosis and macrophage phagocytosis in chronic granulomatous disease (CGD). *J Leukoc Biol*. 2003; 73(5): 591-9.
48. Shao WH, Cohen PL. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2011; 13(1): 202.
49. Bystrom J, Evans I, Newson J, Stables M, Toor I, van Rooijen N, et al. Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood*. 2008; 112(10): 4117-27.
50. Bystrom J, Wynn TA, Domachowske JB, Rosenberg HF. Gene microarray analysis reveals interleukin-5-dependent transcriptional targets in mouse bone marrow. *Blood*. 2004; 103(3): 868-77.

51. Fadok VA, Henson PM. Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr Biol.* 1998; 8(19): R693-5.
52. Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor ( $\alpha$  v  $\beta$  3). *J Immunol.* 1998; 161(11): 6250-6257.
53. Chiang N, Fredman G, Backhed F, Oh SF, Vickery T, Schmidt BA, et al. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature.* 2012; 484(7395): 524-8.
54. Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem.* 2009;284(50):34590-34599.
55. Schmidt MF. Drug target miRNAs: chances and challenges. *Trends Biotechnol.* 2014; 32(11): 578-85.
56. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol.* 2010; 11(2): 141-7.
57. Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J.* 2012; 26(4): 1755-65.
58. Gilroy DW, Colville-Nash PR, McMaster S, Sawatzky DA, Willoughby DA, Lawrence T. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy( $\Delta$ )12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *FASEB J.* 2003; 17(15): 2269-71.
59. Schett G, Neurath MF. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 3261.
60. Chusid MJ. Eosinophils: Friends or Foes? *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018; 6(5): 1439-44.
61. Chen Z, Andreev D, Oeser K, Krljanac B, Hueber A, Kleyer A, et al. Th2 and eosinophil responses suppress inflammatory arthritis. *Nat Commun.* 2016; 7: 11596.
62. Chen Z, Bozec A, Ramming A, Schett G. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology.* 2019; 15(1): 9-17.
63. Tani Y, Isobe Y, Imoto Y, Segi-Nishida E, Sugimoto Y, Arai H, et al. Eosinophils control the resolution of inflammation and draining lymph node hypertrophy through the proresolving mediators and CXCL13 pathway in mice. *FASEB J.* 2014; 28(9): 4036-43.
64. Saqib U, Sarkar S, Suk K, Mohammad O, Baig MS, Savai R. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. *Oncotarget.* 2018; 9(25): 17937-50.
65. Gao S, Zhou J, Liu N, Wang L, Gao Q, Wu Y, et al. Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 85: 131-9.
66. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(11): 750-61.

67. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010; 32(5): 593-604.
68. Shieh YS, Hung YJ, Hsieh CB, Chen JS, Chou KC, Liu SY. Tumor-associated macrophage correlated with angiogenesis and progression of mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16(3): 751-60.
69. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol*. 2004; 122(5): 794-801.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. Ahmad S, Alam K, Hossain MM, Fatima M, Firdaus F, Zafeer MF, 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. Trentin MS, Verardi G, De CFM, 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.
78. Manthey JA. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation*. 2000; 7(6 Pt 2): S29-34.
79. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013: 162750.
80. Bitto A, Minutoli L, David A, Irrera N, Rinaldi M, Venuti FS, et al. Flavocoxid, a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX of natural origin, attenuates the inflammatory response and protects mice from sepsis. *Crit Care*. 2012; 16(1): R32.
81. Feng X, Weng D, Zhou F, Owen YD, Qin H, Zhao J, et al. Activation of PPARgamma by a Natural Flavonoid Modulator, Apigenin Ameliorates Obesity-Related Inflammation Via Regulation of Macrophage Polarization. *EBioMedicine*. 2016; 9: 61-76.
82. Luo YL, Zhang CC, Li PB, Nie YC, Wu H, Shen JG, et al. Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a guinea pig model of

- chronic bronchitis induced by cigarette smoke. *Int Immunopharmacol.* 2012; 13(3): 301-7.
83. Caristi C, Bellocco E, Panzera V, Toscano G, Vadala 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.
  84. Miyake Y, Yamamoto K, Osawa T. Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7-rutinoside) from lemon fruit (*Citrus limon* Burm. f.) and its antioxidative activity. *Food Science and Technology International, Tokyo.* 1997; 3(1): 84-9.
  85. 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. 2006; 71(9): S633-S7.
  86. 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.
  87. Assini JM, Mulvihill EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2013; 24(1): 34-40.
  88. 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.
  89. 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.
  90. 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. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2007; 71(8): 1911-9.
  91. 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.
  92. Huang T-C, Tseng KY, Tsai S-S, Liu H-J, Ho C-T, Lin HY, et al. Eriodictyol decreases very late antigen-4 (VLA-4) expression, cellular adhesion, and migration through an NF $\kappa$ B-dependent pathway in monocytes. *J of Funct Foods.* 2010; 2(4): 263-70.
  93. 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.
  94. Lee E, Jeong K-W, Shin A, Jin B, Jnawali HN, Jun B-H, et al. Binding model for eriodictyol to Jun-N terminal kinase and its anti-inflammatory signaling pathway. *BMB reports.* 2013; 46(12): 594-9.
  95. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front Immunol.* 2016; 7: 160.
  96. Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T, Zhang N, Ueno M, Yao Z, et al. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020; 11: 386.

97. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008; 79(8 Suppl): 1601-8.
98. Lumelsky NL. Commentary: engineering of tissue healing and regeneration. *Tissue Eng.* 2007; 13(7): 1393-8.
99. Perretti M, Leroy X, Bland EJ, Montero-Melendez T. Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36(11): 737-55.
100. Van Dyke TE. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. *Mol Aspects Med.* 2017; 58: 21-36.
101. Huang MY, Tu CE, Wang SC, Hung YL, Su CC, Fang SH, et al. Corylin inhibits LPS-induced inflammatory response and attenuates the activation of NLRP3 inflammasome in microglia. *BMC Complement Altern Med.* 2018; 18(1): 221.
102. Kourtzelis I, Hajishengallis G, Chavakis T. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Front Immunol.* 2020; 11: 553.
103. Dasu MR, Park S, Devaraj S, Jialal I. Pioglitazone inhibits Toll-like receptor expression and activity in human monocytes and db/db mice. *Endocrinology.* 2009; 150(8): 3457-64.
104. Yang WS, Jeng CY, Wu TJ, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2002; 25(2): 376-80.
105. Doshi LS, Brahma MK, Bahirat UA, Dixit AV, Nemmani KVS. Discovery and development of selective PPAR $\gamma$  modulators as safe and effective antidiabetic agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2010; 19(4): 489-512.
106. Dong J, Zhang X, Zhang L, Bian HX, Xu N, Bao B, et al. Quercetin reduces obesity-associated ATM infiltration and inflammation in mice: a mechanism including AMPK $\alpha$ 1/SIRT1. *J Lipid Res.* 2014; 55(3): 363-74.
107. Kim CS, Choi HS, Joe Y, Chung HT, Yu R. Induction of heme oxygenase-1 with dietary quercetin reduces obesity-induced hepatic inflammation through macrophage phenotype switching. *Nutr Res Pract.* 2016; 10(6): 623-8.
108. Li X, Jin Q, Yao Q, Xu B, Li L, Zhang S, et al. The Flavonoid Quercetin Ameliorates Liver Inflammation and Fibrosis by Regulating Hepatic Macrophages Activation and Polarization in Mice. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 72.
109. Feng X, Qin H, Shi Q, Zhang Y, Zhou F, Wu H, et al. Chrysin attenuates inflammation by regulating M1/M2 status via activating PPAR $\gamma$ . *Biochem Pharmacol.* 2014; 89(4): 503-14.
110. Martinez-Micaelo N, Gonzalez-Abuin N, Ardevol A, Pinent M, Blay MT. Procyanidins and inflammation: molecular targets and health implications. *Biofactors.* 2012; 38(4): 257-65.
111. Choi MJ, Lee EJ, Park JS, Kim SN, Park EM, Kim HS. Anti-inflammatory mechanism of galangin in lipopolysaccharide-stimulated microglia: Critical role of PPAR-gamma signaling pathway. *Biochem Pharmacol.* 2017; 144: 120-31.

112. Bhargava P, Verma VK, Malik S, Khan SI, Bhatia J, Arya DS. Hesperidin regresses cardiac hypertrophy by virtue of PPAR-gamma agonistic, anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant properties. *J Biochem Mol Toxicol*. 2019; 33(5): e22283.
113. Jia Y, Kim JY, Jun HJ, et al. Cyanidin is an agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reducing hepatic lipid. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(4):698-708.
114. Ben Lagha A, Azelmat J, Vaillancourt K, Grenier D. A polyphenolic cinnamon fraction exhibits anti-inflammatory properties in a monocyte/macrophage model. *PLoS One*. 2021; 16(1): e0244805.
115. Collins G, de Souza Carvalho J, Gilroy DW. The translation potential of harnessing the resolution of inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2023; 152(2): 356-8.
116. Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood*. 2002; 100(3): 854-61.
117. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chevre R, N AG, et al. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. 2013; 153(5): 1025-35.
118. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol*. 2018; 9: 113.
119. Scheiermann C, Frenette PS, Hidalgo A. Regulation of leucocyte homeostasis in the circulation. *Cardiovasc Res*. 2015; 107(3): 340-51.
120. Ella K, Csepanyi-Komi R, Kaldi K. Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain Behav Immun*. 2016; 57: 209-21.
121. Petty JM, Sueblinvong V, Lenox CC, Jones CC, Cosgrove GP, Cool CD, et al. Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury. *J Immunol*. 2007; 178(12): 8148-57.
122. Adrover JM, Nicolas-Avila JA, Hidalgo A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol*. 2016; 37(5): 334-45.
123. Van Eeden SF, Bicknell S, Walker BA, Hogg JC. Polymorphonuclear leukocytes L-selectin expression decreases as they age in circulation. *Am J Physiol*. 1997; 272(1 Pt 2): H401-8.
124. van Grinsven E, Textor J, Hustin LSP, Wolf K, Koenderman L, Vrisekoop N. Immature Neutrophils Released in Acute Inflammation Exhibit Efficient Migration despite Incomplete Segmentation of the Nucleus. *J Immunol*. 2019; 202(1): 207-17.
125. Uhl B, Vadlau Y, Zuchtriegel G, Nekolla K, Sharaf K, Gaertner F, et al. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood*. 2016; 128(19): 2327-37.
126. Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C, Glogauer M. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp Cell Res*. 2016; 342(2): 200-9.
127. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*. 2012; 122(1): 327-36.

128. Prausmuller S, Spinka G, Stasek S, Arfsten H, Bartko PE, Goliash G, et al. Neutrophil Activation/Maturation Markers in Chronic Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. *Diagnostics (Basel)*. 2022; 12(2).
129. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*. 2015; 525(7570): 528-32.
130. Grieshaber-Bouyer R, Nigrovic PA. Neutrophil Heterogeneity as Therapeutic Opportunity in Immune-Mediated Disease. *Front Immunol*. 2019; 10: 346.
131. Yang P, Li Y, Xie Y, Liu Y. Different Faces for Different Places: Heterogeneity of Neutrophil Phenotype and Function. *J Immunol Res*. 2019; 2019: 8016254.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. Ferreira PS, Manthey JA, Nery MS, Spolidorio LC, Cesar TB. Low doses of eriocitrin attenuate metabolic impairment of glucose and lipids in ongoing obesogenic diet in mice. *J Nutr Sci*. 2020; 9: e59.
136. Nery M, Ferreira PS, Gonçalves DR, Spolidorio LC, Manthey JA, Cesar TB. Physiological effects of tangeretin and heptamethoxyflavone on obese C57BL/6J mice fed a high-fat diet and analyses of the metabolites originating from these two polymethoxylated flavones. *Food Sci Nutr*. 2021;9(4):1997-2009.
137. 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.
138. Goncalves 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.
139. Mulero J, Bernabe J, Cerda B, Garcia-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.
140. 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.
141. 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).
142. 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.

143. Souza Ferreira P, Spolidorio L, Manthey J, Cesar T. Citrus flavanones prevent systemic inflammation and ameliorate oxidative stress in C57BL/6J mice fed high-fat diet. *Food Funct.* 2016; 7.
144. De Maeyer RPH, van de Merwe RC, Louie R, et al. Blocking elevated p38 MAPK restores efferocytosis and inflammatory resolution in the elderly [published correction appears in *Nat Immunol.* 2020 Jun;21(6):696.
145. Sjöstrand M, Carow B, Nyberg WA, Covacu R, Rottenberg ME, Espinosa A. TRIM21 controls Toll-like receptor 2 responses in bone-marrow-derived macrophages. *Immunology.* 2020; 159(3): 335-43.
146. Wang Y, Lu T, Sun G, Zheng Y, Yang S, Zhang H, et al. Targeting of apoptosis gene loci by reprogramming factors leads to selective eradication of leukemia cells. *Nature Communications.* 2019; 10(1): 5594.
147. Ashhurst TM, Marsh-Wakefield F, Putri GH, Spiteri AG, Shinko D, Read MN, et al. Integration, exploration, and analysis of high-dimensional single-cell cytometry data using Spectre. *Cytometry A.* 2022; 101(3): 237-53.
148. den Braanker H, Bongenaar M, Lubberts E. How to Prepare Spectral Flow Cytometry Datasets for High Dimensional Data Analysis: A Practical Workflow. *Front Immunol.* 2021; 12: 768113.
149. Hahne F, LeMeur N, Brinkman RR, Ellis B, Haaland P, Sarkar D, et al. flowCore: a Bioconductor package for high throughput flow cytometry. *BMC Bioinformatics.* 2009; 10: 106.
150. Melsen JE, van Ostaijen-Ten Dam MM, Lankester AC, Schilham MW, van den Akker EB. A Comprehensive Workflow for Applying Single-Cell Clustering and Pseudotime Analysis to Flow Cytometry Data. *J Immunol.* 2020; 205(3): 864-71.
151. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A.* 2015; 87(7): 636-45.
152. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology.* 1995; 28(1): 25-30.
153. Mensor LL, Menezes FS, Leitao GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res.* 2001; 15(2): 127-30.
154. Kakkar P, Das B, Viswanathan PN. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J Biochem Biophys.* 1984; 21(2): 130-2.
155. Hazra B, Biswas S, Mandal N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement Altern Med.* 2008; 8: 63.
156. Assis RP, Castro JFA, Gutierrez VO, Arcaro CA, Brotto RS, Oliveira OMMF, et al. Effects of uremic solutes on reactive oxygen species in vitro model systems as a possibility of support the renal function management. *BMC Nephrology.* 2015; 16(1): 50.
157. Kohn HI, Liversedge M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Exp Ther.* 1944; 82(3): 292-300.

158. Clemente-Suárez VJ, Beltrán-Velasco AI, Redondo-Flórez L, Martín-Rodríguez A, Tornero-Aguilera JF. Global Impacts of Western Diet and Its Effects on Metabolism and Health: A Narrative Review. *Nutrients*. 2023; 15(12).
159. Baek JY, Kwak JE, Ahn MR. Eriocitrin Inhibits Angiogenesis by Targeting VEGFR2-Mediated PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathways. *Nutrients*. 2024; 16(7).
160. Kina K, Masuda H, Nakayama H, Nagatsuka Y, Nabetani T, Hirabayashi Y, et al. The Novel Neutrophil Differentiation Marker Phosphatidylglucoside Mediates Neutrophil Apoptosis. *The Journal of Immunology*. 2011; 186(9): 5323-32.
161. Wan T, Zhao Y, Fan F, Hu R, Jin X. Dexamethasone Inhibits *S. aureus*-Induced Neutrophil Extracellular Pathogen-Killing Mechanism, Possibly through Toll-Like Receptor Regulation. *Front Immunol*. 2017; 8: 60.
162. Jimenez-Duran G, Luque-Martin R, Patel M, Koppe E, Bernard S, Sharp C, et al. Pharmacological validation of targets regulating CD14 during macrophage differentiation. *EBioMedicine*. 2020; 61: 103039.
163. Minguet G, Franck T, Joris J, Serteyn D. Sevoflurane modulates the release of reactive oxygen species, myeloperoxidase, and elastase in human whole blood: Effects of different stimuli on neutrophil response to volatile anesthetic in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2017; 30(4): 362-70.
164. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun*. 2010; 2(3): 216-27.
165. Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*. 2019; 133(20): 2178-85.
166. Bharadwaj D, Mold C, Markham E, Du Clos TW. Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol*. 2001; 166(11): 6735-41.
167. Hsu MJ, Lee SS, Lee ST, Lin WW. Signaling mechanisms of enhanced neutrophil phagocytosis and chemotaxis by the polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum*. *Br J Pharmacol*. 2003; 139(2): 289-98.
168. Sugawara H, Imai J, Yamamoto J, Izumi T, Kawana Y, Endo A, et al. A highly sensitive strategy for monitoring real-time proliferation of targeted cell types in vivo. *Nat Commun*. 2023; 14(1): 3253.
169. McKenna E, Mhaonaigh AU, Wubben R, Dwivedi A, Hurley T, Kelly LA, et al. Neutrophils: Need for Standardized Nomenclature. *Front Immunol*. 2021; 12: 602963.
170. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(3): 173-82.
171. Zhang LX, Ye J, Chen YB, Peng HL, Chen X, Liu L, et al. The effect of CD33 expression on inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol Invest*. 2013; 42(8): 701-10.
172. Boyd CR, Orr SJ, Spence S, Burrows JF, Elliott J, Carroll HP, et al. Siglec-E is up-regulated and phosphorylated following lipopolysaccharide stimulation in order to limit TLR-driven cytokine production. *J Immunol*. 2009; 183(12): 7703-9.

173. Ando M, Tu W, Nishijima K, Iijima S. Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 369(3): 878-83.
174. Paul SP, Taylor LS, Stansbury EK, McVicar DW. Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Blood.* 2000; 96(2): 483-90.
175. Ulyanova T, Shah DD, Thomas ML. Molecular cloning of MIS, a myeloid inhibitory siglec, that binds protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *J Biol Chem.* 2001; 276(17): 14451-8.
176. Nguyen DH, Hurtado-Ziola N, Gagneux P, Varki A. Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(20): 7765-70.
177. Duffin R, Leitch AE, Fox S, Haslett C, Rossi AG. Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies. *Immunol Rev.* 2010; 236: 28-40.
178. Lucas CD, Allen KC, Dorward DA, Hoodless LJ, Melrose LA, Marwick JA, et al. Flavones induce neutrophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1 via a proteasomal-dependent pathway. *FASEB J.* 2013; 27(3): 1084-94.
179. Perez-Figueroa E, Alvarez-Carrasco P, Ortega E, Maldonado-Bernal C. Neutrophils: Many Ways to Die. *Front Immunol.* 2021; 12: 631821.
180. Michlewska S, Dransfield I, Megson IL, Rossi AG. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha. *FASEB J.* 2009; 23(3): 844-54.
181. Xia T, Zhang M, Lei W, Yang R, Fu S, Fan Z, et al. Advances in the role of STAT3 in macrophage polarization. *Front Immunol.* 2023; 14: 1160719.
182. Zhang Y, Zhou S, Zhou J, Wang D, Zhou T. Regulation of NF-kappaB/MAPK signaling pathway attenuates the acute lung inflammation in *Klebsiella pneumoniae* rats by mollugin treatment. *Microb Pathog.* 2019; 132: 369-73.
183. Wang WY, Tan MS, Yu JT, Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med.* 2015; 3(10): 136.
184. Yang J, Chen G, Guo TW, Qin WY, Jia P. Simiao Wan attenuates monosodium urate crystal-induced arthritis in rats through contributing to macrophage M2 polarization. *J Ethnopharmacol.* 2021; 275: 114123.
185. Zeng H, Zhao B, Zhang D, Rui X, Hou X, Chen X, et al. *Viola yedoensis* Makino formula alleviates DNCB-induced atopic dermatitis by activating JAK2/STAT3 signaling pathway and promoting M2 macrophages polarization. *Phytomedicine.* 2022; 103: 154228.
186. Qiu Z, Xu F, Wang Z, Yang P, Bu Z, Cheng F, et al. Blockade of JAK2 signaling produces immunomodulatory effect to preserve pancreatic homeostasis in severe acute pancreatitis. *Biochem Biophys Rep.* 2021; 28: 101133.
187. Malyshev IY. [Phenomena and signaling mechanisms of macrophage reprogramming]. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2015; 59(2): 99-111.
188. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012; 122(3): 787-95.

189. Pang QM, Yang R, Zhang M, Zou WH, Qian NN, Xu QJ, et al. Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Macrophage Plasticity through the IL-10/STAT3 Pathway. *Stem Cells Int.* 2022; 2022: 5181241.
190. Castellani P, Balza E, Rubartelli A. Inflammation, DAMPs, tumor development, and progression: a vicious circle orchestrated by redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(7): 1086-97.
191. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(7): 1126-67.
192. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42(2): 153-64.
193. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 5698931.
194. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 7432797.
195. 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.
196. Balakrishnan A, Menon VP. Protective effect of hesperidin on nicotine induced toxicity in rats. *Indian J Exp Biol.* 2007; 45(2): 194-202.
197. 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.
198. Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2004; 43(6): 42-51.
199. 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.
200. 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.
201. Hsueh MF, Bolognesi MP, Wellman SS, Kraus VB. Anti-inflammatory effects of naproxen sodium on human osteoarthritis synovial fluid immune cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2020; 28(5): 639-45.
202. Aras H, Caglayan F, Guncu GN, Berberoglu A, Kilinc 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.
203. Herrera BS, Coimbra LS, da Silva AR, Teixeira SA, Costa SK, Wallace JL, et al. The H<sub>2</sub>S-releasing naproxen derivative, ATB-346, inhibits alveolar bone loss and inflammation in rats with ligature-induced periodontitis. *Med Gas Res.* 2015; 5: 4.
204. 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.

205. Wojcieszynska D, Guzik U. Naproxen in the environment: its occurrence, toxicity to nontarget organisms and biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020; 104(5): 1849-57.
206. Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? *Physiological Reviews.* 2008; 88(4): 1547-65.
207. Bione FTSdC. Análise in vitro das propriedades da eriocitrina e eriodictiol sobre fibroblastos L929: Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.
208. Charoensin S, Huang TC, Hsu JL. An innovative cell model revealed the inhibitory effect of flavanone structure on peroxynitrite production through interaction with the IKKbeta kinase domain at ATP binding site. *Food Sci Nutr.* 2020; 8(6): 2904-12.
209. Guo G, Shi W, Shi F, Gong W, Li F, Zhou G, et al. Anti-inflammatory effects of eriocitrin against the dextran sulfate sodium–induced experimental colitis in murine model. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.* 2019; 33(11): e22400.
210. Nogata Y, Ohta H, Ishii T, Sekiya K. Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7-O-rutinoside) as an arachidonate lipoxygenase inhibitor from Lumie fruit (*Citrus lumia*) and its distribution in *Citrus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2007; 87(1): 82-9.
211. Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr.* 2005; 135(1): 48-52.
212. Waller DG, Sampson AP. 1 - Principles of pharmacology and mechanisms of drug action. In: Waller DG, Sampson AP, editors. *Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition)*: Elsevier; 2018. p. 3-31.
213. Yu YS, Hsu CL, Yen GC. Anti-inflammatory effects of the roots of *Alpinia pricei* Hayata and its phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(17): 7673-80.
214. Aghbali AA, Akbarzadeh A, Kouhsoltani M. The role of macrophages and eosinophils in reactive lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2018; 22(1): 147.
215. 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.
216. Pelaia C, Paoletti G, Puggioni F, et al. Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. *Front Physiol.* 2019; 10: 1514.
217. Domaszewska-Szostek A, Puzianowska-Kuznicka M, Kurylowicz A. Flavonoids in Skin Senescence Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(13).
218. Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(6).