



**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<sup>a</sup>. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

3º Examinador: Prof<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Silvana Regina Perez Orrico, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Prof. Dr. Élcio Marcantonio Júnior, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Leal Zandin-Barcelos, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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 $\beta$ . As duas concentrações de hesperidina ou naproxeno não alteraram a expressão deTNF- $\alpha$  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 $\beta$ . The two concentrations of hesperidin or naproxen did not alter the expression of TNF- $\alpha$  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

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

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Levantamento de estudos que realizaram dieta suplementada com flavonoides cítricos em modelos in vivo .....	29
<b>Quadro 2</b> - Composição da dieta padrão AIN 93M.....	31
<b>Quadro 3</b> - 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  
CO<sub>2</sub>: 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-  $\gamma$ : Interferon- $\gamma$   
IL: Interleucina  
iNOS: Isoforma indutível da NOS  
I $\kappa$ B: Inibidor do NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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

PGE<sub>2</sub>: 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

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

<b>5.3 A Suplementação Alimentar com Hesperidina Inibiu Perda Óssea Induzida pelo LPS de <i>E. coli</i></b> .....	<b>43</b>
<b>5.4 Aspectos Microscópicos</b> .....	<b>44</b>
<b>5.5 Análise Estereométrica</b> .....	<b>45</b>
<b>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</b> .....	<b>45</b>
<b>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</b> .....	<b>48</b>
<b>5.7 Houve Queda da Atividade de MPO Quando os Animais Receberam Dieta Enriquecida com Flavonoides Cítricos</b> .....	<b>50</b>
<b>5.8 Citotoxicidade da Hesperidina</b> .....	<b>50</b>
<b>5.9 Atividade Metabólica de Fibroblastos L929</b> .....	<b>51</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>
<b>ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	<b>75</b>

## 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 microrganismos<sup>1-5</sup>. 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)<sup>3</sup>. 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<sup>3,6</sup>. 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<sup>1,7</sup>. 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<sup>8,9</sup>. 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<sup>8,10,11</sup>. Também são conhecidos por serem potentes inibidores para várias enzimas, como xantina oxidase (XO), ciclo-oxigenase (COX), lipoxigenase e fosfoinositídeo 3-quinase<sup>7,12,13</sup>. 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<sup>1,13</sup>.

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<sup>14,15</sup>.

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.

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 Hipótese

A hipótese é que a conhecida ação anti-inflamatória da hesperidina, poderia ser empregada na modulação da resposta inflamatória e consequente reabsorção óssea utilizando-se um modelo de desenvolvimento da doença periodontal.

### 2.2 Objetivo Geral

Avaliar se a suplementação alimentar, com hesperidina, é capaz de regular a resposta inflamatória e reabsorção óssea alveolar induzida por LPS de *E. coli* e, portanto, o impacto da hesperidina sobre a periodontite experimental em camundongos.

### 2.3 Objetivo Específico

Determinar a ação da suplementação com a flavonona hesperidina a 25mg/kg e 50 mg/kg em camundongos submetidos ao modelo de periodontite experimental com micro injeções de LPS sobre os seguintes parâmetros:

- a) Avaliação da porcentagem de volume ósseo periodontal (%BV/TV) por microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT);
- b) Avaliação microscópica do fígado e maxila (Qualitativa);
- c) Avaliação estereométrica (Quantitativa);
- d) Avaliação da expressão de citocinas no tecido muco gengival através de ensaio Multiplex;
- e) Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO);

In vitro foi avaliada a ação da hesperidina nas concentrações de 1, 10 e 50 $\mu$ M sob testes de viabilidade e proliferação celular sob os seguintes parâmetros:

- a) Avaliação de viabilidade celular em fibroblastos L929 por ensaio MTT;
- b) Avaliação de proliferação celular de fibroblastos L929, através do método de Alamar Blue®.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Ação dos Flavonoides sobre a Inflamação

O processo inflamatório é uma resposta normal do nosso organismo e envolve a produção de mediadores pró-inflamatórios decorrente da infecção por microrganismos, de agressões físicas ou químicas. Se inicia pela migração de leucócitos do sangue até a região injuriada<sup>16</sup>. As células do sistema imune inato são ativadas por patógenos através de receptores de reconhecimento padrão toll-like (TRLs), receptores de domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo (NOD) - semelhantes ou NLRs (NOD- like receptors), receptores do tipo lectina C (CLRs), e receptores semelhantes ao gene-I induzido por ácido retinóico (RLRs). Esses receptores participam do reconhecimento de padrões exógenos moleculares associados a patógenos (PAMPs) como o LPS (lipopolissacarídeos) , flagelina, ácidos nucléicos, e padrões moleculares associados a danos endógenos (DAMPs) a partir de células mortas e em processo de morte, como o trifosfato de adenosina (ATP), ácido úrico, proteínas de choque térmico, ou os próprios ácidos nucleicos ativando células do sistema imune inato (macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e células *natural killers*) e subsequentemente células do sistema imune adaptativo (linfócitos T e B e subconjuntos de CD4+, CD8+T e células natural killer T). Isso ocasiona no aumento de mediadores pró-inflamatórios iNOS, COX-2 e citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 com objetivo de eliminar os invasores<sup>16,17</sup>. Entretanto quando essa manifestação ocorre de forma exacerbada causa um efeito paradoxal intensificando a dor, edema, e danos aos tecidos adjacentes<sup>16,18,19</sup>.

Flavonoides constituem um grupo de polifenóis de origem vegetal, sendo descritos mais de 5.000 tipos de compostos<sup>20,21</sup>, agrupados nas seguintes subclasses: antocianinas, flavonóis, flavanonas, flavonas, flavanolignanos e isoflavonas<sup>22</sup>. Em plantas os flavonoides exercem uma variedade de funções como proteção a luz ultravioleta, neutralizando radicais livres, modulando a atividade enzimática, atuando como guias de néctar (atraindo e repelindo insetos), facilitando o enraizamento de plantas leguminosas, apoiando a germinação e protegendo contra infecção viral, fúngica e bacteriana<sup>7</sup>. Estudos tem mostrado que em animais e humanos as atividades biológicas dos flavonoides também abrangem um amplo espectro, desde

propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-neoplásicas, antibacterianas e inibição da reabsorção óssea<sup>20,23-27</sup>. Portanto os flavonoides têm suas ações farmacológicas frequentemente revisadas, uma vez que apresentam efeitos benéficos na prevenção e tratamento de diversas complicações de origem inflamatória.

Vários flavonoides desempenham atividades anti-inflamatórias e analgésicas afetando sistemas enzimáticos participantes do processo inflamatório. Manthey<sup>28</sup>, (2000) mostrou que a hesperidina bloqueia a produção de espécies oxidativas que causam danos teciduais através da inibição de mediadores pró-inflamatórios principalmente aqueles produzidos do metabolismo do ácido araquidônico. A maioria dos flavonoides exibem inibição de agregação plaquetária e são potentes inibidores de lipoxigenase e ciclooxigenase. Essa inibição se dá por competitividade de ligação dos flavonoides ao ATP nos sítios catalíticos das enzimas<sup>18</sup>.

O conhecimento dos mecanismos de instalação do processo inflamatório e suas vias de sinalização contribuem para a busca de alternativas que controlem a manifestação descontrolada e os efeitos indesejáveis de danos aos tecidos, podendo assim intervir no início da cadeia inibindo ou mediando suas diversas manifestações.

### **3.2 Ação dos Flavonoides sobre o Metabolismo Ósseo**

Em um processo inflamatório, sugere-se que os flavonoides agem no metabolismo do tecido ósseo, pela redução da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6<sup>29</sup>, que são citocinas conhecidamente relacionadas a reabsorção óssea. Alguns flavonoides exercem ação sobre o tecido ósseo promovendo a osteoblastogênese e, conseqüentemente, formação óssea, enquanto outros atuam inibindo a osteoclastogênese, prevenindo a reabsorção óssea<sup>21,30</sup>. Trabalhos recentes in vitro e in vivo mostraram que o emprego de um tipo específico de flavonoide (Tridax procumbens) foi capaz de suprimir a diferenciação de osteoclastos pela redução da expressão de RANKL e promoveu diferenciação de osteoblastos estimulando neoformação de tecido ósseo<sup>31,32</sup>. O tratamento com quercetin resulta no aumento da densidade mineral óssea, cálcio e fósforo<sup>33</sup> enquanto o icariin inibe a expressão TNF- $\alpha$ , IL6 e IL1- $\beta$  em resposta inflamatória causada por LPS<sup>34,35</sup>. Icariin mostrou redução na inflamação induzida por partículas de desgaste, um dos maiores responsáveis por falhas em implantes. O tratamento resultou em menor osteólise nos camundongos tratados pela redução da osteoclastogênese através da redução da expressão dos

genes de RANKL e aumento da expressão de mRNA de OPG além da redução de citocinas TNF- $\alpha$ , IL6 e IL1- $\beta$ <sup>29</sup>. No entanto, o papel de alguns desses compostos sobre o tecido ósseo tem demonstrado ser controverso, como por exemplo, a quercitina que pode induzir tanto osteoblastogênese quanto osteoclastogênese em tecido ósseo<sup>36,37</sup>, enquanto outro composto denominado apigenina apresentou ação inibidora de ambos os processos de osteoclastogênese e osteoblastogênese in vitro<sup>38</sup>.

A hesperidina representa, dentro da classe das flavononas, o composto mais pesquisado sobre a saúde e metabolismo ósseo<sup>39</sup>. Os efeitos benéficos da hesperidina sobre tecido ósseo parecem estar relacionados principalmente a redução da reabsorção óssea<sup>39</sup>, associado à sua capacidade de promover a formação óssea<sup>40</sup> e ainda, é sugerido que o composto apresente efeito protetor sobre o osso através da modulação da produção de mediadores inflamatórios<sup>41</sup>. In vitro, foi avaliado a influência da hesperitina, forma aglicona da hesperidina, no processo de reparo ósseo, no qual além de promover proliferação e migração de células tronco mesenquimais, estimulou a diferenciação osteogênica dessas células. No mesmo estudo, o mesmo flavonoide foi associado a um *scaffold* com células tronco mostrou acelerar o processo de reparo em fratura de tíbia de ratos<sup>42</sup>. A administração oral de hesperidina promoveu diminuição da perda óssea e de inserção em modelo de doença periodontal induzido por ligadura em ratos, notou-se diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e iNOS das amostras gengivais coletadas quando comparadas ao grupo sem tratamento<sup>1</sup>. Eriodictiol apresentou ser capaz de inibir a atividade de NFATc1, um dos principais participantes da atividade de osteoclastogênese resultando na menor reabsorção óssea<sup>43,44</sup>.

### **3.3 Flavanonas - Hesperidina, Eriodictiol e Eriocitrina**

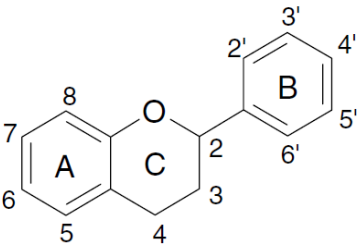
Os flavonoides cítricos têm sido descritos por ajudarem a regular o metabolismo lipídico, limitando a lipotoxicidade e estimulando a utilização de glicose e ácidos graxos nos tecidos<sup>45</sup>. Existe uma relação inversa entre o consumo de frutas cítricas e fatores de risco para doenças cardiovasculares, incluindo melhora da pressão arterial, do peso corporal, e da dislipidemia<sup>46</sup>.

O papel antioxidante dos flavonoides cítricos se caracteriza por sua ação de sequestrar e neutralizar radicais livres, contribuindo com as defesas endógenas contra o estresse oxidativo<sup>9,19</sup>. Os flavonoides cítricos abrangem vários subgrupos, incluindo flavanonas (naringina, hesperidina e eriocitrina), flavonas (diosmina), e

polimetoxiflavonas (nobiletina e tangeretina). Eles têm sido reconhecidos como agentes com ação anti-inflamatória e antioxidante na obesidade e síndrome metabólica<sup>9</sup>.

A Flavanona é uma das maiores classes de flavonoides. Dentre suas formas conhecidas aproximadamente 350 são aglicosadas e 100 glicosadas<sup>9</sup>. Sua estrutura é baseada na forma genérica dos flavonoides composta por um núcleo formado por dois anéis aromáticos (A e B) ligados através de um anel de grupamento pirona (C) mostrado na figura 1. Todos flavonoides derivam seus 15-carbonos de dois metabólitos básicos, o malonil-CoA e o p-cumaroil-CoA<sup>47</sup>. Três moléculas de malonil-CoA se condensam com o p-cumaroil-CoA formando uma chalcona intermediária. Chalcona é uma classe de flavonoides de dois anéis fenólicos conectados por uma ponte de 3 carbonos. Subsequentemente chalcona isomerase catalisa a estrutura anterior em flavanona (4',5,7-trihidroxiflavanona). Baseada nessa estrutura todas as outras classes de flavonoides são geradas<sup>9,47,48</sup>.

**Figura 1** - Estrutura básica dos flavonoides

	<b>Flavonoide</b>	<b>7</b>	<b>3'</b>	<b>4'</b>
	Hesperidina (Hesperetin 7-O-rutinosideo)	O-Ru <sup>α</sup>	OH	OCH <sub>3</sub>
	Eriocitrina (Eriodictyol 7-O-rutinosideo)	O-Ru <sup>α</sup>	OH	OH
	Eriodictiol	OH	OH	OH

<sup>α</sup>O-Rutinosose

Fonte: Adaptado de Barreca et al.<sup>9</sup> e Martens e Mithöfer<sup>47</sup>.

A hesperidina (C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>15</sub>) é um flavonoide pertencente ao grupo das flavanonas encontrada em frutas cítricas como laranja, limão e limas. Foi isolada pela primeira vez em 1828 pelo químico francês Lebreton do albedo (porção esponjosa interior da casca) de laranjas<sup>19,49</sup>, devido sua variedade de funções biológicas é chamada de bioflavonóide. A hesperidina é a forma glicosilada e transitória encontrada na natureza que quando ingerida sofre deglicosilação por ação enzimática ou bactérias residentes do intestino delgado formando uma estrutura sem o radical

glicosídico (aglicona) chamada hesperitina (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>)<sup>50</sup> podendo ser absorvida. Nos enterócitos é conjugada em glicuronídeos e sulfatos e são transportadas para o fígado, onde sofrem novas reações formando vários metabólitos. Em seguida são disponibilizadas na corrente sanguínea e exercem suas atividades biológicas<sup>9,51</sup>. Apresenta ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-neoplásica e propriedade antialérgica<sup>19,42,52</sup>. Relata-se sucesso no tratamento de artrite reumatoide, doença caracterizada por um processo inflamatório intenso, através da redução de níveis de TNF- $\alpha$ , e IL- $\beta$ <sup>53</sup>. A hesperidina representa, dentro da classe das flavononas, o composto mais pesquisado sobre a saúde e metabolismo ósseo<sup>39</sup>. Os efeitos benéficos da hesperidina sobre tecido ósseo parecem estar relacionados principalmente a redução da reabsorção óssea<sup>39</sup>, associado à sua capacidade de promover a formação óssea<sup>40</sup> e ainda, é sugerido que o composto apresente efeito protetor sobre o osso através da modulação da produção de mediadores inflamatórios<sup>41</sup>. Dentre as vantagens da terapia com hesperidina pode se destacar um composto seguro, com limitados efeitos adversos e não acumulativa no organismo, podendo ser administrado inclusive durante a gravidez<sup>54</sup>.

Deve-se enfatizar que embora existam vários trabalhos sobre a ação dos flavonoides sobre o metabolismo ósseo, a ação específica da hesperidina sobre esse tecido foi pouco estudada. A investigação desses compostos nesse tecido é ainda necessária.

A eriocitrina (eriodictiol-7-O-rutinosídeo ou 3', 4', 5,7- tetrahidroxiflavanona-7- $\beta$ -D-glucopiranosídeo), um flavonoide abundante em limões e limas, foi relatado como o antioxidante mais potente destas frutas em estudos *in vitro*<sup>55</sup>. Ela é encontrada principalmente na casca (albedo - porção esponjosa interior da casca + flavedo) e vesículas de suco, sendo 7,5 vezes mais abundantes na casca do limão do que no suco, enquanto sua concentração no suco representa metade da do ácido ascórbico<sup>56</sup>. As propriedades biológicas da eriocitrina têm sido relacionadas à redução de alterações metabólicas observadas em indivíduos obesos<sup>57-59</sup>. Foi mostrado que a eriocitrina, e sua aglicona, eriodictiol, apresentaram potente atividade antioxidante *in vitro* e foram relatadas atividades anti-inflamatórias e antioxidantes em ratos diabéticos ou submetidos ao exercício agudo<sup>58,60,61</sup>. A administração via suplementação alimentar de eriocitrina, em peixes zebrafish, foi eficaz na melhora da dislipidemia e interferiu positivamente na diminuição da deposição de gordura no fígado em modelo experimental de obesidade<sup>62</sup>.

O efeito anti-inflamatório do eriodictiol foi mostrado na redução dos níveis de óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão em ratos diabéticos<sup>58</sup>. Foi mostrado que o eriodictiol regula moléculas de adesão e a migração trans- endotelial de monócitos, que são eventos imunes envolvidos na patogênese de doenças inflamatórias, como a aterosclerose<sup>63</sup>. O eriodictiol tem sido também identificado como ativador do fator de transcrição relacionado ao Nrf2, induzindo enzimas de desintoxicação de fase 2 em queratinócitos, células da retina humana, e em modelo de isquemia cerebral<sup>64,65</sup>. A suplementação de hesperidina e eriocitrina, aumentaram a atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase e glutathione (GSH) no fígado, e diminuíram o nível de 8-OHdG (indicador de dano oxidativo ao DNA) na urina de ratos diabéticos, suprimindo a peroxidação lipídica no soro, fígado e rins, onde a ação antioxidante da eriocitrina mostrou-se mais potente que da hesperidina<sup>66</sup>.

Atividade antioxidante e efeito anti-inflamatório dos flavonoides são potencializados na presença de mais grupos OH, como é o caso da eriocitrina e do eriodictiol<sup>58,67</sup>. Essas propriedades defendem contra o estresse oxidativo e evitam danos teciduais pela oxidação das membranas celulares. No entanto, a bioatividade de tais moléculas depende da sua estrutura e metabolismo, que depende da sua biodisponibilidade. Essa, por sua vez, é baseada na matriz alimentar ingerida, e afetada pela abundância no alimento, quantidade ingerida, e metabolismo interindividual<sup>57</sup>. Quando ingerida, a eriocitrina é deglicosilada por ação de bactérias intestinais e convertida a eriodictiol, sendo este conjugado com glicuronídeos e sulfatos nos enterócitos, para posterior absorção. As formas conjugadas são então transportadas ao fígado, onde sofrem novas reações de sulfatação, glicuronidação e metilação, formando uma variedade de metabólitos glicuronídeos e sulfatos conjugados de eriodictiol, homoeriodictiol e hesperitina. Em seguida eles são liberados para a circulação aptos a exercerem sua atividade biológica<sup>59,68</sup>. Como apresentado, a eriocitrina possui efeitos que podem reduzir a inflamação e distúrbios metabólicos devido à sua capacidade de eliminar o excesso de radicais reativos, impedindo o desencadeamento de processos inflamatórios. Estudos prévios mostraram um rápido desaparecimento dos metabólitos de eriocitrina do compartimento sanguíneo, sugerindo uma maior afinidade deste pelos tecidos<sup>69</sup>. Entretanto, pouco se conhece sobre seu metabolismo e possíveis metabólitos responsáveis pela sua ação nos diferentes órgãos e tecidos. Desta forma, o emprego da eriocitrina em modelo

experimental se faz importante como forma de avaliar sua atividade biológica, doses de efeito relacionadas à redução da inflamação e metabólitos ativos no sangue e demais tecidos.

Deve-se enfatizar que embora existam vários trabalhos sobre a ação dos flavonoides sobre o processo inflamatório, a ação específica do eriodictiol e eriocitrina sobre a inflamação periodontal é pouco explorada. A investigação desses compostos nesse tecido é ainda necessária.

### **3.4 Fundamentos dos Efeitos da Suplementação de Flavonoides em Experimentos In Vivo Considerando como Componentes da Dieta**

Yamamoto et al.<sup>70</sup> (2013) mostraram que a suplementação contínua de hesperidina (0.1%) adicionado na dieta padrão teve efeitos anti-hipertensivos em ratos. Entre outros achados, verificaram a supressão da síntese de tromboxanas A2 e, que a hesperitina, um metabólito da hesperidina, reduziu os níveis de tromboxano B2. Ferreira et al.<sup>50</sup>; Hiramitsu et al.<sup>62</sup>; e Yamashita et al.<sup>71</sup> verificaram que dietas hipercalóricas suplementadas com hesperidina, eriodictiol e eriocitrina manteve a capacidade antioxidante, reduziu os níveis de IL-6, de proteína quimioatrativa de macrófagos (MCP-1) e proteínas C-reativa. Todos os resultados, portanto, apontaram para melhoria das condições clínicas e bioquímicas dos animais tratados com os compostos. Além dessas propriedades, a literatura tem mostrado que flavonoides cítricos em geral, incluindo a hesperidina, também apresentam atividade neuroprotetora, atuando no tratamento de distúrbios neurológicos. Nesse sentido, Wang et al.<sup>72</sup> (2014) avaliaram o impacto da dieta suplementada com hesperidina sobre a doença de Alzheimer em camundongos, e observaram redução dos déficits de aprendizagem e memória, além de favorecer a atividade locomotora e aumento do efeito antioxidativo de defesa. Sugerem-se que os flavonoides inseridos na dieta desempenham diversas funções no equilíbrio metabólico através de suas propriedades terapêuticas.

Recentes estudos realizados em humanos por Gonçalves et al.<sup>73</sup> (2017) e Mulero et al.<sup>74</sup> (2012) sugerem que a suplementação com sucos cítricos de forma contínua associados à dieta hipercalórica, mostraram diminuição do estresse oxidativo, diminuição da inflamação, melhora do colesterol no soro sanguíneo, controle nos níveis de proteína C - reativa além de estabilizar a massa corporal.

Takumi et al.<sup>75</sup> (2011) associaram hesperidina à dieta padrão A93 para acessar a distribuição desse flavonoide nos tecidos e órgãos. Encontraram altas concentrações de hesperitina no fígado e na aorta. Kwon e Choi<sup>76</sup> (2019) avaliaram as propriedades anti-obesidade do eriodictiol na ração de camundongos no qual apresentou alívio da dislipidemia e da obesidade, aumento da excreção lipídica nas fezes, melhora da esteatose hepática e diminuição de citocinas pró-inflamatórias, além melhorar a resistência à insulina. (Quadro 1).

**Quadro 1-** Levantamento de estudos que realizaram dieta suplementada com flavonoides cítricos em modelos in vivo

<b>Autor</b>	<b>Ratos/ Camundongos/ Humanos</b>	<b>Flavonoides cítricos que foram suplementados à dieta</b>	<b>Concentração</b>	<b>Principais achados</b>
<b>Miyake et al.<sup>66</sup> (1998)</b>	Ratos Wistar	Eriocitrina e Hesperidina	0,2% de Hesperidina ou Eriocitrina	Diminuição dos níveis de TBARS e 8-OHdG em ratos diabéticos.
<b>Habauzit et al.<sup>41</sup> (2009)</b>	Ratos Wistar	Hesperidina	2,5 g/kg ou 5 g/kg de hesperidina	Efeitos protetores na perda óssea em ratos, pela inibição da reabsorção óssea.
<b>Takumi et al.<sup>75</sup> (2011)</b>	Ratos Wistar	Hesperitina	0,08g de hesperitina/dia	Composto foi encontrado em uma grande variedade de tecidos e no plasma após 4 semanas de ingestão através da dieta.
<b>Mulero et al.<sup>74</sup> (2012)</b>	Humanos	Suco cítrico – Eriocitrina, hesperidina, vicianin-2, derivados de Quercetina	Eriocitrina ~11,45 mg/100 mL; hesperidina ~13,54 /mg 100 mL	Redução benéfica do colesterol, HDL-c e LDL-c, melhores níveis de LDL-ox, Proteína C reativa e homocisteína.
<b>Yamamoto et al.<sup>70</sup> (2013)</b>	Ratos (SHR)	Hesperidina e Hesperidina Glicosil	0,1% de hesperidina e glicosil hesperidina	Preveniu hipertensão e suprimiu a expressão do mRNA de subunidades de NADPH oxidase e síntese de tromboxana A <sub>2</sub> em Ratos hipertensos.
<b>Wang et al.<sup>72</sup> (2014)</b>	Camundongos C57BL/6J	Hesperidina	50mg/kg/dia; 100mg/kg/dia	Suplementação com hesperidina (100 mg /kg/dia) resultou na redução dos déficits de aprendizado e memória, melhora atividade locomotora e melhora da defesa anti-oxidativa, e de atividades das enzimas do complexo mitocondrial I-IV.
<b>Hiramitsu et al.<sup>62</sup> (2014)</b>	Peixe: Zebrafish	Eriocitrina	32mg/kg/dia	Melhora a esteatose hepática e ativação da biogênese mitocondrial
<b>Ferreira et al.<sup>50</sup> (2016)</b>	Camundongos C57BL/6J	Hesperidina, eriocitrina e eriodictiol	100mg/kg/dia de Hesperidina; 200mg/kg/dia de eriocitrina e eriodictiol	Eriocitrina e o eriodictiol reduziram os níveis de TBARS no soro sanguíneo, e a hesperidina e eriodictiol reduziram acúmulo de gordura e danos ao fígado.
<b>Yamashita et al.<sup>71</sup> (2016)</b>	Camundongos C57BL/6J	Eriodictiol	0,045% de eriodictiol ou/e 0,2% de chá verde	Combinação de chá-verde e eriodictiol induziu a uma queda dos níveis de colesterol, em especial LDL.
<b>Gonçalves et al.<sup>73</sup> (2017)</b>	Humanos	Suco de laranja natural – Hesperidina e Naringina	500mL/dia de suco contendo 16,4mg de hesperidina e 2,7mg naringina	Queda dos níveis séricos de colesterol total, colesterol LDL, proteína C-reativa e nos parâmetros de estresse oxidativo.
<b>Ferreira, et al.<sup>77</sup> (2018)</b>	Ratos Wistar e Camundongos C57BL/6J	Eriocitrina	10, 25, 50, 100mg/kg/ dia de por 4 semanas	25 mg/kg diminuiu significativamente os níveis séricos de triglicerídeos (-33%), e melhorou os níveis séricos de glicose (-25%), insulina (-35%), resistina (-18 %) e peroxidação lipídica (-21%).
<b>Kwon and Choi.<sup>76</sup> (2019)</b>	Camundongos C57BL/6N	Eriodictiol	0,005% por 4 meses	Alívio da dislipidemia e a adiposidade, diminuição da expressão de genes relacionados à lipogênese no tecido adiposo branco, aumentando a excreção lipídica fecal. Melhora da esteatose hepática, diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Regulação positiva da expressão de enzimas e genes relacionados à oxidação hepática de ácidos graxos.

Fonte: Elaboração própria.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Animais

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal/Comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Processo CEUA nº20/2018) (Anexo A). Foram utilizados 50 (cinquenta) camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem BALB/c padrão sanitário do tipo “SPF” Specific Pathogen Free, procedentes do Biotério Central da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto-SP. Os camundongos foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), sob temperatura ( $21 \pm 1^\circ \text{C}$ ), umidade (65-75%) e ciclos de luz controlado (12h claro-12h escuro) de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com padrões éticos que cumprem integralmente ARRIVE guidelines. Água e ração padrão ou enriquecida foram disponibilizados *ad libitum*. O peso corporal foi aferido semanalmente e o consumo alimentar diariamente. Determinou-se uma amostra mínima de 7 animais por grupo, entretanto, devido a eventual perda dos animais foram acrescentados 3 animais em cada grupo. Os animais foram alojados em 10 caixas de polipropileno nas dimensões de 30x19x13cm e distribuídos em 5 animais por caixa.

### 4.2 Composição da Dieta

A dieta padrão continha 9,5% de calorias em gorduras, 14,7% em proteínas e 75,8% em carboidratos, com 4,22 kcal/g de ração, segundo as diretrizes AIN 93<sup>78</sup> fornecida por PRAGSOLUÇÕES Biociências - Almeda América, 51 - Vila Canhos - Jaú /SP. A composição das dietas está apresentada no Quadro 2.

**Quadro 2** - Composição da dieta padrão AIN 93M

Composição	g/100g
Dieta	Padrão
Proteínas (%kcal)	14,7
Carboidratos (%kcal)	75,8
Gorduras (% kcal)	9,5
Energia (kcal/g)	4,22
Amido de milho	46,57
Caseína	14,00
L-Cisteína	0,18
Amido Dextrinizado	15,50
Sacarose	10,00
Fibra	4,00
Óleo de Soja	5,00
Banha de Porco	-
Mix Mineral	3,50
Mix Vitamínico	1,00
Bitartarato de Colina	0,25
Tert-Butilhidroquinona (TBHQ)	0,80
Total	100,00

Fonte: Reeves et al.<sup>78</sup>

### 4.3 Suplementos

O suplemento de hesperidina (99% de grau de pureza, purificada no laboratório do Dr. Jonh A. Manthey - *USDA-ARS Horticultural Research Laboratory, Fort Pierce, Florida 34945, United States*) foi recebido em pó e misturado na ração padrão obtendo-se concentrações de 25mg/kg e 50mg/kg que foram administradas respeitando a média de peso corporal dos animais por caixa pesados semanalmente<sup>79-83</sup>. Para formação do pellet foi adicionado volume de água . proporcional a quantidade de ração estabelecida para cada caixa. Os suplementos alimentares foram oferecidos na ração com base no peso corporal. Os grupos controles receberam dieta padrão ou dieta padrão com suplementado de 10mg/kg de naproxeno de peso corporal (*Sigma-Aldrich*) conforme, escrita anteriormente<sup>84</sup>. O Naproxeno pertence ao grupo dos anti-inflamatórios não esteroidais e exerce atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória através da inibição reversível da síntese de prostaglandinas. É um inibidor COX não seletivo e age inibindo ambas as

enzimas COX-1 e COX-2<sup>85,86</sup>. Durante o período de adaptação antes do início do experimento (semana 1) e no decorrer de todo o experimento o consumo alimentar dos animais foi mensurado diariamente, para se conhecer a quantidade média de ração consumida. Baseado nesta quantidade foi oferecido para cada caixa (5 animais) a ração suplementada com o composto específico do grupo (eriocitrina, eriodictiol, naproxeno), mais 10% para garantir a dose diária recomendada do suplemento<sup>50</sup>. O período experimental foi de 60 dias de suplementação. No 30º dia iniciou-se o protocolo de indução da doença periodontal. (Quadro 3).

**Quadro 3** - Distribuição dos grupos de estudo e protocolo experimental

<b>Grupo (n=10)</b>	<b>Indução Doença periodontal</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Dosagem</b>	<b>Duração</b>
Veículo	Não	Veículo (PBS)	-	60 dias
Npx+LPS	Sim	Naproxeno	10 mg/kg	60 dias
LPS	Sim	Ausente	-	60 dias
Hesp25+LPS	Sim	Hesperidina	25 mg/kg	60 dias
Hesp50+LPS	Sim	Hesperidina	50 mg/kg	60 dias

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.4 Consumo Alimentar e Energético

A avaliação do consumo alimentar foi feita diariamente, durante todo o período experimental, utilizou-se o cálculo de resto e ingesta de ração<sup>50,87</sup>. A dieta, oferecida *ad libitum*, foi pesada com auxílio de uma balança analítica (*Scientech® - SA 310 – 310g x 0.1mg*) e acrescentada nos comedouros diariamente. Ao final do dia o restante da ração era pesado novamente, (obtendo-se assim o valor de “resto”). O peso de “resto” descontado do peso “ofertado” representou o consumo diário de cada caixa. Toda ração restante do dia anterior foi descartada e nova ração foi disponibilizada. O período experimental foi de 2 (dois) meses a partir do final do período de adaptação que foi de uma semana. No primeiro mês foi oferecido ração de manutenção ou enriquecida com naproxeno e hesperidina<sup>50</sup>. A partir da quantidade

de ração consumida foi calculada a ingestão energética, baseada na composição das dietas, e a porcentagem de suplemento ingerido, no caso das dietas suplementadas.

#### **4.5 Peso Corporal**

Os animais foram pesados uma vez por semana para determinar o ganho de massa corporal, calculado pela diferença entre o peso final e o peso inicial.

#### **4.6 Indução de Doença Periodontal**

Os camundongos foram anestesiados por Isoflurano (Instituto BioChimico Indústria Farmacêutica Ltda) 1 - 4% em 100% de oxigênio em uma câmara de poliacrílico transparente; após 15 minutos foram transferidos para fora da câmara e mantidos anestesiados por meio de máscara respiratória afim de minimizar o estresse dos animais<sup>88,89</sup>. Após a anestesia, foi injetada, através de micro injeções bilaterais, 3 $\mu$ L da solução contendo 10 mg/ml (E. coli 055:B5, Sigma-Aldrich Co.) no tecido gengival adjacente a face palatina dos primeiros molares maxilares 3 vezes por semana, durante 4 semanas por um operador calibrado. As injeções foram realizadas utilizando micro seringas Hamilton e agulhas gauge 30, seguindo protocolo estabelecido por Lopes et al.<sup>90</sup> (2017). Um dos grupos recebeu os mesmos procedimentos com solução de PBS, utilizado como veículo do LPS. As injeções foram realizadas utilizando microseringas Hamilton e agulhas gauge 33, seguindo protocolo estabelecido por Lopes et al.<sup>90</sup> (2017). Um dos grupos receber os mesmos procedimentos com solução PBS, utilizado com veículo do LPS.

#### **4.7 Eutanásia, Coleta de Análise das Amostras**

Ao final do período experimental (60<sup>o</sup> dia) os animais foram submetidos a anestesia inalatória por meio de Isoflurano 1-4% em 100% de oxigênio. Realizou-se a eutanásia por destroncamento cervical<sup>91</sup>. Após certificar a morte do animal, foi realizada a retirada do fígado e dos maxilares. As hemimaxilas direita e esquerda foram separadas. O tecido gengival foi coletado da hemi-arcada esquerda, etiquetado e congelado a -80°C para avaliação do perfil de citocinas inflamatórias através de ensaio multiplex e atividade de mieloperoxidase. O restante das amostras foi fixado

em solução de paraformaldeído 4% durante 48 horas. Após a fixação, as peças foram lavadas em água corrente e armazenadas em álcool 70%. As hemimaxilas foram analisadas por microtomografia computadorizada e depois disso descalcificada com EDTA, pH 7,2 durante 4 semanas (com troca de solução 3x por semana). Posteriormente desidratadas em série crescente de álcoois e diafanizadas em xilol. Após a diafanização, as hemimaxilas e o fígado foram incluídas em parafina de forma padronizada para obtenção de cortes histológicos semi-seriados de 5µm de espessura, espaçado a 50 µm um do outro e montados em lâmina corados com hematoxilina e eosina (H/E), Tricrômico de Masson e Picro Sirius Red modificado. As hemimaxilas foram cortadas no sentido vestibulo-palatino. As análises foram realizadas tendo como base de normalidade os cortes obtidos do grupo veículo.

#### **4.8 Microtomografia Computadorizada (µCT)**

Após a eutanásia dos animais as hemimaxilas do lado direito foram removidas (n=7 para cada grupo), fixadas em formol a 10% durante 24 horas e depois foram transferidas para uma solução de álcool 70% e armazenadas em temperatura ambiente. As hemimaxilas foram escaneadas usando o sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan 1176, Aartselaar, Bélgica) no laboratório de Microtomografia in vivo da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. As hemimaxilas de cada animal foram posicionadas no equipamento e as imagens tomográficas foram obtidas. As amostras foram escaneadas com filtro de alumínio de 0,5mm. Todas as amostras foram escaneadas com cortes de 9 µm de espessura, com passo de rotação de 0.5 mm e frame averaging 3. As imagens tridimensionais foram reconstruídas utilizando um software de reconstrução (NRecon 1.6.9.8 – SkyScan N. V. Bélgica). Para a realização da análise linear foi utilizado um software bidimensional (Data Viewer 1.5.0 - SkyScan, Bélgica) que permitiu a visualização e a quantificação da perda óssea alveolar em um computador. Todos os cortes escaneados foram reorientados nos planos frontal, coronal e transaxial antes de cada análise para alinhar uniformemente a posição anatômica, ou seja, mesial-distal, vestibular-palatina, medial e lateral. Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.13.11.0) foram determinadas duas regiões de interesse (ROIs) utilizando as imagens 2D no sentido transaxial. Os ROIs foram: ROI 1 - Área que abrangeu o tecido ósseo; ROI 2 - Raízes do primeiro molar compreendida

entre o tecido ósseo vestibular/palatino. A extensão dos dois ROIs no sentido corono/apical compreendeu 50 cortes a partir do teto da furca. Essa foi a região onde foram realizadas as injeções de LPS. Depois da delimitação da região de interesse em imagens de 2D, a análise do volume ósseo foi realizada nas imagens em 3D, pela soma coletiva de todos os ROIs de uma sequência de fatias de imagens coronais, onde foi obtido o percentual de volume do tecido ósseo presente nas áreas de interesse previamente delimitadas. Diante da obtenção de valores numéricos, uma fórmula foi utilizada para obtenção de valores de tecido ósseo do redor das raízes:  $(ROI\ 1) - (ROI\ 2) = \text{volume de tecido ósseo ao redor raízes}$ . A fração do volume ósseo/volume total (BV/TV) dos ROIs foi obtida e a porcentagem resultante é diretamente proporcional a extensão da reabsorção óssea.

#### **4.9 Picro Sirius Red Modificado para Coloração de Eosinófilos**

O Sirius red F3B (500 mg, Dystar, Leverkusen) foi dissolvido em 50 ml de etanol absoluto, 45 ml de água bidestilada e 1 ml de NaOH a 1%. Foi adicionado NaCl (20%) até ocorrer uma ligeira precipitação. Posteriormente a solução foi filtrada. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados, corados com hematoxilina por 2 segundos, diferenciados em água corrente e tratados com etanol a 70% por 2 segundos. As seções foram coradas com solução de sirius red à temperatura ambiente por 24 h. Após a desidratação com concentrações crescentes de etanol, as seções foram montadas (Roti-Histokit, Roth, Karlsruhe). A coloração com hematoxilina eosina foi realizada de acordo com métodos padrão para avaliar todo o tecido<sup>92</sup>. A caracterização dos granulócitos eosinófilos foi realizada de acordo com sua morfologia típica.

#### **4.10 Análise Estereométrica**

Um total de 15 cortes foram avaliados por blocos de tecido. Cada um desses 15 cortes foi espaçado a 50  $\mu\text{m}$  um do outro, a fim de representar uma extensão de 750  $\mu\text{m}$ . Um único examinador, previamente treinado e calibrado, realizou a análise estereométrica através da técnica de contagem de pontos para avaliar a proporção das seguintes estruturas: células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, células mononucleares identificadas pela morfologia nuclear e no caso de eosinófilos pela

coloração de PicroSiriusRed modificado), fibroblastos (identificados como células fusiformes ou estreladas, núcleo ovóide ou alongado), matriz extracelular, estruturas vasculares, outras estruturas nos cortes corados com H&E e Picro Sirius Red. Uma área foi avaliada entre a área sub marginal e a área da crista óssea. Foi utilizada uma grade de malha quadrada composta de 50x50  $\mu\text{M}$  (5x5 quadrados de 10  $\mu\text{m}$  de lado) permitindo a análise de uma área de interesse de 2500 $\mu\text{M}^2$  posicionada com sua borda superior na base do epitélio juncional, representando à área submarginal. A borda lateral da grade sempre foi posicionada sobre a parte mais proeminente da superfície radicular da área e o tipo de estrutura encontrada na interseção das linhas da grade foi contado em um microscópio óptico (Diastar-Cambridge Instruments) sob ampliação de 200x (500 pontos). Foram utilizadas lâminas de pelo menos cinco animais diferentes em cada grupo experimental. Os resultados foram expressos como uma porcentagem da área total analisada. A avaliação complementar foi realizada, através da análise qualitativa dos cortes corados por Tricrômico de Masson.

#### **4.11 Expressão de Citocinas no Tecido Gengival (Multiplex)**

A concentração tecidual de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10 foi avaliada por ensaio multiplex (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida LaCTAD - Bio-Plex 200, Bio-Rad), parte da Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP. As amostras foram extraídas com RIPA Lysis Buffer reagente, 10x (Merck, Millipore) e quantificada pelo método BCA Protein Assay (Novagen, EMD Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. Para o ensaio do multiplex utilizou-se Milliplex Kit (EMD Millipore), que fornece análises de diferentes analitos em um mesmo poço da placa, e o ensaio completo foi realizado de acordo com os protocolos de cada kit e as instruções do fabricante. Os resultados do ensaio foram obtidos através da normalizados dividindo-se pelos respectivos valores de proteína alvo obtidos na quantificação pelo método de ensaio de proteína BCA.

#### **4.12 Atividade de Mieloperoxidase (MPO)**

A atividade de MPO foi realizada de acordo com Kim et al.<sup>93</sup> (2017); Xia and Zweier.<sup>94</sup> (1997) com modificações. Foi utilizado um n=7 por grupo e cada amostra de tecido gengival foi homogeneizada em tampão RIPA Lysis Buffer reagente, 10x

(Merck, Milipore) e quantificadas pelo método BCA Protein Assay (Novagen, EMD Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. Os homogenatos foram centrifugados a 1000rpm por 10 minutos a 4°C, e os sobrenadantes utilizados para as análises. O monitoramento da atividade peroxidásica de MPO foi realizado utilizando *o*-dianisidina. Adicionou-se tampão fosfato de potássio 40 mmol/L (pH 6,0), 10 µL de amostra, *o*-dianisidina 0,53 mmol/L e a reação foi iniciada com adição de peróxido de hidrogênio 0,15 mmol/L. A variação da absorbância foi monitorada espectrofotometricamente (PowerWave, BioTek) a 460 nm, durante 10 min. A atividade de MPO foi calculada a partir de uma curva padrão utilizando extrato bruto contendo MPO isolada de neutrófilo de sangue periférico humano, a qual foi quantificada pelo método do guaiacol<sup>95</sup>. Os resultados foram expressos em U/µg de proteína.

#### **4.13 Análises In Vitro**

Foram realizadas análises in vitro para avaliar a ação da hesperidina sob cultura de fibroblastos gengivais de camundongos (L929).

##### **4.13.1 Soluções testes**

A hesperidina foi purificada no laboratório do Dr. Jonh A. Manthey - USDA-ARS Horticultural Research Laboratory, Fort Pierce, Florida 34945, United States e gentilmente doada para a execução do presente projeto. O flavonoide cítrico foi oferecido nas doses diárias de 25mg/kg e 50mg/kg peso corporal em forma de pó. Cada flavonoide foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) numa solução stock de 1 M e armazenada a -20°C para posteriormente obter as concentrações desejadas. A concentração final de DMSO em cada concentração avaliada foi inferior a 0,1%<sup>96</sup>.

##### **4.13.2 Cultura celular**

Foram utilizadas linhagem celulares de fibroblastos L929 (ATCC CCL-1) que foram cultivadas e mantidas em meio de cultura Dulbecco's Medium (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultulab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina (100

UT/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) em atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. As substituições do meio de cultura foram realizadas a cada 2 dias e o crescimento celular foi avaliado a cada 24 horas. As células foram sub-cultivadas a partir da obtenção de sub-confluência, até que fosse obtido o número de células adequado para a realização do estudo.

#### **4.13.3 Citotoxicidade da hesperidina**

Fibroblastos L929 foram cultivados em placas de 96 poços (1x10<sup>4</sup> células/poço) (n=9) e mantidas em incubadora umidificada por 24 h para a formação de uma monocamada de células confluentes. Seguidamente, o meio de cultura foi aspirado e substituído por diferentes concentrações de hesperidina (1, 10, 50, 100, 200 e 300 µM) e DMSO 0,1%.

As placas foram incubadas por 48 horas e os efeitos citotóxicos foram avaliados utilizando o ensaio de MTT (metiltetrazolium). A análise colorimétrica do metiltetrazolium (ensaio de MTT) avalia o metabolismo celular por meio da atividade citotóxica da enzima desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células viáveis.

Cada poço dos grupos experimentais e controle receberam uma solução composta por 90 µL de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino e 10 µL de solução de MTT (Sigma, MO, EUA), a qual foi preparada por meio da dissolução de 5 mg do sal de MTT em 1 mL de PBS estéril. Após a incubação das células pelo período de 4 horas, a 37°C, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e, posteriormente, aplicado 100 µL de solução de isopropanol acidificado em HCL a 0.04 N, para solubilizar os cristais formados na presença de mitocôndrias ativas. A coloração produzida foi quantificada, considerando-se que as células com atividade mitocondrial normal foram coradas em violeta intenso. A viabilidade celular foi avaliada por espectrofotometria (570 nm) utilizando um espectrofotômetro (Synergy H1 Multi-Mode Reader - BioTek, EUA).

#### 4.13.4 Efeito da hesperidina sobre a proliferação celular

Para avaliação da proliferação celular, as células foram plaqueadas em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/poço em placas de 24 poços ( $n=9$ ). Após um período de incubação de 24 horas, o meio de cultura celular foi substituído por meios de cultura contendo hesperidina; 500, 600 e 700  $\mu\text{M}$  e os respectivos controles. As placas foram incubadas por 1, 3 e 7 dias a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  e a análise de proliferação celular foi realizada utilizando o ensaio Alamar Blue®.

O ensaio Alamar Blue® foi realizado para detectar a atividade metabólica celular pelo indicador fluorimétrico. Este ensaio permite a avaliação da viabilidade das células em cultura, sem prejuízo para as mesmas, permitindo análises pareadas, de acordo com os períodos estabelecidos. Para isso, foi utilizado o reagente Alamar Blue® (Invitrogen®, Life Technologies), o qual se baseia na incorporação do indicador de oxirredução que apresenta alteração de cor em resposta a redução química do meio de cultura em decorrência da respiração aeróbia. Assim, após cada período avaliado foi adicionado às células o equivalente a 10% do volume de cultura da solução de Alamar Blue® conjuntamente ao meio de cultura sem SFB (50  $\mu\text{L}$  de solução de Alamar Blue® em 450  $\mu\text{L}$  de meio de cultura). As células permaneceram em contato com a solução em incubadora em condições adequadas (37° C e 5% de  $\text{CO}_2$ ) por 4 h. Após este período, duas alíquotas de cada compartimento (100  $\mu\text{L}$ ) foram transferidas para uma placa de 96 poços e a fluorescência das amostras foi avaliada em espectrofotômetro (Synergy – H1 – Biotek Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 570 e 600 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em três momentos diferentes.

#### 4.14 Análise Estatística dos Resultados

Os dados obtidos foram analisados pelo software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Foram avaliados comparativamente os resultados obtidos para os diferentes grupos, para todos os parâmetros analisados. Uma vez satisfeitos os critérios de homocedasticidade e distribuição normal, foi utilizado o teste one-way ANOVA e o teste de Tukey foi utilizado como pós-teste para comparações múltiplas entre os grupos. Todos os testes neste estudo foram aplicados com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Os dados da citotoxicidade e proliferação

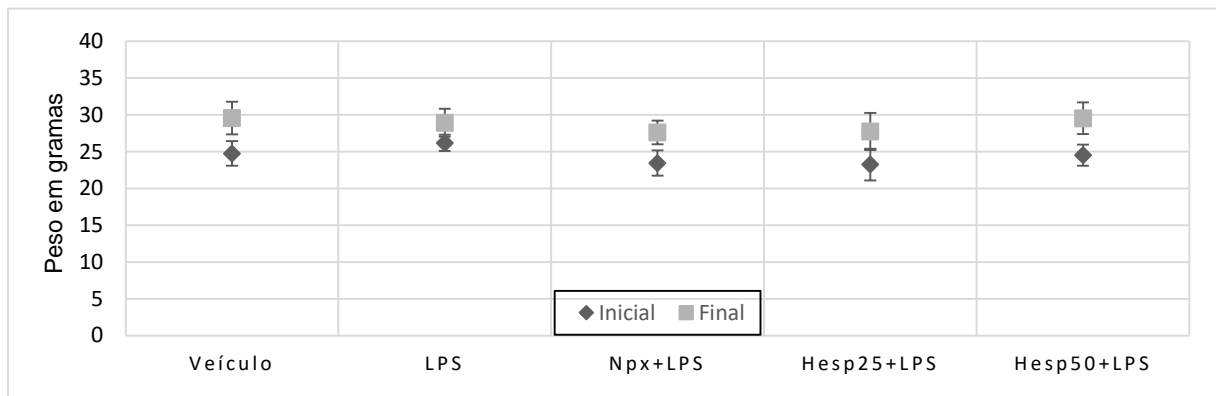
celular foram transformados em porcentagem considerando ao grupo controle como 100%. A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e os dados normalmente distribuídos foram analisados utilizando ANOVA one-way e ANOVA two-way. Todos os testes estatísticos foram considerados em nível de significância com  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 A Adição dos Suplementos na Ração Padrão não Modificou a Média do Peso Corporal

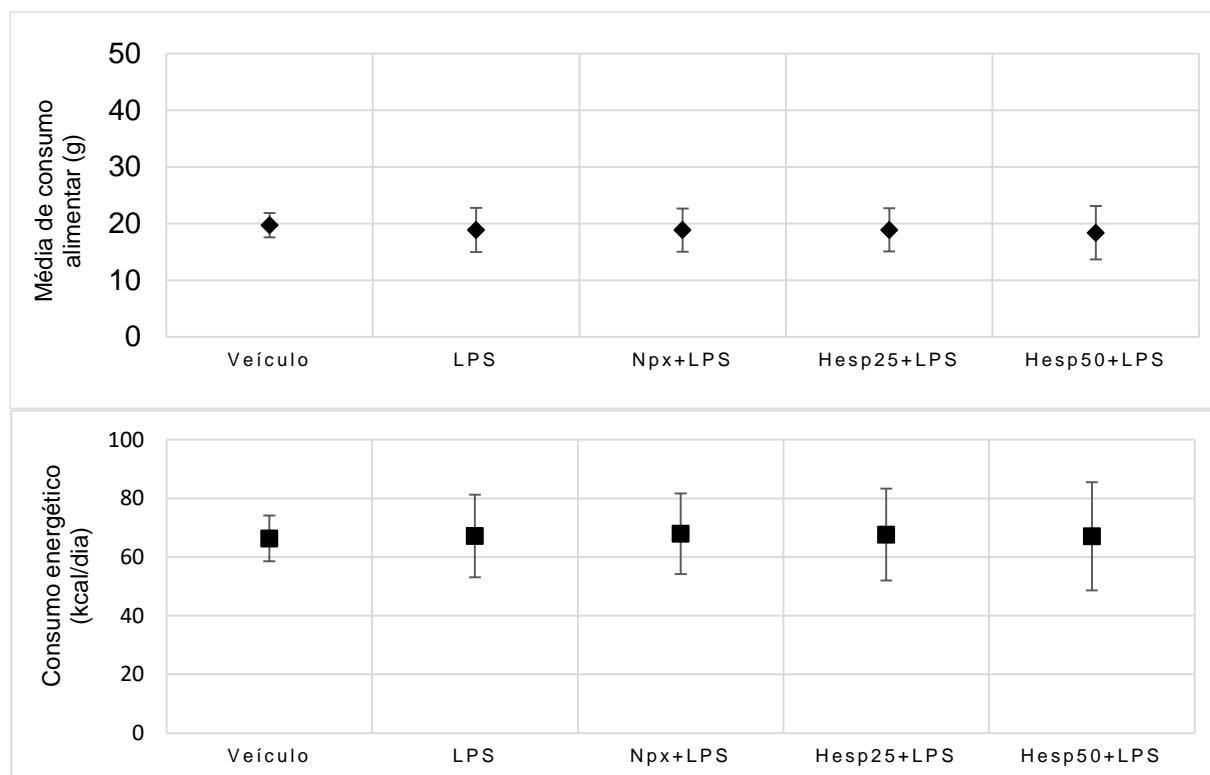
O ganho de peso corporal, os consumos alimentares e energéticos foram mensurados de acordo com o consumo diário ao longo do período experimental. A partir da quantidade de ração consumida foi calculada a ingestão energética, baseada na composição das dietas. Todos os grupos experimentais consumiram em média 19,08g de ração e 67,72 kcal de energia por dia durante todo o período experimental. Pela avaliação do consumo alimentar total do período experimental foi observado que a quantidade média de suplementos ingeridos por dia foi de 100% do esperado. Ao final do experimento, os animais que consumiram ração suplementada com flavonoides cítricos ou com naproxeno apresentaram ganho de peso semelhante quando comparado ao grupo veículo ( $p>0.05$ ) (Figura 2 e 3).

**Figura 2** - Peso dos animais por grupo em gramas



Evolução do peso corporal de camundongos alimentados durante 60 dias com dieta padrão, dieta suplementada com com 10 mg/kg de peso corporal/dia de naproxeno ou dieta suplementada com 25mg/kg ou 50 mg/kg peso corporal/dia de hesperidina. Administração do LPS ou veículo não alterou o ganho de peso dos animais. Os valores estão apresentados em gramas e expressos nas médias  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 3** - Média do consumo alimentar e consumo energético diário

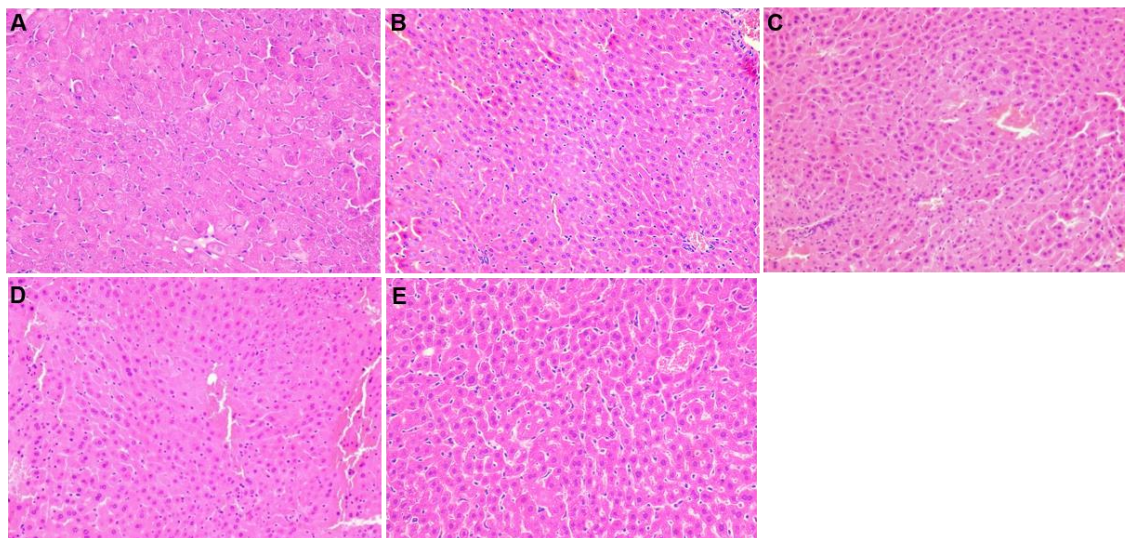
Consumo alimentar e energético de camundongos alimentados com dieta padrão e suplementadas com hesperidina na concentração de 25 mg/kg e 50 mg/kg e naproxeno 10 mg/kg. Administração de LPS ou veículo não alterou o padrão alimentar dos animais. Valores foram expressos em gramas para consumo alimentar diário e quilocaloria para consumo energético (média  $\pm$  desvio padrão).

Fonte: Elaboração própria.

### 5.2 A Suplementação Alimentar com hesperidina e Naproxeno não Induziu Alterações Hepáticas

Resultados de análise microscópica mostraram que os fígados dos camundongos do grupo veículo, LPS e suplementados com hesperidina ou naproxeno exibiam aspecto de normalidade. Na porção mais externa observava-se delgada cápsula de tecido conjuntivo, a partir da qual, estendiam septos que subdividiam a glândula em lóbulos. Em conjunção e em continuação aos septos de tecido conjuntivo observava-se artéria, veia, vasos linfáticos e ductos biliares compondo classicamente o espaço porta. A veia era mais calibrosa que a artéria e sua parede era mais delgada em comparação com o tamanho de sua luz. Em todas as regiões, os hepatócitos se apresentavam com aspectos de normalidade, traduzindo-se por serem globosos, com núcleo centralizado, basofílico e com nucléolos aparentes. O citoplasma era eosinofílico sem alterações aparentes. Os espaços centro lobulares estavam com aspecto de normalidade (Figura 4).

**Figura 4 - Cortes histológicos do tecido hepático**

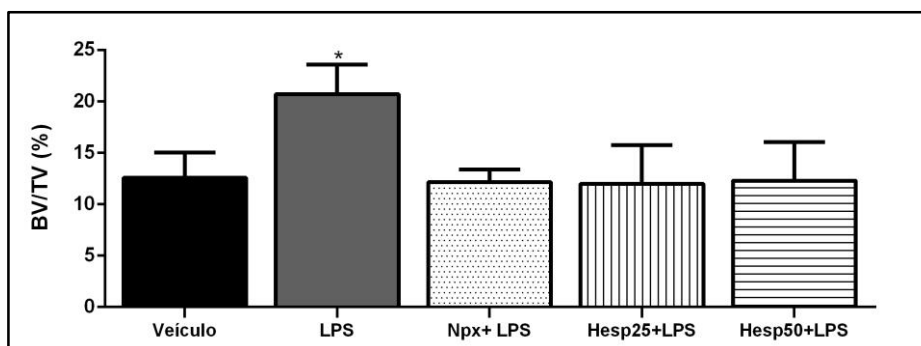


Cortes transversais do fígado de camundongos tratados com: (A) Veículo, (B) LPS, (C) Naproxeno, (D) 25mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina, (E) 50mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina. Não se observou alterações estruturais e morfológicas dos tecidos dos grupos experimentais. (H.E. 20x).

Fonte: Elaboração própria.

### **5.3 A Suplementação Alimentar com Hesperidina Inibiu Perda Óssea Induzida pelo LPS de *E. coli***

A porcentagem de tecido ósseo (BV/TV, %) na região palatina do primeiro molar direito foi determinada por meio de microtomografia computadorizada (uCT). Observou-se que a administração de LPS induziu aproximadamente 20% de perda óssea quando comparado aos demais grupos ( $p < 0.05$ ). Independentemente da concentração utilizada de hesperidina preveniu em média 9,37% da perda óssea num quadro de periodontite experimental induzida pela administração de LPS de *E.coli* ( $p < 0.05$ ). Os valores obtidos dos grupos tratados com hesperidina foram semelhantes aos observados no grupo que recebeu 10mg/kg de peso corporal/dia de naproxeno. Tais valores foram semelhantes ao grupo veículo ( $p > 0.05$ ).

**Figura 5** - Ação da hesperidina sobre a perda óssea

Impacto da suplementação de 25 e 50 mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina ou 10mg/kg/peso corporal/dia de naproxeno sobre a porcentagem de perda óssea palatina (BV/TV, %), induzida com injeções de 3µL da solução contendo 10mg/ml de LPS de *E. coli*. \*p<0.05 em relação aos demais grupos. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA e teste t de tukey ao nível de 5%.

Fonte: Elaboração própria.

#### 5.4 Aspectos Microscópicos

Nos camundongos controle a gengiva da face lingual do primeiro molar superior e a mucosa palatina apresentavam-se com características de normalidade. Estavam recobertos por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com interface entre o epitélio gengival oral, palatino e o conjuntivo subjacente composta por cristas epiteliais para o interior do conjuntivo denso. O epitélio sulcular era queratinizado, delgado penetrando lateralmente em direção apical até o epitélio juncional. O epitélio juncional era formado por 2 ou 3 camadas de células epiteliais achatadas, frouxamente arranjadas, não queratinizados, dispostas paralelamente à superfície do dente. O tecido conjuntivo tanto gengival quanto o palatino mostrava densos feixes de fibras colágenas entremeadas por células fusiformes e estruturas vasculares de diversos calibres. Em continuidade ao tecido gengival observava-se o osso alveolar composto por inúmeros osteócitos (Figuras 6). O tecido ósseo apresentava-se mineralizado dentro da normalidade e próximo à sua superfície observavam-se células redondas e globosas com características de osteoblastos. Os cortes do primeiro molar superior direito dos camundongos submetidos às injeções LPS de *E. coli* mostraram tecido epitelial gengival e da mucosa palatina hiperplásicos, com projeções epiteliais menos pronunciadas para o conjuntivo quando comparado ao grupo veículo. O tecido conjuntivo gengival e palatino mostravam-se mais frouxos com espaçamento entre os feixes de fibras colágenas que estavam entremeadas por células inflamatórias e maior número de estruturas vasculares de diversos calibres. Na região palatina as

alterações do tecido conjuntivo se limitavam adjacentes ao tecido ósseo. Em continuidade observava-se tecido ósseo composto por inúmeros osteócitos e áreas de reabsorção principalmente na região palatina. Os camundongos que receberam dieta enriquecida com hesperidina ou naproxeno não apresentavam hiperplasias exuberantes do epitélio quando comparado ao grupo tratado com LPS. Observou-se que houve diminuição do processo inflamatório e conseqüentemente de reabsorção óssea. O tecido conjuntivo apresentava-se mais fibroso mesmo com a persistência de células inflamatórias e vasos sanguíneos dilatados que se apresentavam em menor quantidade.

## **5.5 Análise Estereométrica**

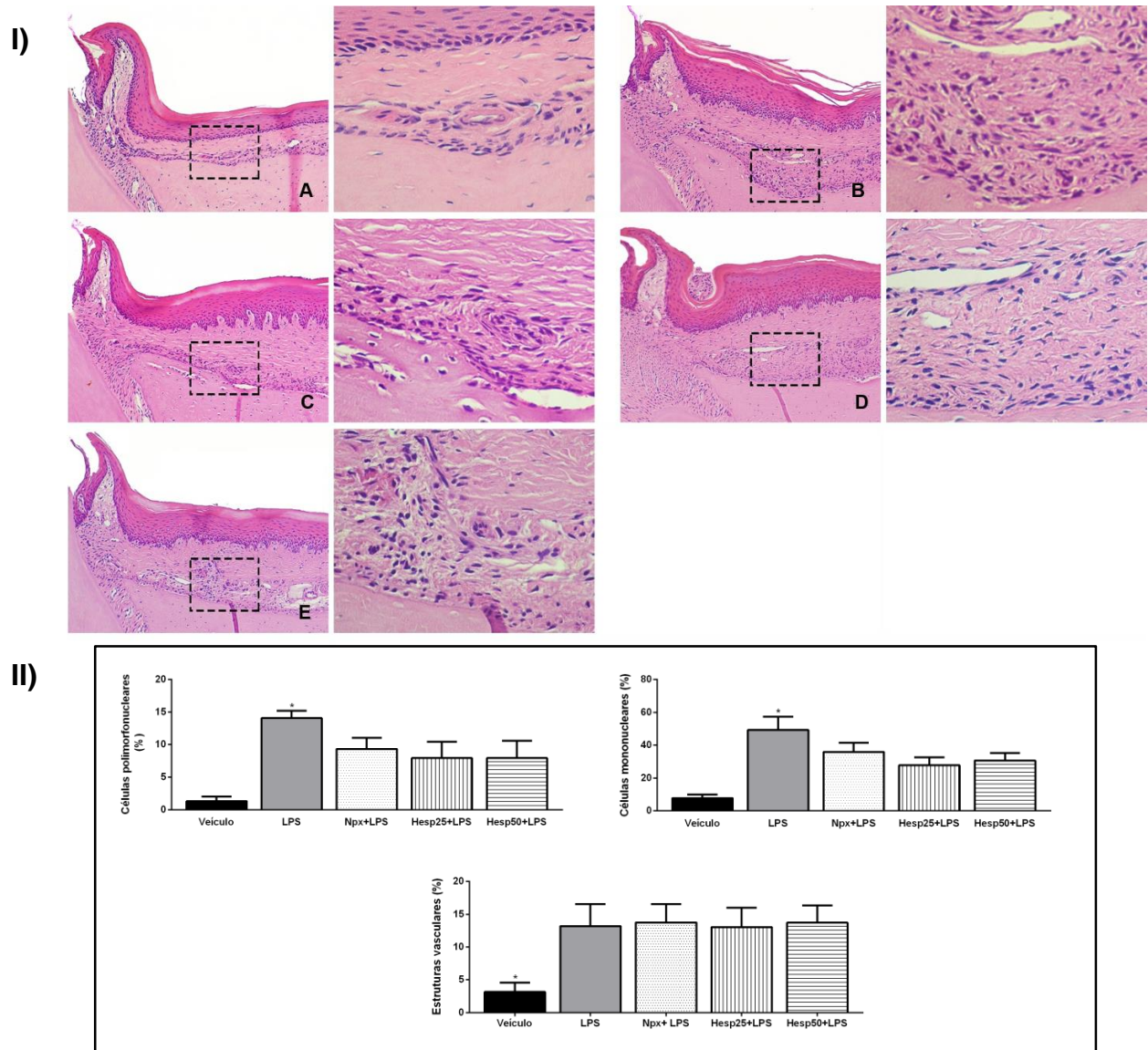
### **5.5.1 Suplementação de hesperidina ou naproxeno na ração padrão diminuiu a quantidade de figuras que participam do processo inflamatório e favoreceu a formação de matriz extracelular**

A figura 6,7 e 8 mostra os resultados da análise estereométrica para avaliação da porcentagem de células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e mononucleares e outras estruturas da mucosa palatina da região de primeiro molar superior direito dos camundongos que receberam injeções de LPS ou veículo e tratados ou não com dieta enriquecida com hesperidina.

Quando comparado ao grupo veículo correspondente a porcentagem (%) de células inflamatórias foram ~54% maiores no grupo que recebeu injeções de LPS, enquanto a porcentagem de fibroblastos e feixes de fibras colágenas foram ~14,66% menores ( $p < 0.05$ ).

Observou-se queda de ~23% de células inflamatórias quando os camundongos receberam dieta enriquecida com hesperidina ou naproxeno ( $p < 0.05$ ). E aumento de 17,91% de fibroblastos e feixes de fibras de colágeno quando os camundongos receberam dieta enriquecida com hesperidina ou naproxeno ( $p < 0.05$ ).

**Figura 6 - Análise Estereométrica e aspectos microscópicos com coloração em H&E**

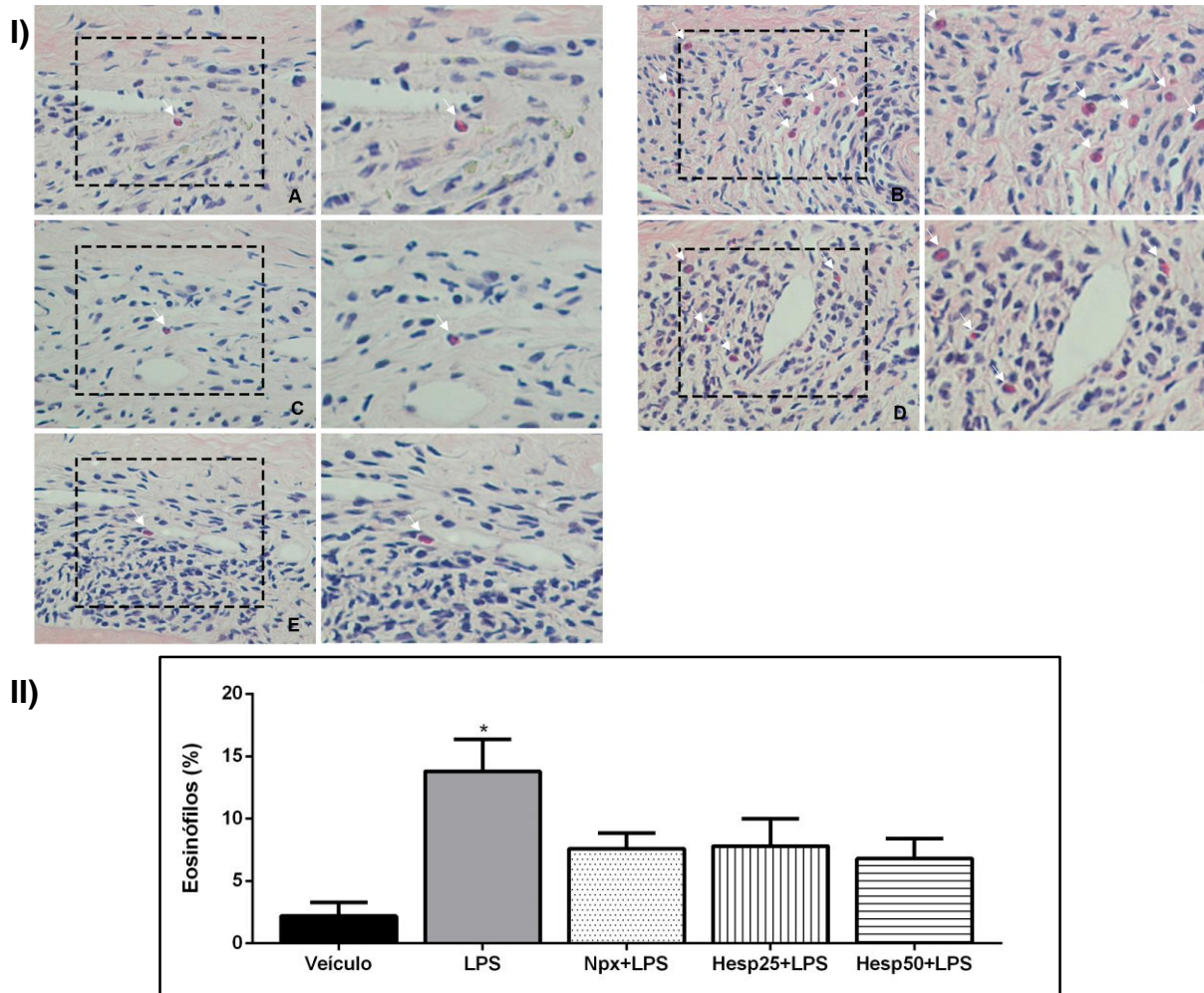


**(I)** Cortes transversais de maxila da região de primeiro molar superior direito de camundongos tratados com: (A) Veículo, (B) LPS, (C) naproxeno, (D) 25mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina, (E) 50mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina. Observa-se presença de intenso infiltrado inflamatório no grupo tratado com LPS e hesperidina 25mg/kg de peso corporal/dia quando comparado ao veículo. Observou-se que o tratamento com naproxeno e hesperidina atenuaram o processo inflamatório em relação ao grupo LPS (H.E.10x e 40x).

**II)** As médias das densidades volumétricas (% ,  $\pm$  desvio padrão) de células polimorfonucleares e mononucleares diminuíram quando os animais foram tratados com hesperidina quando comparado ao grupo LPS. Não se observou alterações na porcentagem de estruturas vasculares. \* $p < 0,05$  em relação aos demais grupos. Análise estatística foi feita utilizando ANOVA e teste t de tukey ao nível de 5%.

Fonte: Elaboração própria.

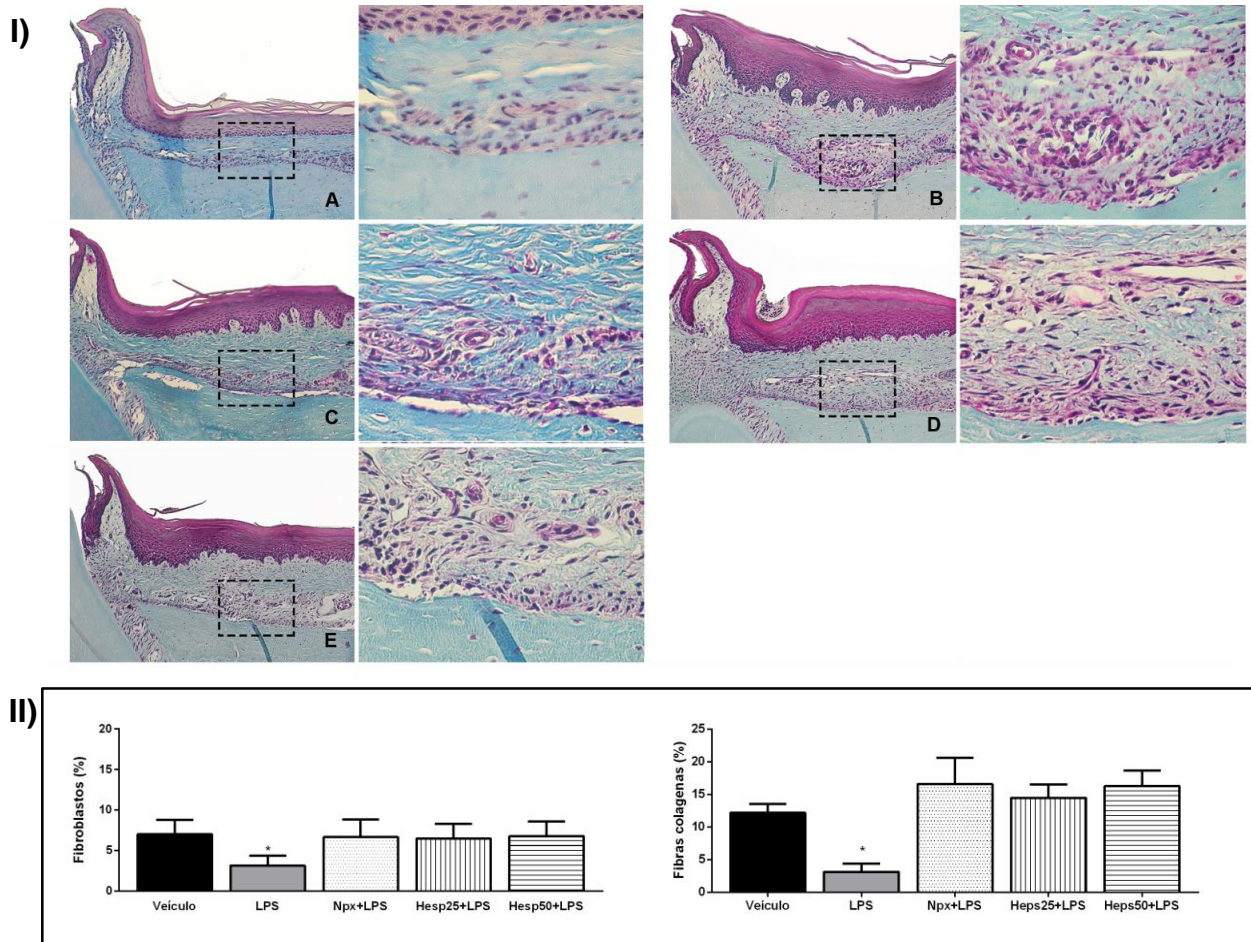
**Figura 7 - Análise Estereométrica e aspectos microscópicos corados com Picrosirius Red modificado**



**I)** Cortes transversais de maxila da região de primeiro molar superior direito de camundongos tratados com: (A) Veículo, (B) LPS, (C) naproxeno, (D) 25mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina, (E) 50mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina. Observa-se presença de infiltrado de eosinófilos no grupo tratado com LPS quando comparado ao grupo veículo. Observou-se que os tratamentos com naproxeno e 25 e 50 mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina atenuaram o infiltrado eosinofílico em relação ao grupo LPS (Picro Sirius Red modificado 40x e 60x). **II)** As médias das densidades volumétricas (% ,  $\pm$  desvio padrão) de eosinófilo diminuíram quando os animais foram tratados com naproxeno ou hesperidina quando comparado ao grupo LPS. \* $p < 0,05$  em relação aos demais grupos. Análise estatística foi feita utilizando ANOVA e teste t de tukey ao nível de 5%.

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 8** - Análise Estereométrica e aspectos microscópicos corados com Tricrômico de masson



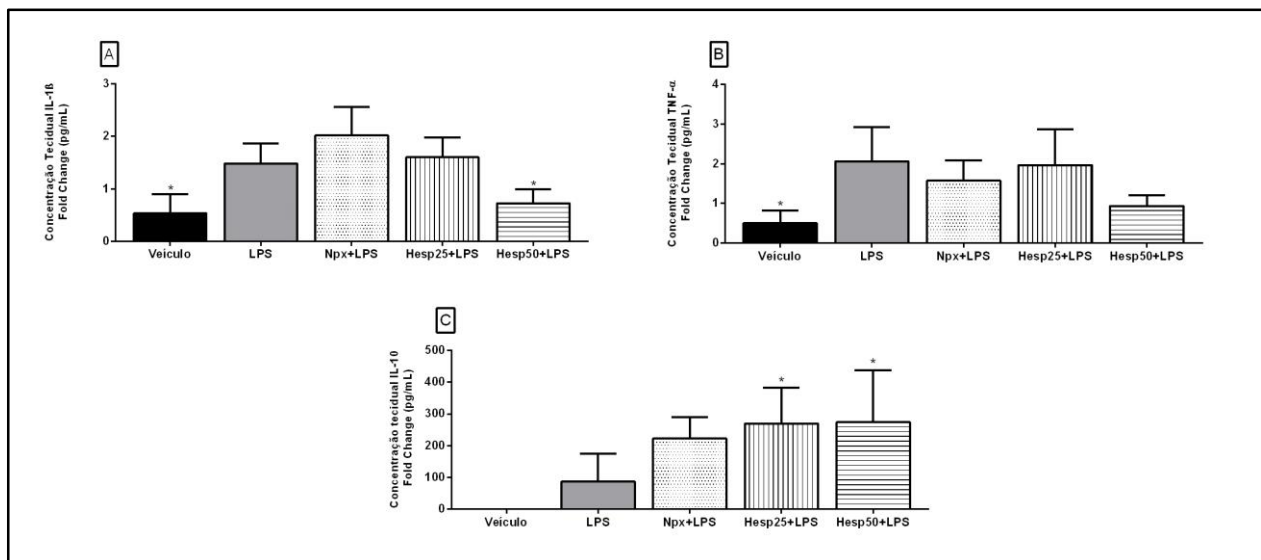
(I) Cortes transversais de maxila da região de primeiro molar superior direito de camundongos tratados com: (A) Veículo, (B) LPS, (C) naproxeno, (D) 25mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina, (E) 50mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina. Observa-se diminuição de matriz extracelular que foi substituída por processo inflamatório no grupo tratado com LPS quando comparado ao grupo veículo. Os tratamentos com naproxeno e 25 e 50 mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina atenuaram o processo inflamatório e consequentemente mantiveram matriz extracelular quando comparados ao grupo LPS (Tricrômico de masson 10x e 40x). (II) As médias das densidades volumétricas (% ,  $\pm$  desvio padrão) de fibroblastos e feixes de fibras colágenas mantiveram semelhantes ao grupo veículo quando os animais foram tratados com naproxeno ou hesperidina. \* $p < 0,05$  em relação aos demais grupos. Fonte: Elaboração própria.

### 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

Foram analisadas as concentrações de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 na mucosa palatina adjacente ao primeiro molar superior, para avaliar se, a suplementação com hesperidina atenuou a expressão desses analitos. Os dados mostraram que a suplementação com 50mg/kg de peso corporal de hesperidina induziu 51,08% de queda da expressão de IL-1 $\beta$  comparado ao grupo LPS ( $p < 0.05$ ). Não se observou

alteração desse analito quando houve suplementação com 25mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina ( $p>0.05\%$ ). Surpreendentemente verificou-se que a suplementação com naproxeno induziu um aumento de ~18% na expressão de IL-1 $\beta$ , quando comparado ao grupo LPS (Figura 9). Os grupos suplementados com 25mg/kg ou 50mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina não alteraram a expressão de TNF- $\alpha$  quando comparadas ao grupo LPS ( $p>0.05\%$ ). Curiosamente, esses resultados foram semelhantes com relação ao grupo naproxeno ( $p>0.05\%$ ), entretanto observou-se maior responsividade na suplementação com 50mg/kg de peso corporal/dia quando comparado a menor dosagem de hesperidina ( $p<0.05\%$ ). Observou-se que a suplementação de 25mg/kg ou 50mg/kg de peso corporal/dia de hesperidina aumentou a expressão de IL-10 quando comparados ao grupo LPS ( $p<0.05$ ) que por sua vez, os valores foram semelhantes a suplementação com naproxeno ( $p>0.05$ ) (Figura 9).

**Figura 9** - Concentração tecidual de citocinas inflamatórias



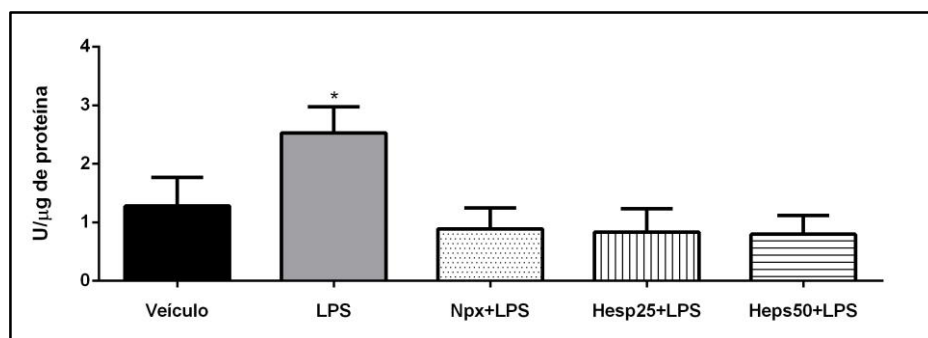
Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão sendo \* $p < 0.05$  em relação ao LPS. Análise estatística foi feita utilizando ANOVA e teste t de tukey ao nível de 5%.

Fonte: Elaboração própria.

### 5.7 Houve Queda da Atividade de MPO Quando os Animais Receberam Dieta Enriquecida com Flavonoides Cítricos

Após a injeção de LPS na mucosa palatina a atividade da mieloperoxidase (MPO) aumentou significativamente no grupo LPS ( $p < 0.05$ ). Independentemente das doses, a ingestão de hesperidina reduziu ~67,5% ( $p < 0.05$ ). Os valores foram semelhantes aos obtidos no grupo que ingeriu naproxeno quando comparado ao grupo LPS ( $p > 0.05$ ) (Figura 10).

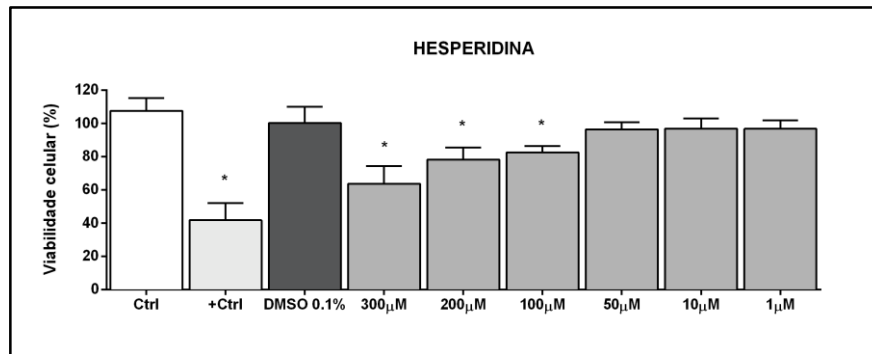
**Figura 10** - Atividade de mieloperoxidase



Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0.05$  em relação aos demais grupos. Análise estatística foi feita utilizando ANOVA e teste de tukey ao nível de 5%.  
Fonte: Elaboração própria.

### 5.8 Citotoxicidade da Hesperidina

O efeito citotóxico da hesperidina está representado na Figura 11. A porcentagem da viabilidade celular de fibroblastos L929 após 48 horas com diferentes concentrações de hesperidina testada mostrou uma diminuição significativa nas concentrações 300 $\mu$ M, 200 $\mu$ M e 100 $\mu$ M. Entretanto, as concentrações menores de hesperidina (50 $\mu$ M, 10 $\mu$ M e 1 $\mu$ M) não mostraram efeitos citotóxicos ( $p > 0.05$ ).

**Figura 11 - Efeitos citotóxicos da hesperidina**

Viabilidade de fibroblastos L929 (%) após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de hesperidina. \*Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

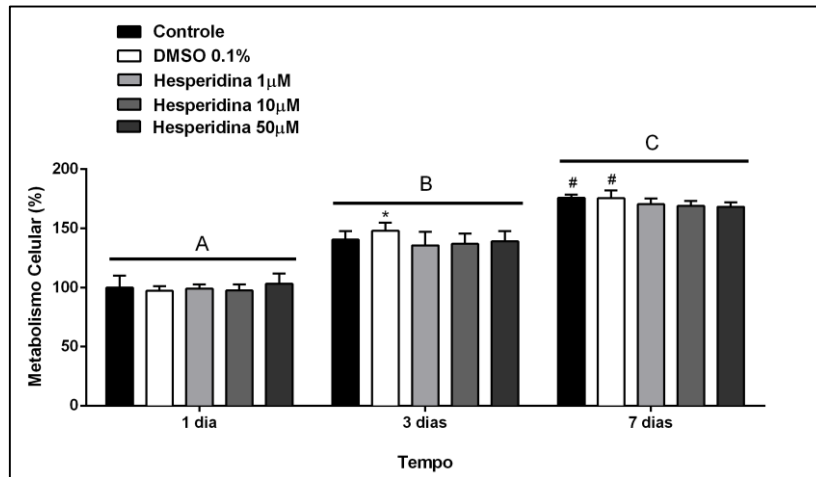
Fonte: Elaboração própria.

### 5.9 Atividade Metabólica de Fibroblastos L929

As concentrações utilizadas para avaliação da atividade metabólica de fibroblastos foram estabelecidas após a determinação do experimento de citotoxicidade celular. A Figura 12 mostra o aumento significativo da atividade metabólica em todos os grupos ao longo dos diferentes períodos avaliados. Pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos submetidos ao tratamento com hesperidina, quando comparados ao grupo controle nos períodos de 1 e 3 dias, independente das concentrações ( $p > 0.05$ ).

De modo geral, pode-se observar que a hesperidina não estimulou o aumento do metabolismo celular ( $p > 0.05$ ). Entretanto, foi observada uma redução significativa no metabolismo celular no grupo tratado com hesperidina 50µM quando comparado ao grupo controle no período de 7 dias ( $p < 0.05$ ).

**Figura 12** - Atividade metabólica celular após tratamento com hesperidina



Média e desvio padrão dos valores do metabolismo celular (%) após 1, 3 e 7 dias de tratamento com hesperidina 1, 10 e 50  $\mu\text{M}$ . \*Diferença estatística em relação aos demais tratamentos no período de 3 dias. #Diferença estatística em relação ao tratamento com hesperidina 50  $\mu\text{M}$  em 7 dias. Diferenças estatísticas estão representadas por letras diferentes em períodos diferentes (ANOVA two-way,  $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaboração própria.

## 6 DISCUSSÃO

A compreensão dos processos imuno-inflamatórios das doenças em geral, incluindo as doenças inflamatórias crônicas, são importantes por várias razões, tanto no impacto causado na compreensão da patogênese das doenças, quanto no desenvolvimento de novas ações terapêuticas<sup>97</sup>. De modo geral, são os inúmeros estudos da patogênese das doenças, suportados por técnicas de biologia molecular, que levam à descoberta de novas moléculas biologicamente ativas que, por sua vez, auxiliam no desenvolvimento de produtos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins diagnósticos<sup>98</sup>. O desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias ou mesmo mudanças de paradigmas comportamentais, como por exemplo, mudança no consumo de dietas, que sabidamente participam no desenvolvimento de doenças, incluindo as inflamatórias, proporcionam que os procedimentos clínicos alcancem altas taxas de sucesso<sup>50</sup>. O cuidado metodológico dispensado com a dieta, suplementos e com os animais, é especialmente raro em experimentos similares, e por isso deve ser positivamente reforçado e altamente aprovado. Sem dúvida este procedimento metodológico propiciou uma qualidade superior dos dados experimentais, como verificado nos resultados obtidos. Estratégias nas mudanças nos padrões alimentares incluindo a suplementação de flavonoides podem otimizar o processo de reparo ou amenizar os efeitos secundários e não desejáveis do processo inflamatório, como observado no presente trabalho<sup>9,99</sup>.

No estágio atual do nosso conhecimento sobre o uso de flavononas cítricas especialmente hesperidina, eriocitrina e eriodictiol, não existem relatos que mostrem o potencial terapêutico desses produtos no processo inflamatório induzido por injeções de LPS de *Escherichia coli* no palato de camundongos. Está bem estabelecido que o LPS de *Escherichia coli* é um ligante dos receptores *Toll-Like-4* e um potente ativador de células do sistema imune e seus produtos biologicamente ativos com fatores pró e anti-inflamatórios que participam ativamente de várias doenças incluindo as periodontais, que fazem parte do protocolo experimental do presente trabalho<sup>100</sup>. O protocolo experimental escolhido é repetidamente utilizado, sobre o qual parece não existir qualquer dúvida sobre o seu potencial na indução de doença periodontal experimental<sup>101-103</sup>. Embora o modelo experimental utilizando ligadura (adaptação de um fio de algodão ou nylon ao redor do dente induzindo maior acúmulo de placa), seja considerado por alguns autores o mais semelhante àquele

encontrado na doença periodontal humana, apresenta algumas desvantagens que incluem, trauma tecidual causado durante a inserção do fio e frequente reposicionamento da ligadura que se não realizado não induzirá o processo inflamatório desejado<sup>104,105</sup>.

Verificou-se que todos os camundongos que receberam injeções de LPS e suplementação de flavononas cítricas ou naproxeno na dieta mostraram aumento de peso corporal dentro da normalidade. Em geral, mudanças no padrão alimentar podem influenciar no comportamento e alterações no peso corporal, o que não foi observado no presente trabalho. Os resultados encontrados no nosso estudo confirmaram os achados de He et al.<sup>14</sup> (2019), Kwon et al.<sup>76</sup> (2019), Ferreira et al.<sup>50</sup> (2016) e que descreveram que a adição de flavonoides, independentemente da concentração utilizada na ração não alteram as calorias ingeridas, o que sugere que os compostos não modificam o sabor da ração, alteram o apetite dos animais influenciando, por exemplo, o metabolismo hepático<sup>62</sup>. As concentrações de 25 ou 50 mg/kg de peso corporal/dia das flavononas, foram baseadas em trabalhos anteriores, os quais demonstraram que ambas as concentrações mostraram-se bem toleradas e ativas em variados protocolos experimentais<sup>14,79-81</sup>. Eventualmente para se estabelecer concentrações efetivas para cada protocolo experimental utilizado, o monitoramento sérico é importante e pode ser feito através de radioimunoensaio ou cromatografia líquida de alta eficiência<sup>106,107</sup>. Em animais de laboratório os flavonoides cítricos podem ser administrados via gavagem ou adicionado na dieta<sup>1,50</sup>. Alguns autores relatam que administração via gavagem pode induzir estresse produzindo manifestações clínicas ou subclínicas que poderiam interferir no processo imuno-inflamatório ou outros efeitos que não aqueles que eram objetivos do trabalho<sup>108-110</sup>. O cuidado metodológico dispensado com a dieta, suplementos e com os animais, é especialmente raro em experimentos similares, e por isso deve ser positivamente reforçado. Sem dúvida este procedimento metodológico propiciou uma qualidade superior dos dados experimentais, como verificado nos resultados obtidos.

Não observamos alterações na morfologia hepática que pudessem aventar alterações morfofuncionais com repercussões clínicas em nenhuma das substâncias utilizadas no presente experimento. Sabe-se que o fígado é uma das sedes mais importantes de lesões provocadas por drogas, devido à sua intensa participação em reações de biotransformação de substâncias químicas do organismo<sup>75,111</sup>. As repercussões hepáticas associadas ao uso de drogas e outras substâncias abrangem

espectro que inclui desde alterações bioquímicas e estruturais adaptativas até lesões morfológicas com danos muitas vezes irreversíveis do metabolismo ou estrutura celular. Recentemente verificaram que as flavononas cítricas, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol, reduzem os danos causados pela obesidade e estado de inflamação crônica de baixo grau induzida pela dieta hiperlipídica. Foram detectados diminuição da esteatose hepática e danos hepáticos causados pelo consumo de dieta hiperlipídica mostrando que a ingestão de flavononas podem ser benéficas para a saúde de forma geral incluindo a saúde hepática<sup>50</sup>.

O uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidais, incluindo naproxeno, são efetivos agentes anti-inflamatórios e estão entre a classe mais comum de medicamentos utilizados tanto em protocolos experimentais quanto no tratamento de diversas doenças<sup>112,113</sup>. Sabe-se que o tratamento com naproxeno reduz a inflamação periodontal e perda óssea alveolar, entretanto, deve se levar em consideração que o uso crônico dessa droga pode induzir efeitos secundários e não desejáveis como por exemplo alterações das funções renais, cardiovasculares e gastrintestinais<sup>84,114,115</sup>. Está bem estabelecido que agem na inibição das COX 1 e 2 que estão envolvidas durante a ativação da cascata do ácido araquidônico<sup>116</sup>. Devemos salientar que seus benefícios excedem em muito os efeitos indesejáveis descritos acima, pois o objetivo foi promover ação anti-inflamatória e ao mesmo tempo controle para os compostos utilizados.

A técnica estereométrica utilizada nas análises dos cortes histopatológicos dos palatos dos camundongos é clássica em investigação científica, que contribui para melhor entendimento dos processos patológicos. Muitas vezes, a análise qualitativa de um processo patológico não permite extrair conclusões a respeito de elementos numéricos, que só podem ser obtidos mediante estudos quantitativos<sup>117</sup>. Com auxílio desta técnica confirmou-se relação positiva entre injeções de LPS de *E. coli* e aumento da densidade volumétrica de leucócitos, diminuição de fibroblastos e feixes de fibras de colágeno, descortinando clássica reação inflamatória amplamente descrita<sup>90,118,119</sup>. Células polimorfonucleares como os neutrófilos e os eosinófilos participam do processo inflamatório liberando mediadores solúveis que, por sua vez de modo coordenado, mas ainda não completamente compreendidos regulam ou exacerbam a reação. Os grânulos dos neutrófilos e eosinófilos contém uma variedade de produtos biologicamente ativos entre eles enzimas, peptídeos, e proteínas, como o MPO e EPO respectivamente. Tais substâncias liberadas podem rapidamente gerar espécies

reativas de oxigênio com objetivo de destruir e digerir organismos ou corpos estranhos, mas também podem ocasionar danos aos tecidos do hospedeiro<sup>120</sup>. A participação de eosinófilos na doença periodontal ainda não é bem elucidada, no entanto sabe-se que essas células participam da degradação de colágeno tipo I e III pela liberação de proteases,<sup>121–124</sup>. Por outro lado, os eosinófilos secretam IL-5, que de modo autócrino, promovem sua ativação e manutenção no sítio inflamatório, ocasionando entre outras ações o retardo da síntese de matriz extracelular<sup>124,125</sup>.

Verificou-se no presente trabalho através da estereometria queda da densidade volumétrica de feixes de fibras colágenas que poderia entre outras teorias ser explicada pela ação dos produtos secretados por neutrófilos e eosinófilos que são conhecidamente ativos no processo inflamatório. Deve-se levar em consideração que além do aumento de porcentagem de polimorfonucleares observou-se também aumento da porcentagem de leucócitos mononucleares como por exemplo macrófagos que quando ativados por uma variedade de estímulos, incluindo LPS de *E. coli*, utilizado no presente estudo que ao se ligar ao TLR-4 estimulam a liberação de uma série de citocinas pró e anti-inflamatórias que podem sensibilizar linfócitos e polimorfonucleares<sup>126,127</sup>.

Através de ensaio da atividade de mieloperoxidase e ensaio multiplex confirmou-se o aumento de MPO, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e diminuição de IL-10 nos grupos que receberam injeções de LPS de *E. coli*, previamente observado Zhang et al.<sup>128</sup> (2016), Guimarães et al.<sup>129</sup> (2011); Molon et al.<sup>130</sup> (2014), Lopes et al.<sup>90</sup> (2017) respectivamente. Está bem estabelecido que a inflamação é normalmente controlada por um balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias como por exemplo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 respectivamente<sup>131</sup>. A IL-10 é uma citocina pleiotrópica também conhecida como fator inibidor da síntese de citocinas que inibe a produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), além de inibir a apresentação de antígenos e a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, G-CSF e GM-CSF pelos macrófagos favorecendo, desta maneira a ação anti-inflamatória<sup>132–137</sup>.

Todas as avaliações microscópicas mostraram que adjacente ao processo inflamatório havia reabsorção óssea na região de palato dos primeiros molares superiores como verificado anteriormente por Souza et al.<sup>118</sup> (2019), Aquino et al.<sup>101</sup> (2009) e confirmado pela análise de microtomografia computadorizada  $\mu$ CT. Sabe-se que de forma geral, o LPS de *E. Coli* liga-se e ativa TLR-4, que é expresso na maioria das células, desencadeando a via de sinalização NF-kB que conduz a transcrição de

diversos genes incluindo àqueles envolvidos na síntese de citocinas, como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, M-CSF e PGE<sub>2</sub>. Quando determinadas citocinas, como por exemplo, IL1, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> são liberadas, ativam a diferenciação de osteoclastos e inativam osteoblastos, desequilibrando a remodelação óssea resultando na reabsorção<sup>138-140</sup>. Por outro lado, sabe-se que espécies reativas de oxigênio produzido por osteoclastos estão envolvidos na reabsorção óssea<sup>141,142</sup>. No presente trabalho não avaliamos ou quantificamos nenhum marcador espécies reativas de oxigênio como MDA, TBARS, 8-epiPGF<sub>2</sub> $\alpha$ , Etano e Pentano, LDL-ox, Derivados da oxidação de proteínas Carbonilos e 3-Nitrotirosina.

A suplementação com flavononas resultou em consistente redução da reabsorção óssea, ilustrada nos resultados da análise por microtomografia computadorizada. O mecanismo molecular da ação dos flavonoides nas células ósseas ainda não está bem elucidado, entretanto sugere-se que estão relacionados principalmente a redução da reabsorção óssea por osteoclastos e associado ao aumento da formação óssea por osteoblastos<sup>31,39,40,143</sup> através da modulação da produção de mediadores inflamatórios<sup>143</sup>. Além disso, sugere-se que o aumento da disponibilidade de antioxidantes no soro através da dieta parece prevenir danos oxidativos em células ósseas prevenindo a reabsorção óssea<sup>141</sup>.

Foram detectados nos animais tratados com hesperidina respostas teciduais parecidas com aquelas observadas quando os animais foram tratados com naproxeno. Em ambos os casos observou-se redução da densidade volumétrica de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares indicando possível ação anti-inflamatória nos tecidos avaliados. Por outro lado, nesses mesmos grupos observou-se aumento da porcentagem de fibroblastos e de feixes de fibras colágenas fortalecendo a hipótese de que as flavononas tem ação anti-inflamatória.

Os fibroblastos são fundamentais para a manutenção da integridade do tecido pela regulação do metabolismo de fibras colágenas e proteoglicanos<sup>144</sup>. A partir dos resultados estereométricos avaliou-se in vitro a ação das flavanonas sobre proliferação de fibroblastos por meio do teste Alamar Blue®, o ensaio apresenta um indicador de crescimento fluorimétrico com base na detecção de atividade metabólica e pode ser empregado em ensaios de citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular<sup>145,146</sup>. Inicialmente, testes de citotoxicidade foram realizados para determinar concentrações não tóxicas sobre cultura celular de fibroblastos. Em termos de possíveis aplicações clínicas futuras, os testes de citotoxicidade são essenciais na

seleção de novos agentes potencialmente terapêuticos<sup>147</sup>. Os resultados de citotoxicidade mostraram que concentrações  $\geq 100 \mu\text{M}$  de hesperidina reduziram a viabilidade de fibroblastos L929 após 48h de incubação. Os efeitos da citotoxicidade da hesperidina sobre fibroblastos são limitados, entretanto resultados semelhantes foram encontrados por Chen et al.<sup>148</sup> (2010) que avaliou diferentes concentrações de hesperidina por 24h em linhagem celular hepática humana e não foram observados efeitos negativos sobre a viabilidade celular nas concentrações de 20, 40 e 80  $\mu\text{M}$ . No estudo de Gomes-Zorita et al.<sup>149</sup> (2017) o tratamento com hesperidina nas concentrações de 1, 10 e 25  $\mu\text{M}$  em pré adipócitos após 8 dias não mostraram efeitos citotóxicos.

Os resultados de proliferação celular mostraram que o tratamento com hesperidina não estimulou o aumento da atividade metabólica de fibroblastos após os períodos avaliados. Wessels et al.<sup>150</sup> (2014) avaliou o efeito da hesperidina combinado a outros compostos na proliferação de fibroblastos mostrando aumento na síntese de colágeno por fibroblastos associado com a migração e proliferação celular. Além disso, San Miguel et al.<sup>151</sup> (2011), mostrou que determinadas concentrações de flavonoides promovem um aumento na quantidade de células endoteliais e fibroblastos gengivais humanos *in vitro*, embora, altas concentrações tenham mostrado um efeito contrário.

Os resultados *in vitro* não confirmaram os prévios achados estereométricos, há de se levar em consideração que não se estimulou os fibroblastos com LPS bacteriano uma vez que o objetivo era somente verificar a ação direta das flavanonas sobre a proliferação de fibroblastos. A ausência do estímulo pode reproduzir diferentes resultados, o ambiente experimental *in vivo* é completamente diferente daqueles observados *in vitro*<sup>152</sup>. Vários fatores intrínsecos e extrínsecos podem influenciar no metabolismo dos fibroblastos em experimentos *in vivo* como por exemplo: citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e interações celulares, que não foram utilizados no presente estudo. Considerando o alto potencial anticancerígeno dos flavonoides assim como da hesperidina, estes podem atuar inibindo a proliferação, induzindo apoptose e morte celular de diferentes tipos de células cancerígenas; no entanto seu mecanismo de ação sobre a proliferação celular não está completamente elucidado<sup>153-155</sup>.

Os resultados alcançados sugerem que a suplementação com hesperidina ou naproxeno controlou a resposta inflamatória periodontal quando observou-se redução

da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e aumento de IL-10. É importante salientar que a inflamação é controlada por um balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias e nesse caso parece que as flavanonas diminuíram a atividade de NF-kB. Tais resultados estão em concordância Kuo et al.<sup>1</sup> (2019) e Gugliandolo et al.<sup>156</sup> (2019) que verificaram queda da expressão das mesmas citocinas em doença periodontal experimental e trataram com suco de bergamota, rica em flavanonas e hesperidina. Deve-se salientar que os autores não utilizaram flavanonas puras como utilizado no presente experimento. Gugliandolo et al.<sup>156</sup> (2019) verificaram, que a suplementação com suco de bergamota diminui a ativação de transcrição de NF-kB e consequentemente queda da expressão de citocinas pró-inflamatórias como por exemplo IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

A ativação do fator de transcrição NF-kB envolve duas principais vias de sinalização, via clássica e alternativa, ambas importantes para regulação da resposta imune-inflamatória<sup>157</sup>. A ativação da expressão da via clássica do NF-kB foi sugerida como participante no desenvolvimento da doença periodontal experimental utilizada no presente trabalho<sup>90,129</sup>. A via clássica responde a diversos estímulos incluindo ligantes de vários receptores de citocinas, receptores de reconhecimento padrão, membros da superfamília de receptores de TNF bem como receptores de células T e B<sup>99,157</sup>. A proteína NF-kB está normalmente sequestrada no citoplasma por uma família de proteínas inibidoras, incluindo membros da família I $\kappa$ B. Durante o curso da inflamação I $\kappa$ B é fosforilizado e degradado após o reconhecimento do estímulo e consequentemente. NF-kB é translocado do citoplasma para o núcleo onde induz a expressão de diferentes genes pró-inflamatórios e consequente regulam a produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular envolvidas na inflamação como aquelas observadas no presente estudo<sup>99</sup>. Sabe-se que os flavonoides são conhecidos por regular a atividade de I $\kappa$ B e NF-kB, com impacto direto na ativação celular<sup>99,158</sup>. Entretanto, as análises da expressão de I $\kappa$ B e NF-kB não foram realizadas. no presente trabalho observou-se que as flavanonas induziram o aumento da expressão de IL-10 e diminuição de citocinas pró-inflamatórias, assim como leucócitos polimorfo e mononucleares o que pareceu antecipar o processo de reparo dos tecidos contribuindo para eventual atividade pró-resolutiva. Sugere-se que outras análises do processo pró-resolutivo como as resolvinas, lipoxinas, protectinas e maresinas poderiam ser futuramente realizadas.

Finalmente, quando avaliou-se o impacto da suplementação do naproxeno como um grupo controle, surpreendentemente observou-se aumento da expressão de IL-1 $\beta$ . Sabe-se que o naproxeno é um inibidor não seletivo de COX e conseqüentemente inibe a produção de prostaglandinas. As prostaglandinas, por sua vez, regulam a produção de leucotrienos que participam da produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ <sup>159,160</sup>. Pode-se aventar a hipótese que a queda de prostaglandinas indiretamente elevou o aumento da expressão de IL-1 $\beta$ . Adicionalmente deve-se levar em consideração que os flavonoides tem potencial de inibir enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico diminuindo a produção de mediadores inflamatórios derivados dessa via, por exemplo, biossíntese de prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos pela inibição da enzima fosfolipase A2<sup>161,162</sup>, COX<sup>163</sup> ou Lipoxigenases <sup>164</sup> que poderiam ser avaliados em futuros trabalhos.

Os resultados mostraram claramente que a flavanona hesperidina foi capaz de suprimir a resposta pró-inflamatória sendo candidata potente para este fim. Em concordância aos fatos observados, estudos de biologia celular, modelos animais e estudos clínicos demonstraram que dieta com polifenóis tem importantes propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias resultando na melhora de marcadores clínicos na periodontite<sup>165</sup>. A proteção oferecida pelas hesperidina parece estar ligada à sua ação anti-inflamatória, como constatado neste estudo pela diminuição do infiltrado inflamatório, queda da expressão de citocinas pró-inflamatórias, e aumento da produção de IL-10 protegendo os tecidos envolvidos pela modulação da resposta inflamatória.

## 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 ( $\mu$ 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 $\beta$  e aumentaram a expressão de IL-10, entretanto apenas o naproxeno demonstrou aumento da citocina IL-1 $\beta$  sugerindo a hipótese de que a queda de prostaglandinas indiretamente elevou o aumento da expressão de IL-1 $\beta$ .

## 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- $\kappa$ B regulated HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$ -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  $\kappa$ 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 $\gamma$  and TGF- $\beta$ 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 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.
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. H<sub>2</sub>S 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. Takanaski S, Nonaka R, Xing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med.* 1994; 180(2): 711–5.

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, García-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- $\kappa$ 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 H<sub>22</sub> 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- $\alpha$  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.

## ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA




FACULDADE DE ODONTOLOGIA



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“INGESTÃO DE FLAVONOIDES CÍTRICOS SOBRE A MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E NÍVEL DE PERDA ÓSSEA PROMOVIDA POR PERIODONTITE INDUZIDA EM CAMUNDONGOS SAUDÁVEIS”**, registrada com o nº 20/2018, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Luís Carlos Spolidório** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 25/06/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo- BALB/c
Nº de animais	90
Peso/Idade	25-40 gramas/ 8-10 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério de Central da Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto - SP

  
**Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE**  
 Coordenadora da CEUA

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de defesa.

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 30 de março de 2020**

**Dania Ramadan**