UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Jhonatan de Souza Carvalho

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

Araraquara

2020

UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Jhonatan de Souza Carvalho

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

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

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

Araraquara

2020

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

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

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

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

Jhonatan de Souza Carvalho

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

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

2º Examinador: Profa. Dra. Thais Borges Cesar

3º Examinador: Profa. Dra. Patricia Almeida Miguez

Araraquara, 30 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

Jhonatan de Souza Carvalho

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

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

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

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

Dedico este trabalho àqueles que são tudo para mim,

Deus, é tudo sobre você

Jecivaldo Alves Dias do Nascimento Carvalho, meu pai

Edilene de Souza Dias Carvalho, minha mãe

Luis Felliphe de Souza Carvalho, meu irmão

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À Faculdade de Odontologia de Araraquara.

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

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

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

Fonte: Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*

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

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

Charles Chaplin

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura básica dos flavonoides 23
Figura 2 - Peso dos animais por grupo em gramas.....40
Figura 3 - Média do consumo alimentar e consumo energético diário 41
Figura 4 - Cortes histológicos do tecido hepático.....42
Figura 5 - Ação das flavanonas sobre a perda óssea 43
Figura 6 - Análise Estereométrica e aspectos microscópicos com coloração em H&E 45
Figura 7- Análise estereométrica e aspectos microscópicos corados com Picro Sirius Red modificado 46
Figura 8 - Análise estereométrica e aspectos microscópicos corados com Tricrômico de Masson.....47
Figura 9 - Concentração tecidual de citocinas inflamatórias dos grupos suplementados com flavanonas cítricas.....48
Figura 10 - Atividade de mieloperoxidase 49
Figura 11 - Efeitos citotóxicos da eriocitrina e eriodictiol.....50
Figura 12 - Atividade metabólica após tratamento com eriocitrina ou eriodictiol 51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Levantamento de estudos que realizaram dieta suplementada com flavonoides cítricos em modelos in vivo 28

Quadro 2- Composição da dieta padrão AIN 93M.....30

Quadro 3 - Distribuição dos grupos de estudo e protocolo experimental 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA: Análise de Variância

ATP: Adenosina 5’-trifosfato

BCA: Método do Ácido Bicinconínico

CLR: Receptores do Tipo Lectina do Tipo C

CO_2: Dióxido de Carbono

COX: Ciclo-oxigenase

DAMP: Padrões Moleculares Associados a Danos Endógenos

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de Dimetilo

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EPO: Peroxidase de Eosinófilo

FBS: Soro Fetal Bovino

G-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos

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

H/E: Hematoxilina e Eosina

HCL: Ácido Clorídrico

IFN- γ: Interferon-γ

IL: Interleucina

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível

IκB: Inibidor do Fator Nuclear *kappa* B

LDL-ox: LDL Oxidada

LPS: Lipopolissacarídeo

NFATc1: Fator Nuclear de Células T Ativadas

MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MCP-1: Proteína Quimeoatrativa de Macrófagos

MDA: Malondialdeído

MPO: Mieloperoxidase

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

NF-κB: Fator Nuclear *kappa* B

NOD: Proteínas com Domínio de Ligação a Nucleotídeos e Oligomerização

Nrf2: Fator Nuclear Eritroide 2-relacionado ao Fator 2

OH: Radical Hidroxila

PAMP: Padrões Exógenos Moleculares Associados a Patógenos

PBS: Tampão Salina-Fosfato

PGE2: Prostaglandina E2

RANK: Receptor Ativador do NF-κB

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

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

SDH: Enzima Desidrogenase Succínica

SOD: Enzima Superóxido Dismutase

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TLR: Receptor de Reconhecimento Padrão Toll-like

μCT: Microtomografia Computadorizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 PROPOSIÇÃO 19

2.1 Hipótese 19

2.2 Objetivo Geral 19

2.3 Objetivo Específico 19

3 REVISÃO DA LITERATURA 20

3.1 Ação dos Flavonoides Sobre a Inflamação 20

3.2 Ação dos Flavonoides Sobre o Metabolismo Ósseo 21

3.3 Flavonoides Cítricos: Hesperidina, Eriodictiol e Eriocitrina 23

3.4 Fundamentos dos Efeitos da Suplementação de Flavonoides em Experimentos In Vivo Considerando como Componentes da Dieta 26

4 MATERIAL E MÉTODOS 29

4.1 Animais 29

4.2 Composição da Dieta 29

4.3 Suplementos 30

4.4 Consumo Alimentar e Energético 31

4.5 Peso Corporal 32

4.6 Indução de Doença Periodontal 32

4.7 Eutanásia, Coleta e Análise das Amostras 32

4.8 Microtomografia Computadorizada (µCT) 33

4.9 Picro Sirius Red Modificado Para Coloração de Eosinófilos 34

4.10 Análise Estereométrica 34

4.11 Expressão de Citocinas no Tecido Gengival (Multiplex) 35

4.12 Atividade de Mieloperoxidase (MPO) 36

4.13 Análises In Vitro 36

4.13.1 Soluções testes 36

4.13.2 Cultura celular 36

4.13.3 Citotoxicidade dos flavonoides 37

4.13.4 Efeito dos flavonoides sobre a proliferação celular 38

4.14 Análise Estatística dos Resultados 38

5 RESULTADOS.....40

5.1 A Adição dos Suplementos na Ração Padrão Não Modificou a Média do Peso Corporal 40

5.2 A Suplementação Alimentar com Flavanonas Cítricas ou Naproxeno não Induziu Alterações Hepáticas.....41

5.3 A Suplementação Alimentar com Flavanonas Cítricas ou Naproxeno Inibiram Perda Óssea Induzida pelo LPS de E. coli 42

5.4 Aspectos Microscópicos 43

5.5 Análise Estereométrica.....44

5.5.1 Suplementação de flavanonas cítricas ou naproxeno na ração padrão diminuiu a quantidade de figuras que participam do processo Inflamatório e favoreceu a formação de matriz extracelular.....44

5.6 A Suplementação Alimentar com Flavanonas Cítricas Atenuou a Expressão de Citocinas Inflamatórias da Região de Mucosa Palatina do Primeiro Molar Superior Direito de Camundongos que Receberam Injeções de LPS 48

5.7 Houve Queda da Atividade de MPO Quando os Animais Receberam Dieta Enriquecida com Flavanonas Cítricas.....49

5.8 Citotoxicidade dos Flavonoides.....49

5.9 Atividade Metabólica de Fibroblastos L929 50

6 DISCUSSÃO 52

7 CONCLUSÃO 60

REFERÊNCIAS.....61

ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA.....75

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Hipótese

A hipótese é que a suplementação de flavanonas cítricas como a eriocitrina e o eriodictiol na dieta, corrobore para que o equilíbrio na relação LPS bacteriano-resposta imuno-inflamatória, perdido na periodontite, possa ser recuperado pelo favorecimento da ação desses compostos na modulação positiva da resposta imune.

2.2 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade da suplementação alimentar com flavonoides cítricos em regular a resposta imuno-inflamatória e reabsorção óssea alveolar induzida por LPS de *E. coli* e, portanto, o impacto dos flavonoides sobre a periodontite experimental em camundongos.

2.3 Objetivo Específico

Determinar a ação da suplementação alimentar com flavanonas eriocitrina e eriodictiol a 25mg/kg e 50mg/kg sobre a periodontite experimental induzida pela injeção de LPS em camundongos. Portanto, as seguintes avaliações in vivo foram estabelecidas

a) Análise da porcentagem de volume ósseo periodontal (%BV/TV) por microtomografia computadorizada (µCT);

b) Análise microscópica do fígado e dos maxilares (Qualitativa);

c) Análise estereométrica do processo inflamatório gengival (Quantitativa);

d) Avaliação da expressão de citocinas inflamatórias no tecido muco gengival através de ensaio Multiplex;

e) Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO);

Avaliar a ação da eriocitrina e eriodictiol sobre cultura de fibroblastos gengivais de camundongos (L929). Portanto as seguintes avaliações in vitro foram estabelecidas:

f) Análise in vitro da viabilidade celular de fibroblastos L929 por ensaio MTT;

g) Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos L929 por ensaio AlamarBlue®.

3 REVISÃO DA 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[17]. 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 do tipo 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 lipopolissacarídeo (LPS), 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-α, IL-1β, IL-6 com objetivo de eliminar os invasores[17,18]. Entretanto quando essa manifestação ocorre de forma exacerbada causa um efeito paradoxal intensificando a dor, edema, e danos aos tecidos adjacentes[17,19,20].

Flavonoides constituem um grupo de polifenóis de origem vegetal, sendo descritos mais de 5.000 tipos de compostos[21,22], agrupados nas seguintes subclasses: antocianinas, flavonóis, flavanonas, flavonas, flavanolignanos e isoflavonas[23]. 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[7]. Estudos tem mostrado que em animais e humanos as atividades biológicas dos flavonoides também abrangem um amplo espectro, desde propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antineoplásicas, antibacterianas e

inibição da reabsorção óssea[21,24–28]. 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[29], (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 cicloxigenase. Essa inibição se dá por competitividade de ligação dos flavonoides ao ATP nos sítios catalíticos das enzimas[19].

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 ajam no metabolismo do tecido ósseo pela redução da expressão de TNF-α, IL-1β e IL-6[30], que são citocinas conhecidamente relacionadas a reabsorção óssea. Alguns flavonoides exercem ação sobre o tecido ósseo promovendo a osteoblastogênese e, consequentemente, formação óssea, enquanto outros atuam inibindo a osteoclastogênese, prevenindo a reabsorção óssea[22,31]. 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[32,33]. O tratamento com quercetin resultou no aumento da densidade mineral óssea, cálcio e fósforo[34] enquanto o icariin inibiu da expressão TNF-α, IL6 e IL1-β em resposta inflamatória causada por LPS[35,36]. Icariin mostrou redução da 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-α, IL6 e IL1-β[30]. No entanto, o papel de alguns desses compostos sobre o tecido ósseo tem demonstrado ser controverso, como por exemplo, a quercitina pode induzir tanto osteoblastogênese quanto osteoclastogênese em tecido ósseo[37,38], enquanto outro composto denominado apigenina apresentou ação inibidora de ambos os processos de osteoclastogênese e osteoblastogênese in vitro[39].

A hesperidina representa, dentro da classe das flavanonas, o composto mais pesquisado sobre a saúde e metabolismo ósseo. Os efeitos benéficos da hesperidina sobre tecido ósseo parecem estar relacionados principalmente a redução da reabsorção óssea[40] associado à sua capacidade de promover a formação óssea[41] e ainda, é sugerido que o composto apresente efeito protetor sobre o osso através da modulação da produção de mediadores inflamatórios[42]. 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, hesperidina foi associada a um *scaffold* com células tronco no qual mostrou acelerar o processo de reparo em fratura de tíbia de ratos[43]. 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-1β, TNF-α e iNOS das amostras gengivais coletadas quando comparadas ao grupo sem tratamento[1]. Eriodictiol apresentou ser capaz de inibir a atividade de NFATc1, um dos principais participantes da atividade de osteoclastogênese resultando na menor reabsorção óssea.[44,45]. In vitro, eriodictiol suprimiu a formação de osteoclastos induzidos por RANKL e alterou a morfologia destas células pela ruptura dos anéis de actina sugerindo este ser um dos mecanismos responsáveis pela diminuição da reabsorção óssea. Além disso, notou-se queda da via de sinalização MAP quinases e da expressão do fator de transcrição NFATc1 atenuando a expressão de COX-2. No mesmo estudo, in vivo eriodictiol suprimiu a reabsorção óssea induzida por injeções de LPS em calvária ou em modelo de reabsorção óssea induzido por ovariectomia. Os dados sugerem que efeito anti-osteoclastogênico do eriodictiol pode ser atribuído principalmente a redução na expressão de NFATc1[46].

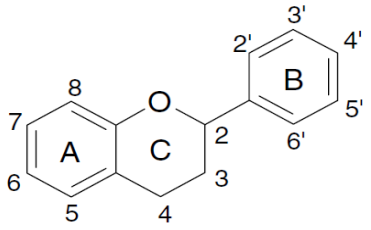
3.3 Flavonoides Cítricos: Hesperidina, Eriodictiol e Eriocitrina

Os flavonoides cítricos são conhecidos por ajudarem a regular o metabolismo lipídico, limitando a lipotoxicidade e estimulando a utilização de glicose e ácidos graxos nos tecidos[47]. 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[48].

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[9,20]. Eles têm sido reconhecidos como agentes com ação anti-inflamatória e antioxidante na obesidade e síndrome metabólica[9].

Flavanona é uma das maiores classes de flavonoides. Dentre suas formas conhecidas aproximadamente 350 são aglicosiladas e 100 glicosiladas[9]. 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[49]. 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 [9,49,50].

Figura 1- Estrutura básica dos flavonoides



Flavonoide	7	3'	4'
Hesperidina (Hesperetin 7-*O-rutinose)*	*O-Ru*[α]	*OH*	*OCH_3*
Eriocitrina (Eriodictiol 7-*O-rutinose*)	*O-Ru*[α]	*OH*	*OH*
Eriodictiol	OH	OH	OH

[α]*O-rutinose*

Fonte: Adaptado de Barreca et al.[9] e Martens e Mithöfer[49]

A hesperidina ($C_{28}H_{34}O_{15}$) 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 no interior da casca) de laranjas[20,51] e devido sua variedade de funções biológicas é chamada de bioflavonoide. A hesperidina é a forma glicosilada 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 ($C_{16}H_{14}O_6$)[52] e assim pode ser absorvida. Nos enterócitos é conjugada em glicuronídeos e sulfatos e são transportadas para o fígado, onde sofrem novas reações formando vários metabólicos. Em seguida são disponibilizadas na corrente sanguínea e exercerem suas atividades biológicas[9,53]. Apresenta ação antioxidante, anti-inflamatória, antineoplásica e propriedade antialérgica[20,43,54]. O Consumo de um litro de suco de laranja contém aproximadamente 450mg de hesperidina, com concentrações plasmáticas de aproximadamente 1µM com pico em 5 horas após pós-ingestão[42,55]. Relata-se sucesso no tratamento de artrite reumatoide, doença caracterizada por um processo inflamatório intenso, através da redução de níveis de TNF-α, e IL-1β[56]. A hesperidina representa, dentro da classe das flavanonas, o composto mais pesquisado sobre a saúde e metabolismo ósseo. Os efeitos benéficos da hesperidina sobre tecido ósseo parecem estar relacionados principalmente a redução da reabsorção óssea[40], associado à sua capacidade de promover a formação óssea[41] e ainda, é sugerido que o composto apresente efeito protetor sobre o osso através da modulação da produção de mediadores inflamatórios[42]. 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[57].

A eriocitrina (*eriodictiol 7-O-rutinose*), é um flavonoide abundante em limões e limas, foi relatado como o antioxidante mais potente destas frutas em estudos in vitro[58]. Ela é encontrada principalmente na casca (albedo - porção esponjosa interior da casca e flavedo com concentração média de 950,5 mg/L) e vesículas de suco (concentração média de 1.151mg/L), sendo mais abundantes na casca do limão do que no suco. Estudos anteriores mostraram que um litro de suco de limão contém em média 170mg de eriocitrina, enquanto sua concentração no suco representa metade da do ácido ascórbico[10,59].

As propriedades biológicas da eriocitrina têm sido relacionadas à redução de alterações metabólicas observadas em indivíduos obesos[60–62]. Foi mostrado que a eriocitrina, e sua aglicona, eriodictiol, apresentaram potente atividade antioxidante in

vitro e atividades anti-inflamatórias e antioxidantes em ratos diabéticos ou submetidos ao exercício agudo[61,63,64]. 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[65].

O efeito anti-inflamatório do eriodictiol foi mostrado na redução dos níveis de oxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão em ratos diabéticos[61]. Foi mostrado que o eriodictiol regula moléculas de adesão e a migração transendotelial de monócitos, que são eventos imunes envolvidos na patogênese de doenças inflamatórias, como a aterosclerose[66]. O eriodictiol também tem sido 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[67,68]. A suplementação de hesperidina e eriocitrina, aumentaram a atividade de enzimas antioxidantes como a catalase e glutationa (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 do que a da hesperidina[69].

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[61,70]. 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[60]. Quando ingerida, a eriocitrina (forma glicosilada encontrada na natureza) é deglicosilada por ações enzimáticas e bactérias intestinais residentes e convertida a eriodictiol, sendo este conjugado com glicuronídeos e sulfatos nos enterócitos. 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[62,71]. 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 composto pelos tecidos[72]. 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 nos 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.[73], (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.[52](2016), Hiramitsu et al.[65](2014), e Yamashita et al.[74](2016) verificaram que dietas hipercalóricas suplementadas com hesperidina, eriodictiol e eriocitrina mantiveram a capacidade antioxidante, reduziram os níveis de IL-6, de proteína quimeoatrativa de macrófagos (MCP-1) e proteínas C-reativa. Todos os resultados, portanto, apontaram para melhoria das condições clinicas 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 desordens neurológicas. Nesse sentido, Wang et al.[75] (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. Sugere-se que os flavonoides inseridos na dieta desempenham diversas

funções no equilíbrio metabólico pela restauração da atividade de enzimas mitocondriais e diminuição do estresse oxidativo.

Recentes estudos realizados em humanos por Gonçalves et al.[76] (2017) e Mulero et al.[77] (2012) sugerem que a suplementação com sucos cítricos de forma continua 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.[78] (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[79] (2019) avaliaram as propriedades antiobesidade 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

Autor	Ratos, Camundongos, ou humanos	Composto adicionado à dieta	Concentração	Principais achados
Miyake et al.[69] **(1998)**	Ratos Wistar	Eriocitrina e Hesperidina	0,2% de Hesperidina ou Eriocitrina	Diminuição dos níveis de TBARS e 8-OHdG em ratos diabéticos.
Habauzit et al.[42] **(2009)**	Ratos Wistar	Hesperidina	2,5 g/kg ou 5g/kg	Inibição da reabsorção óssea.
Takumi et al.[78] **(2011)**	Ratos Wistar	Hesperitina	80mg/kg	Composto foi encontrado em uma grande variedade de tecidos e no plasma após 4 semanas de ingestão através da dieta.
Mulero et al.[77] **(2012)**	Humanos	Suco cítrico: Eriocitrina, hesperidina	Eriocitrina ~11,45 mg; hesperidina ~13,54	Redução benéfica do colesterol, HDL-c e LDL-c, melhores níveis de LDL-ox, Proteína C reativa e homocisteína.
Yamamoto et al.[73] **(2013)**	Ratos (SHR)	Hesperidina e Glicosil hesperidina	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_2 em ratos hipertensos.
Wang et al.[75] **(2014)**	Camundongos C57BL/6J	Hesperidina	50mg/kg ou 100mg/kg	Redução dos déficits de aprendizado e memória, melhoria atividade locomotora e melhora da defesa antioxidativa.
Hiramitsu et al.[65] **(2014)**	Peixe Zebrafish	Eriocitrina	32mg/kg	Melhora da esteatose hepática e ativação da biogênese mitocondrial.
Ferreira et al.[52] **(2016)**	Camundongos C57BL/6J	Hesperidina, eriocitrina e eriodictiol	100mg/kg de Hesperidina; 200mg/kg de eriocitrina e eriodictiol	Eriocitrina e o eriodictiol reduziram os níveis de TBARS. Hesperidina e eriodictiol reduziram acúmulo de gordura e danos ao fígado. Todos compostos reduziram IL-6 e MCP-1.
Yamashita et al.[74] **(2016)**	Camundongos C57BL/6J	Eriodictiol ou/e Chá verde	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.
Gonçalves et al.[76] **(2017)**	Humanos	Suco de laranja natural: Hesperidina e Naringina	16,4mg de hesperidina; 2,7mg naringina	Queda dos níveis séricos de colesterol total, colesterol LDL, proteína C-reativa e nos parâmetros de estresse oxidativo.
Ferreira et al.[80] **(2018)**	Ratos Wistar e Camundongos C57BL/6J	Eriocitrina	10, 25, 50, 100mg/kg	Diminuiu os níveis séricos de triglicerídeos (-33%), de glicose (-25%), insulina (-35%), resistina (-18 %) e peroxidação lipídica (-21%).
Kwon e Choi et al.[79] **(2019)**	Camundongos C57BL/6N	Eriodictiol	0,005%	Queda da expressão de genes relacionados à lipogênese no tecido adiposo, aumento da excreção lipídica fecal. Melhora da esteatose hepática, diminuição da produção de citocinas IL-1β, IL-6 e aumento de IL-10.

Fonte: Elaboração própria

4 MATERIAL E MÉTODOS

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 70 (setenta) 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 ± 1° 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. Foi determinada 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 14 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,[81] fornecida por PRAGSOLUÇÕES Biociências - Rua Antônio Carlos Nunes Tamanini, 315 - Jaú - SP - CEP 17213-000. 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.[81]

4.3 Suplementos

Os suplementos de eriocitrina e eriodictiol 99% de grau de pureza, purificadas no laboratório do Dr. Jonh A. Manthey (USDA-ARS Horticultural Research Laboratory, Fort Pierce, Florida 34945, United States) foram recebidos em pó e misturados 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[82–86]. 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 enriquecida com 10mg/kg de naproxeno de peso corporal/dia (Sigma-Aldrich) conforme escrito anteriormente[87]. 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[88,89].

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 ou naproxeno), mais 10% para garantir a dose diária recomendada do suplemento[52]. 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

Grupo (n=10)	**Indução Doença periodontal**	**Tratamento**	**Dosagem**	**Duração**
Veículo	Não	Ausente	-	60 dias
Npx+LPS	Sim	Naproxeno	10 mg/kg	60 dias
LPS	Sim	Ausente	-	60 dias
Erioc25+LPS	Sim	Eriocitrina	25 mg/kg	60 dias
Erioc50+LPS	Sim	Eriocitrina	50mg/kg	60 dias
Eriod25+LPS	Sim	Eriodictiol	25 mg/kg	60 dias
Eriod50+LPS	Sim	Eriodictiol	50mg/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[52,90]. 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, eriocitrina ou eriodictiol. 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[91,92]. Após a anestesia, foi injetada, através de micro injeções bilaterais, 3µL 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.[93] (2017). Um dos grupos recebeu os mesmos procedimentos com solução de PBS, utilizado como veículo do LPS.

4.7 Eutanásia, Coleta e Análise das Amostras

Ao final do período experimental (60º 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[94]. 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 hemiarcada esquerda, etiquetado e congelado a -80ºC para avaliação do perfil de citocinas inflamatórias e atividade de mieloperoxidase através de ensaio multiplex. Os restantes das amostras foram fixadas

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, espaçados a 50 µm um do outro e montados em lâmina e corados com hematoxilina e eosina (H/E), Tricrômico de Masson e Picro Sirius Red modificado. As hemimaxilas foram cortadas no sentido vestíbulo-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 0,5 mm. Todas as amostras foram escaneadas com cortes de 9 µm espessura, com passo de rotação de 0.5 mm e frame averanging 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 porcentual 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) = 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. O protocolo utilizado foi realizado de acordo com o estudo de de Paiva Gonçalves et al.[94](2018).

4.9 Picro Sirius Red Modificado Para Coloração de Eosinófilos

A coloração de PicroSirius Red para coloração se eosinófilos foi realizada de acordo com Wehrend et al.[95] (2004). O Sirius Red F3B (500mg, Dystar, Leverkusen) foi dissolvido em 50ml 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. Em seguida, 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 24h. Após a desidratação com concentrações crescentes de etanol, as seções foram montadas. A coloração com hematoxilina eosina foi realizada de acordo com métodos padrão para avaliar todo o tecido[96]. A caracterização dos eosinófilos foi realizada de acordo com sua morfologia típica.

4.10 Análise Estereométrica

A análise estereométrica do processo inflamatório foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz na magnificação de 200x baseado no trabalho de Guimarães et al.[97] (2012) com modificações. Um total de 15 cortes foram avaliados por bloco de tecido. Cada um desses 15 cortes foi espaçado a 50µm um do outro, a fim de representar uma extensão de 750µm. 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 dos eosinófilos pela coloração de PicroSirusRed 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 µM (5 × 5 quadrados de 10 µm de lado) permitindo a análise de uma área de interesse de 2500µM^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-1β, TNF-α, IL-10 foi avaliada por ensaio multiplex de acordo com o estudo de de Paiva Gonçalves[98] (2018) no 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 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.[99] (2017) e Xia e Zweier[100] (1997) com modificações. Foi utilizado um n=7 por grupo e cada amostra de tecido gengival foi homogeneizadas 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 460nm, 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[101]. Os resultados foram expressos em U/µg de proteína.

4.13 Análises In Vitro

Foram realizadas análises in vitro para avaliar a ação da eriocitrina e eriodictiol sobre cultura de fibroblastos gengivais de camundongos (L929).

4.13.1 Soluções testes

A eriocitrina e eriodictiol foram obtidos individualmente (USDA-ARS Horticultural Research Laboratory, Fort Pierce, Florida 34945, United States). 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%[36].

4.13.2 Cultura celular

Foram utilizadas linhagem celulares de fibroblastos L929 (ATCC CCL-1) 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 mol/L de glutamina) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) em atmosfera umidificada a 5% de CO_2 a 37º 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 dos flavonoides

Fibroblastos L929 foram cultivados em placas de 96 poços ($1x10^4$ células/poço) (n=9) e mantidas em incubadora umidificada por 24h para a formação de uma monocamada de células confluentes. Seguidamente, o meio de cultura foi aspirado e substituído por diferentes concentrações de eriocitrina (500, 600, 700, 800, 900 e 1000µM), eriodictiol (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 citoquímica 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 5mg do sal de MTT em 1 mL de PBS estéril. Após a incubação das células pelo período de 4 horas, a 37ºC, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e, posteriormente, aplicado 100 µL de solução de isopropanol acidificado em HCL a 0.04N, 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 dos flavonoides sobre a proliferação celular

Para avaliação da proliferação celular, as células foram plaqueadas em uma densidade de 5 x 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 1, 10 e 50 µM de eriodictiol; 500, 600 e 700 µM de eriocitrina e os respectivos controles. As placas foram incubadas por 1, 3 e 7 dias a 37 °C e 5% de CO_2 e a análise de proliferação celular foi realizada utilizando o ensaio AlamarBlue®. 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 as células o equivalente a 10% do volume de cultura da solução de Alamar Blue® conjuntamente ao meio de cultura sem SFB (50 µL de solução de Alamar Blue® em 450 µL de meio de cultura). As células permaneceram em contato com a solução em incubadora em condições adequadas (37º C e 5% de CO_2) por 4h. Após este período, duas alíquotas de cada compartimento (100 µL) 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 600nm. 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 hemocedasticidade 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% ($p < 0,05$)[102].

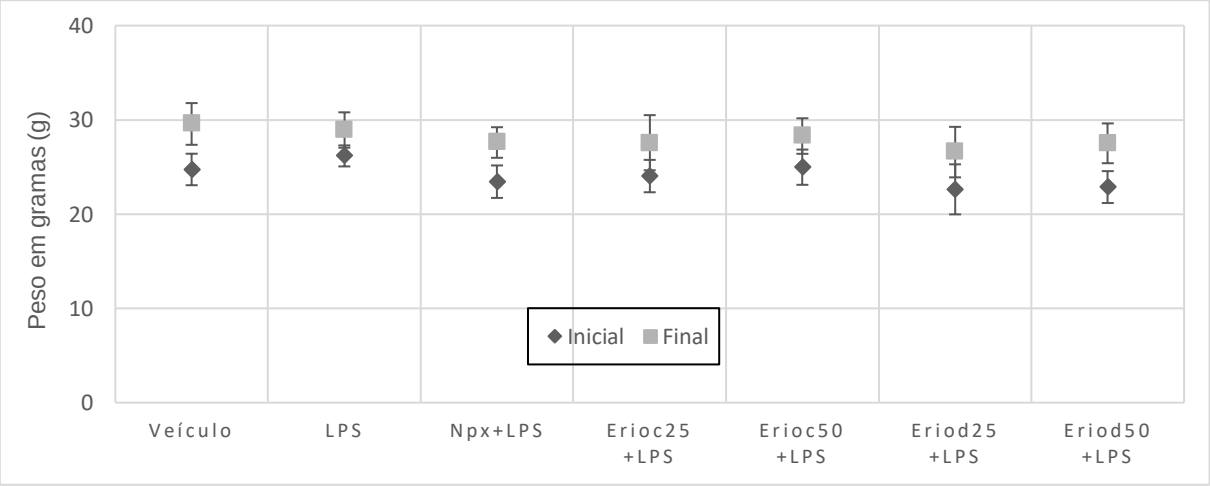
Os dados da citotoxicidade e proliferação celular foram transformados em porcentagem considerando ao grupo controle como 100%. A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e os dados normalmente distribuídos foram analisados utilizando ANOVA one-way e ANOVA two-way. Todos os testes estatísticos foram considerados em nível de significância com $p < 0,05$[102].

5 RESULTADOS

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

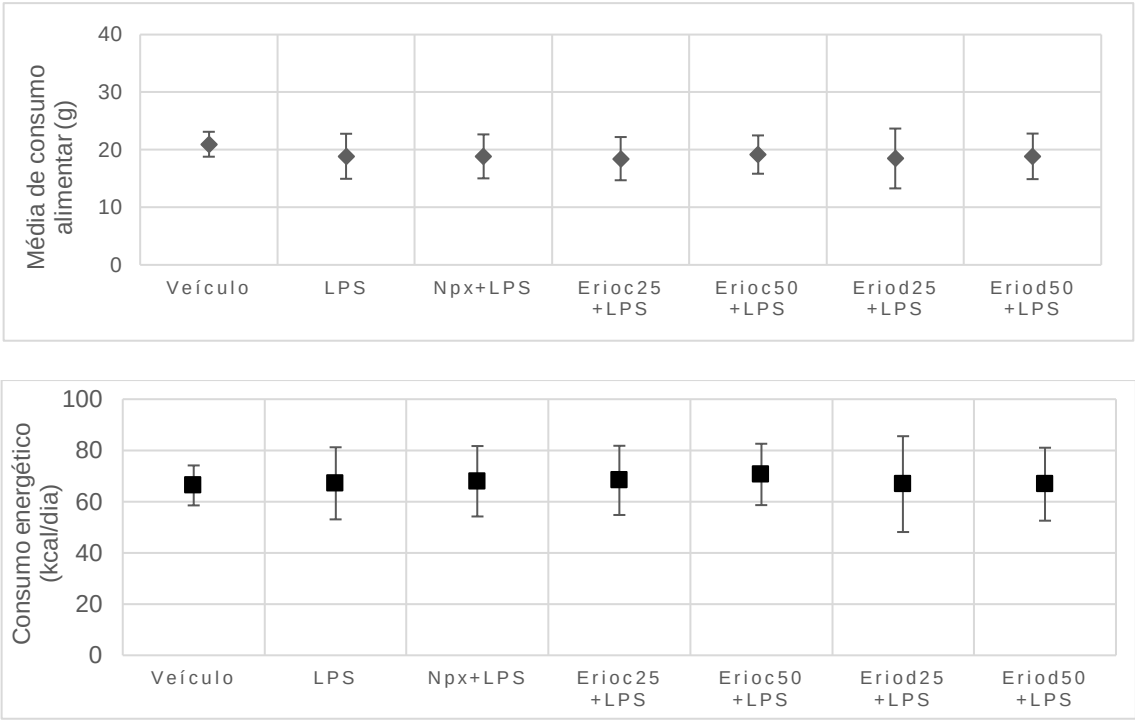
O ganho de peso corporal, o consumo alimentar e energético foi mensurado de acordo com consumo diário ao longo do período experimental. A partir da quantidade de ração consumida foi calculada a ingestão energética, baseada na composição das dietas. Todos os grupos experimentais consumiram em média 19,16g de ração e 67,96 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 flavanonas cítricos ou com naproxeno apresentaram ganho de peso semelhante quando comparado ao grupo veículo ($p>0.05$) (Figuras 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 10 mg/kg de peso corporal/dia de naproxeno ou dieta suplementada com 25mg/kg ou 50 mg/kg peso corporal/dia de eriocitrina e eriodictiol. Administração do LPS ou veículo não alterou o ganho de peso dos animais. Os valores estão apresentados em gramas e expressos nas médias ± desvio.
Fonte: Elaboração própria.

Figura 3 - Média do consumo alimentar e consumo energético diário



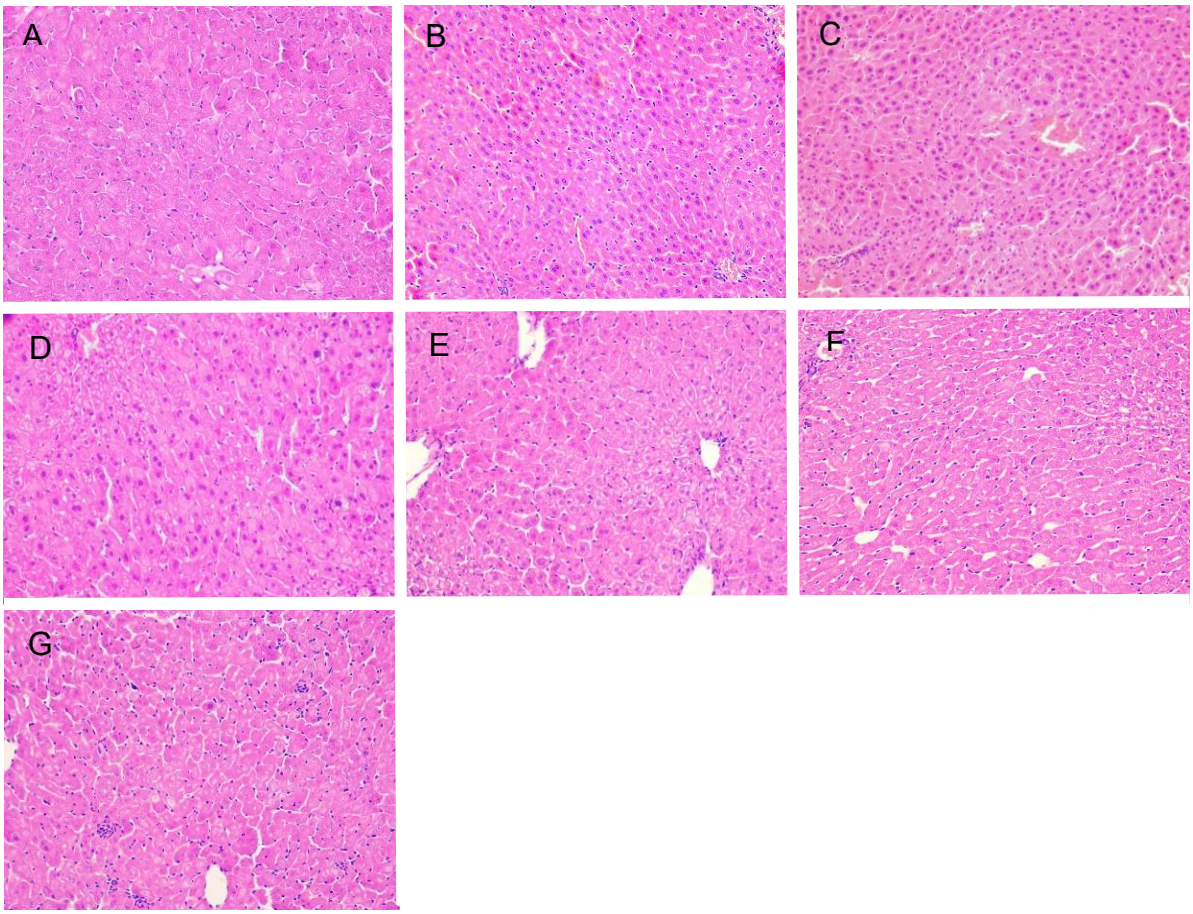
Consumo alimentar e energético de camundongos alimentados com dieta padrão e suplementadas com eriocitrina e eriodictiol na concentração de 25mg/kg e 50 mg/kg e naproxeno 10 mg/kg. Administração de LPS ou veículo não alterou o padrão alimentar dos animais. Valores foram expressos em gramas para consumo alimentar diário e quilocaloria para consumo energético (média ± desvio padrão).
Fonte: Elaboração própria.

5.2 A Suplementação Alimentar com Flavanonas Cítricas ou Naproxeno não Induziu Alterações Hepáticas

Resultados de análise microscópica mostraram que os fígados dos camundongos dos grupos veículo, LPS, e suplementados com flavanonas cítricas 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

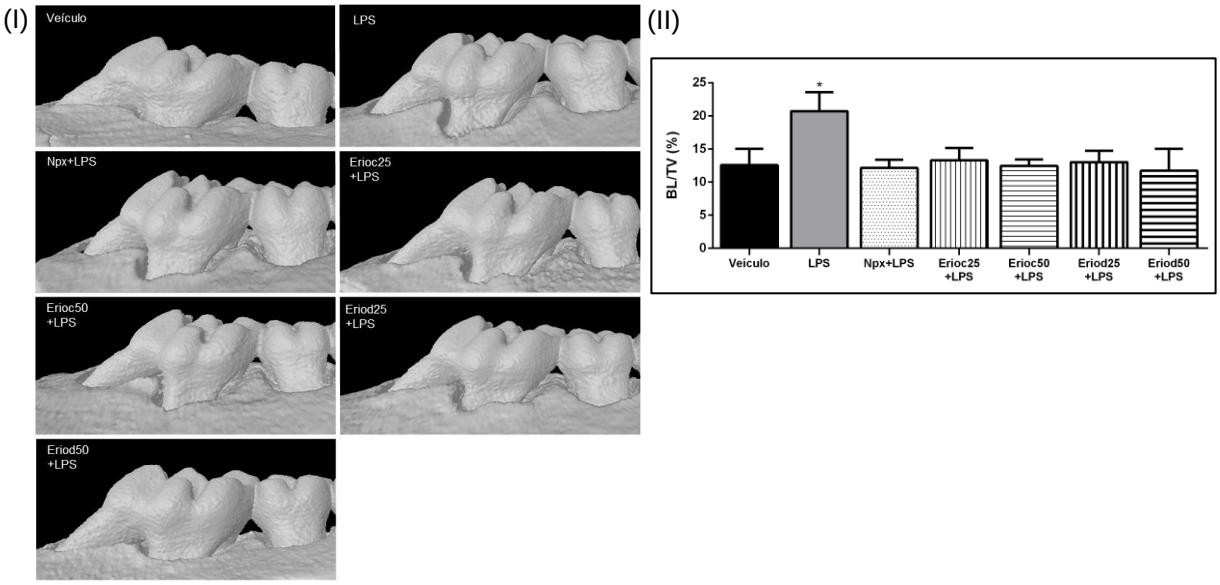


Cortes transversais do fígado de camundongos tratados com: (A) Veículo, (B) LPS, (C) naproxeno, (D e E) 25 e 50mg/kg de peso corporal/dia de eriocitrina, (F e G) 25 e 50mg/kg de peso corporal de eriodictiol de peso corporal/dia. Não se observou alterações estruturais ou morfológicas dos tecidos de todos os grupos experimentais (H/E 20x).
Fonte: Elaboração Própria

5.3 A Suplementação Alimentar com Flavanonas Cítricas ou Naproxeno Inibiram 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 (µCT). Observou-se que, de forma geral, a administração de LPS induziu aproximadamente 20% de perda óssea quanto comparado aos demais grupos ($p<0.05$). A suplementação com flavanonas cítricas ou naproxeno preveniu em média de 10,31% ($p<0.05$) da perda óssea num quadro de periodontite experimental induzida pela administração de LPS de *E. coli* (Figura 5).

Figura 5 - Ação das flavanonas sobre a perda óssea



(I) Imagens mostram a reconstrução tridimensional da microtomografia computadorizada dos molares superiores vista da direção palatina. (II) Impacto da suplementação de 25 e 50 mg/kg de peso corporal/dia de eriocitrina, eriodictiol ou 10mg/kg de peso corporal/dia de naproxeno sobre a porcentagem de perda óssea palatina (Bone Loss/Total Value, %), induzida com injeções de 3µL da solução contendo 10mg/ml de LPS de *E. coli*. *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.

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 (Figura 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

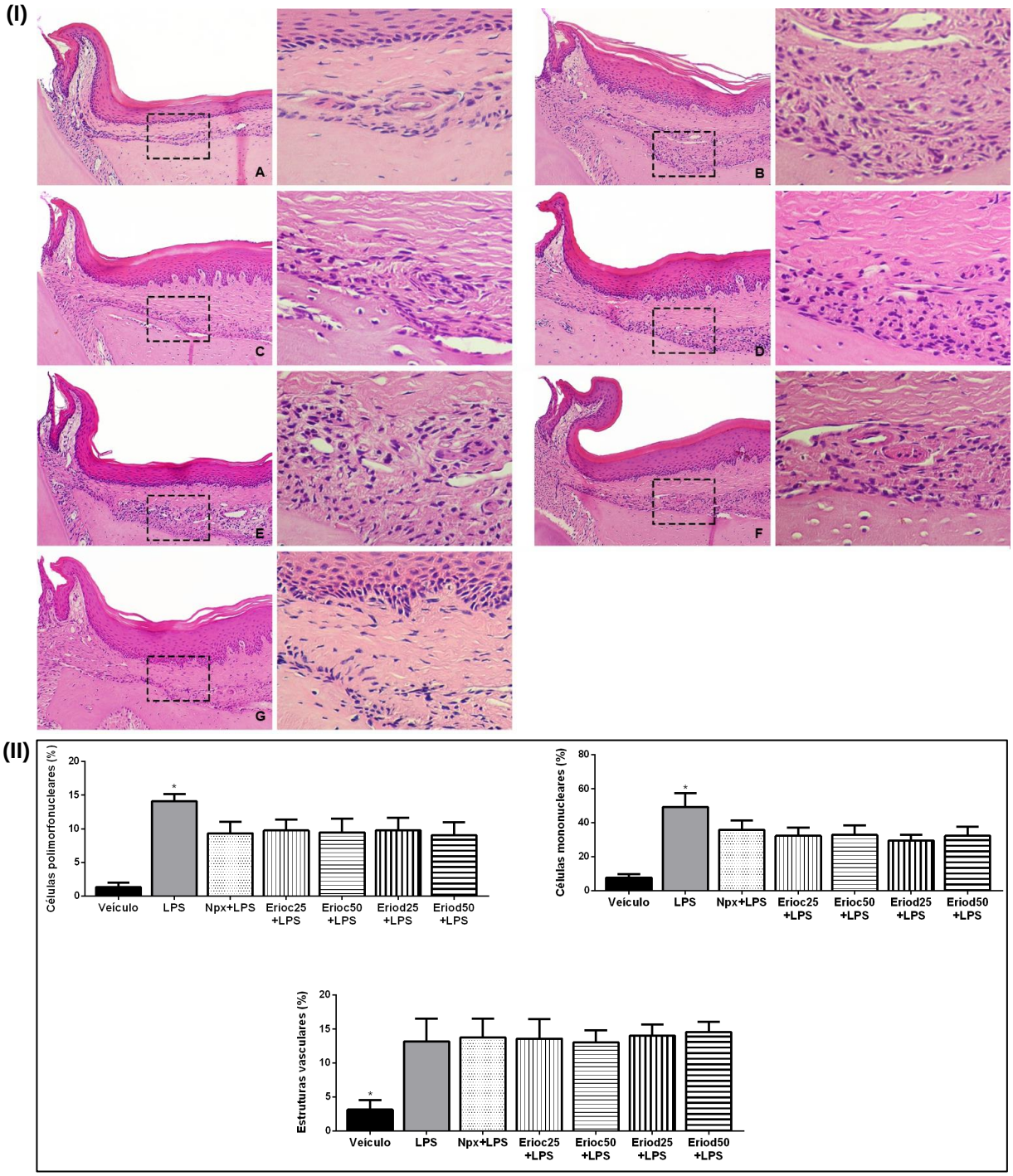
direito dos camundongos submetidos às injeções LPS de *E. coli* mostraram tecido epitelial gengival e da mucosa palatina hiperplásicos, com projeções epiteliais menos pronunciadas para o conjuntivo quando comparado ao grupo veículo. O tecido conjuntivo gengival e palatino mostravam-se mais frouxos com espaçamentos 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 o tecido ósseo composto por inúmeros osteócitos e áreas de reabsorção principalmente na região palatina. Os camundongos que receberam dietas enriquecidas com flavonoides cítricos ou naproxeno não apresentaram hiperplasias exuberantes do epitélio quando comparado ao grupo tratado com LPS. Observou-se que houve diminuição do processo inflamatório e consequentemente de reabsorção óssea. O tecido conjuntivo apresentava-se mais fibroso mesmo com a persistência de células inflamatórias e vasos sanguíneos dilatados.

5.5 Análise Estereométrica

5.5.1 Suplementação de flavanonas cítricas ou naproxeno na ração padrão diminuiu a quantidade de figuras que participam do processo Inflamatório e favoreceu a formação de matriz extracelular.

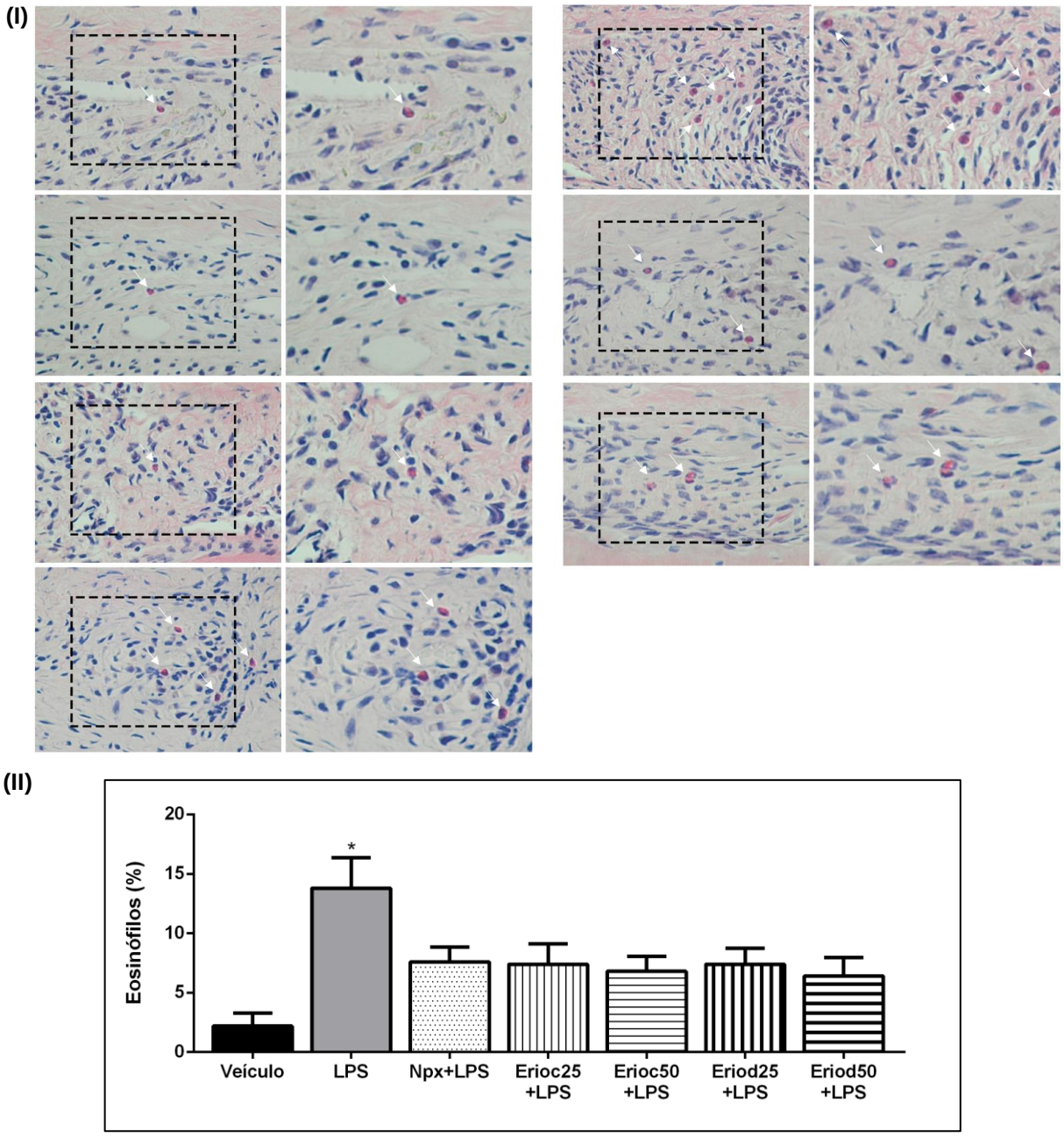
As Figuras 6, 7 e 8 mostram os resultados da análise estereométrica para avaliação da porcentagem de células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e mononucleares e outras estruturas da mucosa palatina da região de primeiro molar superior direito dos camundongos que receberam injeções de LPS ou veículo e tratados ou não com dietas enriquecidas com flavanonas cítricas. Quando comparado ao grupo veículo correspondente a porcentagem (%) de células inflamatórias foram ~54% maiores ($p<0.05$) no grupo que recebeu injeções de LPS enquanto a porcentagem volumétrica de fibroblastos e feixes de fibras colágenas foram ~10,8% menores ($p<0.05$). Observou-se queda de ~23% de células inflamatórias e aumento de 63% de fibroblastos e feixes de fibras colágenas quando os camundongos receberam dietas enriquecida com os flavanonas cítricas ou naproxeno ($p<0.05$).

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



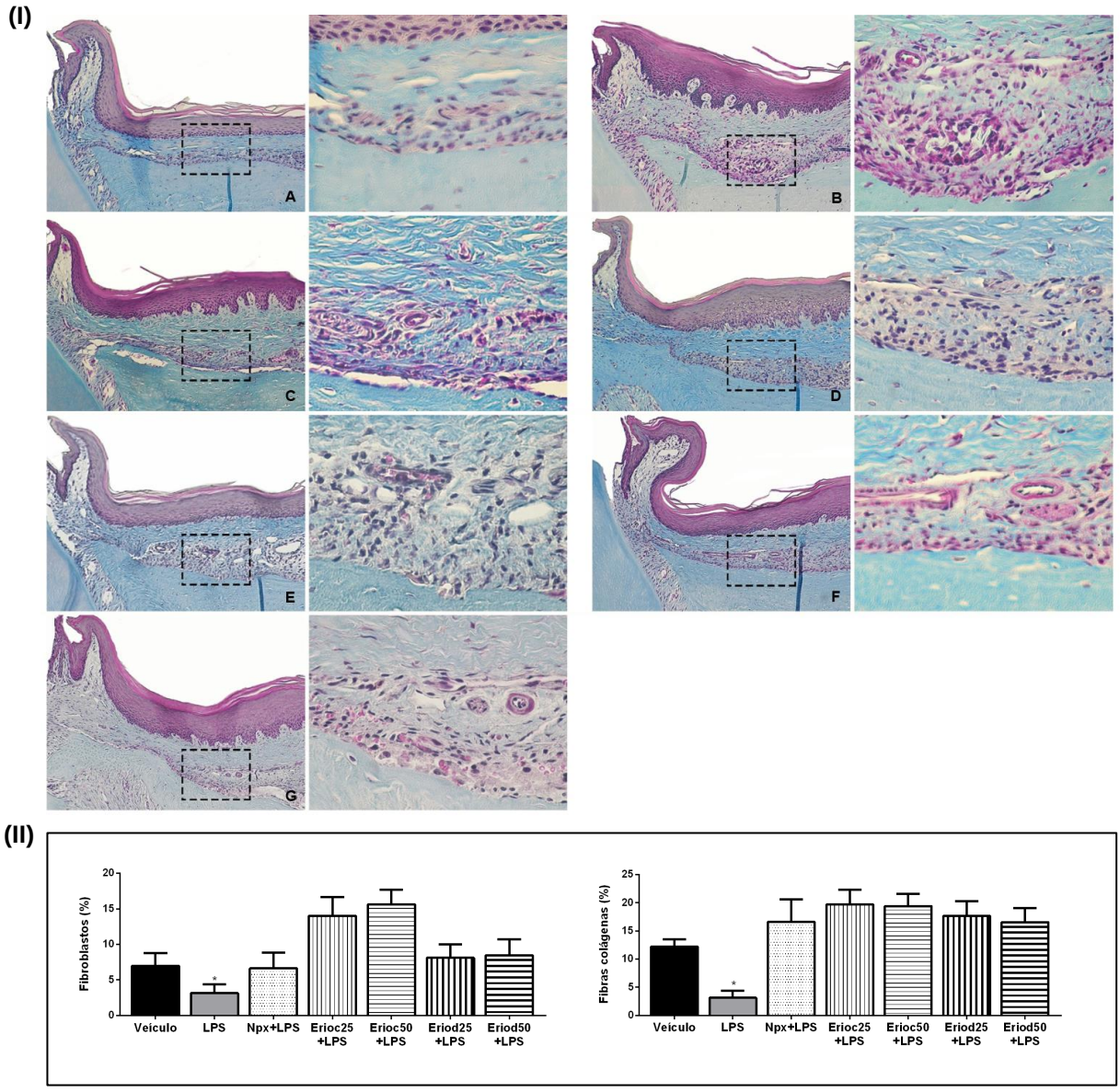
(I) Cortes transversais de maxila da região de primeiro molar superior direito de camundongos tratados com: (A) Veículo, (B) LPS, (C) naproxeno, (D e E) 25 e 50mg/kg de peso corporal/dia de eriocitrina, (F e G) 25 e 50mg/kg de peso corporal/dia de eriodictiol. Observa-se presença de intenso infiltrado inflamatório no grupo tratado com LPS quando comparado ao grupo veículo. Os tratamentos com naproxeno ou flavanonas atenuaram o processo inflamatório em relação ao grupo LPS (H/E10x e 40x). **(II)** As médias das densidades volumétricas (%, ± desvio padrão) de células polimorfonucleares e mononucleares diminuíram quando os animais foram tratados com flavanonas cítricas em relação 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 Picro Sirius 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 e E) 25 e 50mg/kg de peso corporal/dia de eriocitrina, (F e G) 25 e 50mg/kg de peso corporal/dia de eriodictiol. Observa-se presença de infiltrado de eosinófilos no grupo tratado com LPS quando comparado ao grupo veículo. Os tratamentos com naproxeno ou flavanonas cítricas atenuaram o infiltrado eosinófilo quando comparado grupo LPS (Picro Sirius Red modificado.40x e 60x). **(II)** As médias das densidades volumétricas (%, ± desvio padrão) eosinófilos diminuíram quando os animais foram tratados com naproxeno ou flavanonas cítricas em relação 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



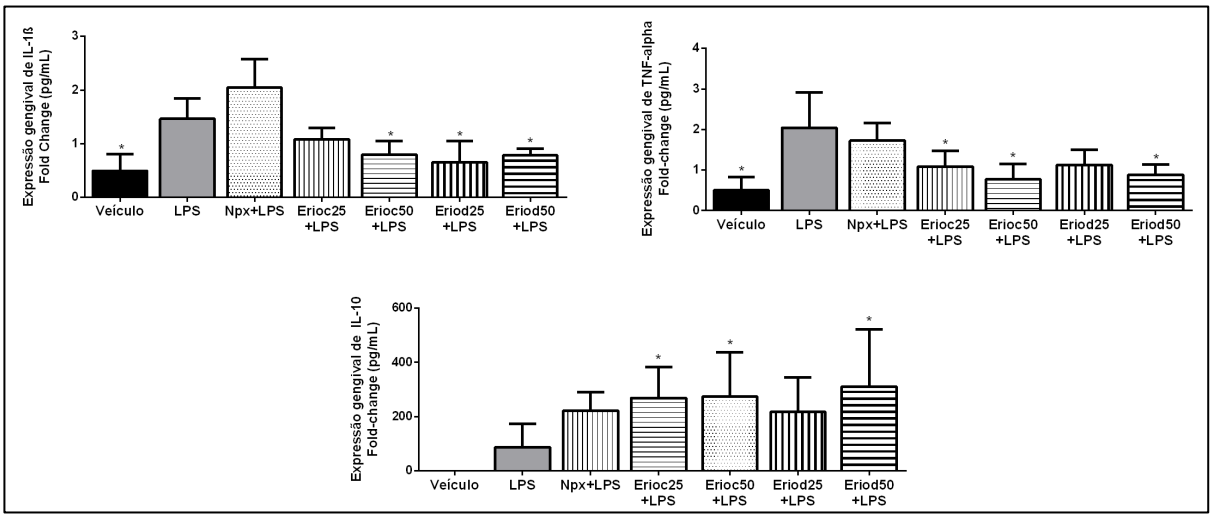
(I) Cortes transversais de maxila da região de primeiro molar superior direito de camundongos tratados com: (A) Veículo, (B) LPS, (C) naproxeno, (D e E) 25 e 50mg/kg de peso corporal/dia de eriocitrina, (F e G) 25 e 50mg/kg de peso corporal/dia de eriodictiol. Observa-se diminuição de matriz extracelular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

Fonte: Elaboração própria

5.6 A Suplementação Alimentar com Flavanonas Cítricas Atenuou a Expressão de Citocinas Inflamatórias da Região de Mucosa Palatina do Primeiro Molar Superior Direito de Camundongos que Receberam Injeções de LPS

Foram analisadas as concentrações de IL-1β, TNF-α e IL-10 na mucosa palatina adjacente ao primeiro molar superior para avaliar se suplementação com flavanonas cítricas atenuou a expressão desses analitos. Os dados mostraram que a suplementação com 50mg/kg de peso corporal/dia de eriocitrina ou eriodictiol induziu ~45% de queda da expressão de IL-1β comparado ao grupo LPS ($p<0.05$). Surpreendentemente, verificou-se que a suplementação com naproxeno induziu aumento de ~18% dessa citocina quando comparado ao grupo LPS (Figura 9). Observou-se queda das concentrações de TNF-α nos grupos tratados com 25mg/kg ou 50mg/kg de peso corporal/dia de eriocitrina e com 50mg/kg de peso corporal/dia de eriodictiol em relação ao grupo LPS. Em contrapartida detectou-se aumento da expressão de IL-10 (Figura 9) nos grupos tratados com ambas concentrações de eriocitrina e com 50mg/kg de peso corporal dia de eriodictiol ($p<0.05$) quando comparado ao grupo LPS.

Figura 9 - Concentração tecidual de citocinas inflamatórias dos grupos suplementados com flavanonas cítricas

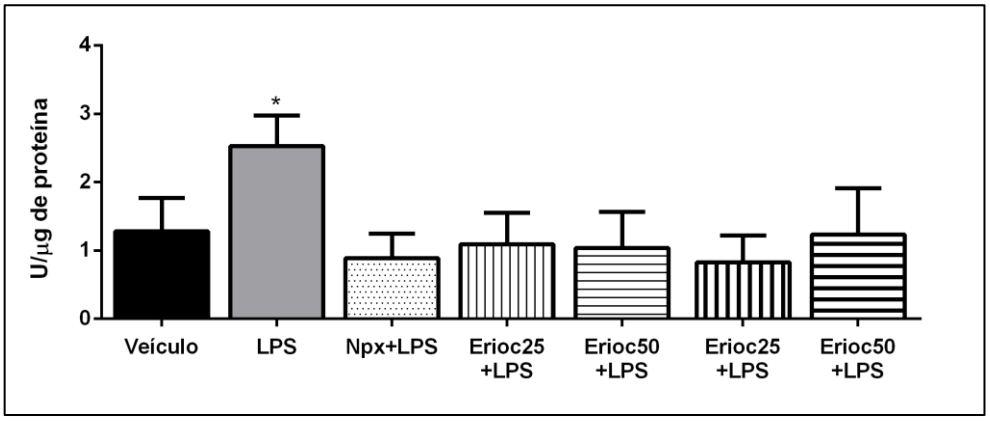


Dados expressos como média ± desvio padrão sendo *$p<0.05$ em relação ao LPS. Análise estatística foi feita utilizando ANOVA e teste t de tukey ao nível de 5%. Fonte: Elaboração própria.

5.7 Houve Queda da Atividade de MPO Quando os Animais Receberam Dieta Enriquecida com Flavanonas Cítricas

Após a injeção de LPS na mucosa palatina a atividade de MPO aumentou significativamente no grupo LPS ($p<0.05$). Observou-se queda de ~58% da atividade de MPO nos grupos que receberam suplementação com naproxeno ou com ambas as dosagens de eriocitrina ou eriodictiol quando comparado ao grupo LPS ($P<0.05$) (Figura 10).

Figura 10 - Atividade de mieloperoxidase

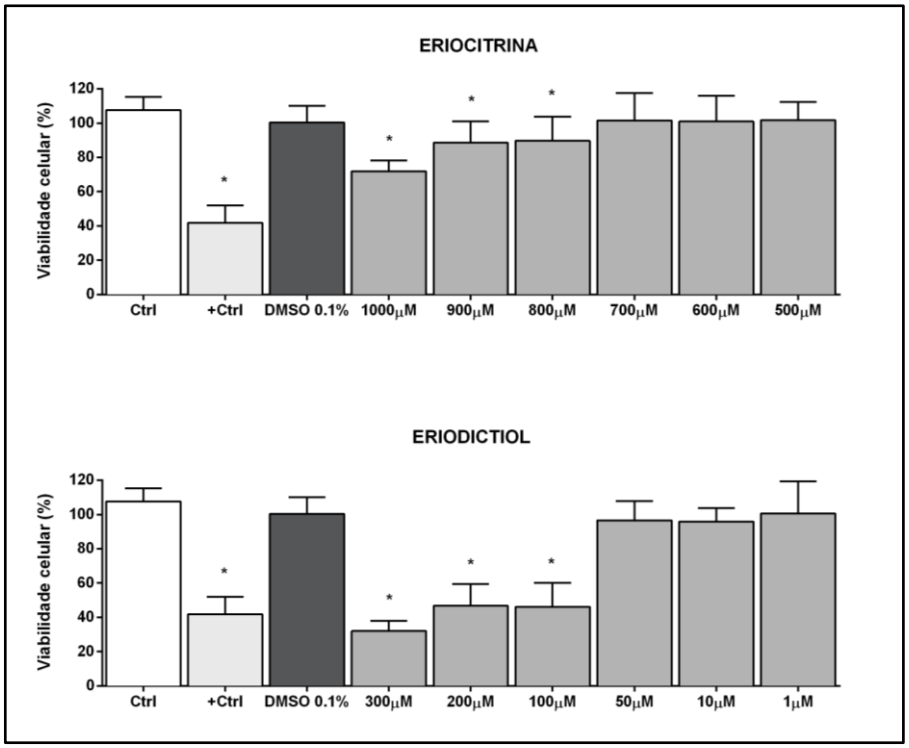


Dados expressos como média ± desvio padrão sendo *$p<0.05$ em relação aos demais grupos. Análise estatística foi feita utilizando ANOVA e teste t de tukey ao nível de 5%.
Fonte: Elaboração própria.

5.8 Citotoxicidade dos Flavonoides

Os efeitos citotóxicos de eriocitrina e eriodictiol estão representados na Figura 11. A porcentagem da viabilidade celular de fibroblastos L929 após 48 horas com diferentes concentrações dos flavonoides testados mostrou uma diminuição significante nas concentrações de 1000µM, 900µM e 800µM para eriocitrina e 300µM, 200µM e 100µM para eriodictiol. Entretanto, concentrações menores de eriocitrina (700 µM, 600 µM e 500µM) e eriodictiol (50µM, 10µM e 1µM) não mostraram efeitos citotóxicos ($p>0,05$).

Figura 11 - Efeitos citotóxicos da eriocitrina e eriodictiol



Viabilidade de fibroblastos L929 (%) após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de eriocitrina e eriodictiol. *Diferença estatisticamente significante em comparação ao grupo controle (ANOVA, p <0,05).
Fonte: Elaboração própria.

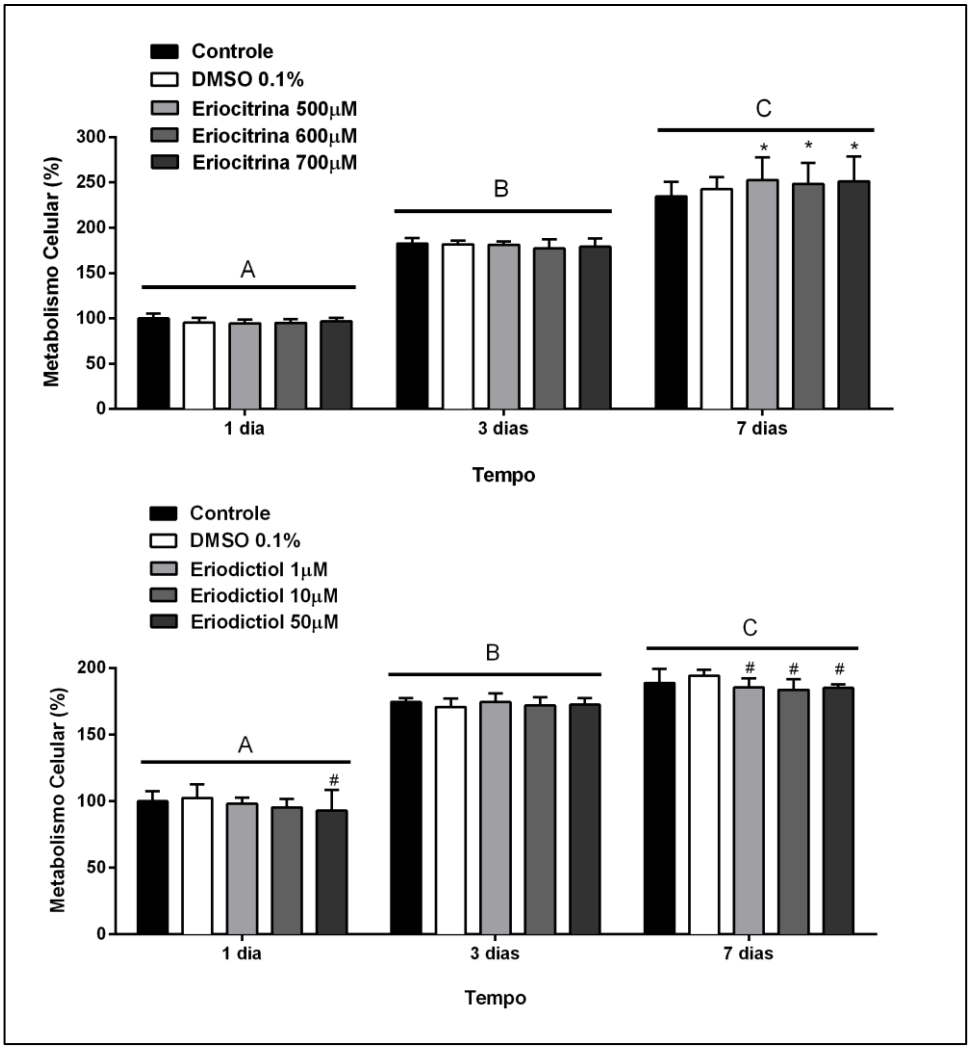
5.9 Atividade Metabólica de Fibroblastos L929

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 estatisticamente significativa entre os grupos submetidos ao tratamento com eriocitrina e eriodictiol, quando comparados ao grupo controle nos períodos de 1 e 3 dias, independente das concentrações avaliadas (p>0,05).

Após 7 dias de tratamento com eriocitrina observou-se um aumento significativo na proliferação celular (Figura 12). No entanto, nos períodos de tratamento com eriodictiol pode-se observar que as diferentes concentrações avaliadas não estimularam o aumento do metabolismo de fibroblastos (p>0.05) porém notou-se uma

redução no metabolismo no grupo tratado com eriodictiol 50 µM em relação ao grupo DMSO 0.1% no período de 1 dia. Da mesma forma, no período de 7 dias, as concentrações de eriodictiol de 50 e 10 µM mostraram uma redução significante quando comparadas ao grupo DMSO 0.1% (p<0.05).

Figura 12 - Atividade metabólica após tratamento com eriocitrina ou eriodictiol



Atividade metabólica de fibroblastos L929 (%) após 1, 3 e 7 dias de tratamento com eriocitrina 500, 600 e 700 µM ou com eriodictiol 1, 10 e 50 µM. Letras maiúsculas permitem comparações entre os tempos para o mesmo grupo. *p< diferença estátistica em relação ao controle. # Diferença estátistica em relação ao DMSO. (ANOVA two-way, p<0,05).
Fonte: Elaboração própria.

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[103]. De modo geral, são os inúmeros estudos da patogênese das doenças, suportados por técnicas de biologia molecular, que levam a descoberta de novas moléculas biologicamente ativas, que por sua vez auxiliam no desenvolvimento de produtos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins diagnósticos[104]. 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[52]. Estratégias nas mudanças dos 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[9,105].

No estágio atual do nosso conhecimento sobre o uso de flavanonas cítricas especialmente 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 (componente da parede celular de bactérias gram-negativas) de *Escherichia coli* é um ligante dos receptores Toll-Like 4 (TLR4) 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[106,107]. 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[108–110]. A linhagem de camundongos BALB/c é utilizada em experimentos que objetivam estudar inflamação/repostas imunológicas na região periodontal cuja patogênese se parece com a artrite reumatoide[93,111–114]. Estudos anteriores avaliaram a suscetibilidade genética entre diferentes linhagens de camundongos para induzir doença periodontal experimental. Os resultados mostraram maior perda óssea alveolar em camundongos AKR/J, DBA/2J, BALB/cJ enquanto as linhagens de camundongos A/J, A/HeJ, 129/J,

SJL/J e C57BL/6J foram mais resistentes[115]. O uso de animais de padrão SPF mostrou-se necessário pois estes são livres de contaminantes específicos que poderiam interferir ou acentuar a reação inflamatória induzida por um determinado microrganismo[9]. 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[116,117].

Verificou-se que todos os camundongos que receberam injeções de LPS e suplementação de flavanonas 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.[15] (2019), Kwon et al.[79] (2019) e Ferreira et al.[52] (2016), 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[65]. As concentrações de 25 ou 50 mg/kg de peso corporal/dia das flavanonas cítricas, foram baseadas em trabalhos anteriores, os quais demostraram que ambas as concentrações mostraram bem toleradas e ativas em variados protocolos experimentais[15,82–84]. 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[118,119]. Em animais de laboratório os flavonoides cítricos podem ser administrados via gavagem ou adicionado na dieta[1,52]. 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[120–122]. 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[78,123]. 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 flavanonas 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 flavanonas podem ser benéficas para a saúde de forma geral incluindo a saúde hepática[52].

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[124,125]. 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[87,126,127]. Está bem estabelecido que agem na inibição das COX 1 e 2 que estão envolvidas durante a ativação da cascata do ácido araquidônico[128]. 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[129]. 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 já amplamente

descrita[93,130,131]. 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, enzimas, peptídeos e proteínas, como o MPO e o 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[132]. 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[133–136]. 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[136,137]. Verificou-se no presente trabalho através da estereometria, queda da densidade volumétrica de feixes de fibras colágenas que poderia entre outra teoria ser explicada pela ação dos produtos dos secretados por neutrófilos e eosinófilos que são conhecidamente ativos no processo inflamatório. Tem-se que se levar em consideração que além do aumento da porcentagem de polimorfonucleares também observou-se 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 ligar-se ao TLR4 estimulam a liberação de uma série de citocinas pró e anti-inflamatórias no qual podem sensibilizar linfócitos e polimorfonucleares[138,139].

Através de ensaio da atividade de mieloperoxidase e imunoensaios multiplex, confirmou-se aumento de MPO, TNF-α, IL-1β, e diminuição de IL-10 nos grupos que receberam injeções de LPS de *E. coli* como previamente observado por Zhang et al. [140] (2016), Guimarães et al.[97] (2011); Molon et al.[141] (2014) e Lopes et al.[93] (2017) respectivamente**.** Está bem estabelecido que a inflamação é normalmente controlada por um balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias como por exemplo IL-1β, TNF-α e IL-10 respectivamente[142]. A IL-10 é uma citocina pleiotrópica também conhecida como fator inibidor da síntese de citocinas que inibi a produção de Interferon-γ (IFN-γ), além de inibir a apresentação de antígenos e a produção de IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-8, G-CSF e GM-CSF pelos macrófagos, favorecendo, a ação anti-inflamatória [143–148].

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.[130] (2019) e Aquino et al.[108] (2009) e confirmado pela análise de µCT. Sabe-se que de forma geral, o LPS de *E. Coli* liga-se e ativa TLR4, que é expresso na maioria das células, desencadeando a via de sinalização NF-κB que conduz a transcrição de diversos genes incluindo aqueles envolvidos na síntese de citocinas, como IL-1, TNF-α, IL-6, M-CSF e PGE_2. Quando determinadas citocinas, como por exemplo, IL-1β, TNF-α, PGE_2 são liberadas, ativam a diferenciação de osteoclastos e inativam osteoblastos, desequilibrando a remodelação óssea resultando na reabsorção[149–151]. Além disso, sabe-se que espécies reativas de oxigênio produzido por osteoclastos ativados estão envolvidos na reabsorção óssea[152,153]. No presente trabalho não avaliamos ou quantificamos nenhum marcador de espécies reativas de oxigênio como MDA, TBARS, 8-epiPGF2α, Etano e Pentano, LDL-ox, derivados da oxidação de proteínas Carbonilos e 3-Nitrotirosina.

A suplementação com flavanonas 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 associado ao aumento da formação óssea[32,33,40,41] através da modulação da produção de mediadores inflamatórios[154]. Sabe-se que flavonoides como o eriodictiol participam da redução na expressão de NFATc1, via esta que tem um papel fundamental no desenvolvimento de osteoclastos[46]. Por outro lado, alterações na morfologia dos osteoclastos pela ruptura dos anéis de actina mostrou ser outro mecanismos pelo qual os flavonoides parecem inibir a reabsorção óssea, visto que este processo depende da integridade do citoesqueleto de actina dos osteoclastos[46]. Além disso, sugere-se que o aumento da disponibilidade de antioxidantes no soro através da dieta parece prevenir danos oxidativo em células ósseas prevenindo a reabsorção óssea[152].

Foram detectados nos animais tratados com flavanonas respostas teciduais parecidas com aquelas observadas quando os animais foram tratados com naproxeno. Em ambos os casos se observou redução da densidade volumétrica de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares indicando possível ação anti-inflamatória nos tecidos avaliados. A queda da porcentagem de neutrófilos foi

confirmada pela redução da atividade de MPO nos tecidos que receberam injeções de LPS de *E. coli* e suplementados com flavanonas ou naproxeno.

Os fibroblastos são fundamentais para a manutenção da integridade do tecido gengival, pela regulação do metabolismo de fibras colágenas e proteoglicanos[155]. A partir da obtenção 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[156,157].

Para excluir os efeitos citotóxicos das flavanonas utilizadas no presente estudo testes de citotoxicidade foram realizados previamente. Em termos de possíveis aplicações clínicas futuras, os testes de citotoxicidade são essenciais na seleção de novos agentes potencialmente terapêuticos[158]. Concentrações ≥ 800 µM e ≥ 100 µM reduziram a viabilidade de células L929 tratadas com eriocitrina e eriodictiol respectivamente após 48h de incubação quando comparado ao grupo controle. Dados na literatura sobre os efeitos da citotoxicidade dessas flavanonas sobre fibroblastos são limitados. Entretanto o tratamento com eriodictiol nas concentrações de 5, 10 e 20 µM não alteraram a viabilidade celular em células RGC-5 mostrado por Lv et al.[159] (2019). Em fibroblastos de pulmão o tratamento eriodictiol mostrou baixa toxicidade com concentração inibitória de 50% (IC_{50}) de 410 µM após 24h conforme mostra o trabalho de Matsuo et al.[160] (2005). Os resultados de proliferação celular após 7 dias mostraram que, apenas o tratamento com eriocitrina independente da concentração utilizada, induziu o aumento da atividade metabólica de fibroblastos. San Miguel et al.[161] (2011), mostraram que determinadas concentrações de flavonoides promovem um aumento na quantidade de células endoteliais e fibroblastos gengivais humanos in vitro, embora, altas concentrações mostrem 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 dos fibroblastos, a ausência do estímulo pode reproduzir diferentes resultados. Neste contexto, Mokdad-Bzeouich et al.[162] (2016) mostraram um aumento da proliferação de linfócitos estimulados por LPS e tratados com eriodictiol. O ambiente experimental in vivo é completamente diferente daqueles observados in vitro. Vários fatores intrínsecos e extrínsecos tais como citocinas pró

inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento, interações celulares, que não foram utilizados no presente estudo podem influenciar no metabolismo dos fibroblastos em experimentos in vivo[163]. Outro fator que deve levar em consideração é que dependendo do tipo celular flavonoides podem interagir de diferentes maneiras, por exemplo flavanonas, incluindo, eriodictiol inibiram a proliferação de células de linhagens cancerígenas em diversos estudos in vitro [164–166]. Sugerindo assim um alto potencial anticancerígeno, inibindo a proliferação, induzindo apoptose e morte celular de diferentes tipos de células cancerígenas; no entanto o mecanismo celular destas flavanonas sobre a proliferação celular não está completamente elucidado.

Os resultados alcançados, sugerem que a suplementação com flavanonas ou naproxeno controlou a resposta inflamatória periodontal quando se observou redução da expressão de TNF-α, IL-1β 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-κB. Tais resultados estão em concordância com Kuo et al.[1] (2019) e Gugliandolo et al.[167] (2019) que verificaram queda da expressão das mesmas citocinas em doença periodontal experimental e trataram com suco de bergamota, rica em flavanonas, e hesperidina respectivamente. Gugliandolo et al.[167] (2019) verificaram, que a suplementação com suco de bergamota diminui a ativação de transcrição de NF-κB e consequentemente queda da expressão de citocinas pró-inflamatórias como por exemplo TNF-α e IL-1β.

A ativação do fator de transcrição NF-κB envolve duas principais vias de sinalização, via clássica e alternativa, ambas importantes para regulação da resposta imuno-inflamatória[16]. A ativação da expressão da via clássica do NF-κB foi sugerida como participante no desenvolvimento da doença periodontal experimental utilizado no presente trabalho[93,97]. 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[16,105]. A proteína NF-κB está normalmente sequestrada no citoplasma por uma família de proteínas inibidoras, incluindo membros da família IκB. Durante o curso da inflamação IκB é fosforolizado e degradado após o reconhecimento do estímulo e consequentemente NF-κB 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 celular envolvidas na inflamação como aquelas por nós observadas no presente trabalho[105]. Sabe-se que os flavonoides são

conhecidos por regular a atividade de IκB e NF-κB, com impacto direto na ativação celular[105,168]. Entretanto as análises da expressão de IκB e NF-κB não foram realizadas. Enfatizamos que no presente trabalho observamos 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. Sugerimos que análises do processo pró resolutivo como as resolvinas, lipoxinas, protectinas e maresinas poderiam ser futuramente realizadas.

Finalmente, quando se avaliou o impacto da suplementação do naproxeno como um grupo controle, surpreendentemente observou-se aumento da expressão de IL-1β. Sabe-se que naproxeno é um inibidor não-seletivo de COX e consequentemente inibi a produção de prostaglandinas. As prostaglandinas que por sua vez regulam produção de leoucotrienos que participam da produção de IL-1β e TNF-α[32,169]. Aventou-se a hipótese que a queda de prostaglandinas indiretamente resultou no aumento de IL-1β. Adicionalmente tem-se que 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, como por exemplo, biossíntese de prostaglandinas, tromboxanas, leoucotrienos pela inibição da enzima fosfolipase A2[170,171], COX[172] ou Lipoxigenases[173], que poderiam ser avaliados em futuros trabalhos.

Os resultados mostraram claramente que as flavanonas eriocitrina ou eriodictiol foram capazes de suprimir a resposta pró-inflamatória sendo candidatas potenciais para esse fim. Em concordância aos fatos observados, estudos de biologia celular, modelos animais, e estudos clínicos demonstram que dieta com polifenóis tem importantes propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias resultando na melhora de marcadores clínicos da periodontite[174].

6 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

95 Anos 1923 - 2018 unesp

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	( ) Ensino (X) 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

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rua Humaitá nº 1680 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA – SP
5º andar – fone: (16) 3301-6459 / fax: (16) 3301-6433 / [illegible]

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

Jhonatan de Souza Carvalho