



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ACÇÃO DE AZADIRACHTA INDICA (NEEM) EM PATOLOGIAS
DA CAVIDADE ORAL**

Trabalho submetido por
Luís Francisco Serrão Coelho Gaspar
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Outubro de 2019



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ACÇÃO DE AZADIRACHTA INDICA (NEEM) EM PATOLOGIAS
DA CAVIDADE ORAL**

Trabalho submetido por
Luís Francisco Serrão Coelho Gaspar
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita

Outubro de 2019

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita toda a dedicação, disponibilidade e atenção que teve comigo em todas as situações, estando sempre disposta a ajudar na melhoria da minha tese.

Agradeço de um modo particular aos Prof. Doutores Ana Cristina Manso, José João Mendes, Paulo Maurício e Dr. João Rua, em determinados momentos do meu percurso académico foram bastante importantes e é nesses momentos que se vê a grandeza das pessoas.

A todas as pessoas que trabalham nesta faculdade, pela forma como recebem os alunos, transmitem o conhecimento e os ajudam na sua evolução.

Resumo

Presentemente surgiu um aumento de artigos científicos que avaliam *in vitro* e *in vivo*, extractos de plantas, para futura aplicação em Medicina Dentária. Nas últimas décadas, estudos *in vitro* têm identificado fitoquímicos de *Azadirachta indica* que actuam na terapia e prevenção das várias doenças orais.

Os limonóides ou triterpenóides, estão incluídos numa grande variedade de compostos naturais são os mais promissores no cancro oral, a árvore *Neem* é uma das fontes mais ricas em limonóides. Alguns limonóides obtidos da árvore de *Neem* têm demonstrado em testes clínicos exercerem efeitos em várias linhas celulares cancerígenas.

Compreender o mecanismo de acção de cada molécula de *Neem* é essencial, para o desenvolvimento de compostos naturais mais eficazes na patologia oral neoplásica. Presentemente nimbolida, azadiractina, gedunina e a glicoproteína isolada das folhas são as moléculas melhor investigadas e testadas nos estudos *in vitro* e testes clínicos em relação aos outros limonóides de *Neem*, pela sua actividade anticancerígena.

A nível de patologia oral neoplásica, segundo os estudos realizados, *Neem* exerce efeitos citotóxicos no carcinoma oral das células escamosas, sarcoma e osteossarcoma. *Neem* apresenta na sua constituição química moléculas que poderão ser considerados seguras no tratamento e prevenção de várias patologias orais, regulam várias vias de sinalização oncogénicas, como o fator de transcrição NF- κ B, as vias de sinalização PI3K/AKT, WNT/beta-catenina e GSK-3 β . Estes compostos bioactivos actuam na angiogénese e em metástases, onde podem induzir apoptose das células tumorais.

Neem é constituída também por fitoquímicos que provocam uma acção antimicrobiana eficaz, exercem uma inibição no crescimento de bactérias, fungos e vírus, sendo importantes na inibição de microorganismos patogénicos a nível oral.

Testes clínicos realizados com extractos de *Neem* provaram ter uma boa sinergia com alguns fármacos utilizados em quimioterapia.

Palavras-chave: *Azadirachta indica* e cancro oral; *Neem* e endodontia; sinalização oncogénica; fitoquímicos de *Neem*.

Abstract

Currently there has been an increase in scientific articles evaluating in vitro and in vivo plant extracts for future application in dentistry. In recent decades, in vitro studies have identified phytochemicals of *Azadirachta indica* that act in the therapy and prevention of various oral diseases.

Limonoids or triterpenoids, included in a wide variety of natural compounds are the most promising in oral cancer, the Neem tree is one of the richest sources of limonoids. Some limonoids obtained from the Neem tree have been shown in clinical trials to exert effects on various cancer cell lines.

Understanding the mechanism of action of each Neem molecule is essential for the development of more effective natural compounds in oral neoplastic pathology. Presently nimbolide, azadiractin, gedunine and leaf glycoprotein are the best investigated and tested molecules in in vitro studies and clinical trials against other Neem limonoids for their anticancer activity.

At the level of neoplastic oral pathology, according to studies, Neem exerts cytotoxic effects on oral squamous cell carcinoma, sarcoma and osteosarcoma. Neem has in its chemical constitution molecules that can be considered safe in the treatment and prevention of various oral pathologies, regulate various oncogenic signaling pathways, such as transcription factor NF- κ B, signaling pathways PI3K / AKT, WNT / beta-catenin and GSK-3 β . These bioactive compounds act on angiogenesis and metastases, where they can induce apoptosis of tumor cells.

Neem is also made up of phytochemicals that cause effective antimicrobial action, inhibit the growth of bacteria, fungi and viruses and are important in inhibiting oral pathogens.

Clinical trials with Neem extracts have proven to have a good synergy with some chemotherapy drugs.

KEYWORDS: *Azadirachta indica* and oral cancer; Neem and endodontics; oncogenic signaling; phytochemicals from Neem.

Índice Geral

I. Introdução	13
II. Desenvolvimento	16
II.1. Constituição química de Neem	16
II.2. Evidências de efeitos fisiológicos benéficos dos fitoquímicos Nimbolida, Azadiractina, Gedunina e Glicoproteína de Neem no cancro oral.....	19
2.1. Carcinoma oral das Células Escamosas	19
2.1.1. Modo de acção dos Fitoquímicos de Neem na terapêutica do Carcinoma oral das Células Escamosas	21
2.1.1.1. Activação da apoptose	21
2.1.1.2. Inibição da angiogénese e metástase tumoral	27
2.2. Sarcomas	37
2.2.1 Osteossarcoma	41
2.2.1.1. Avaliação do fitoquímico Nimbolida na terapêutica do Osteossarcoma	43
2.3. Combinação de fitoquímicos de Neem com a Quimioterapia.....	48
II.3. Evidências da actividade antimicrobiana de Neem na Microbiota Oral.....	50
3.1. Avaliação da actividade dos fitoquímicos de Neem em Endodontia	50
II.4. Evidências da acção de Neem na Candidiase Oral	60
II.5. Evidências da acção de Neem na Periodontite	64
II.6. Evidências da acção de Neem na Gengivite.....	67
II.7. Evidências da acção de Neem no Vírus Herpes Simples-1.....	71
II.8. TOXICIDADE DE NEEM.....	74
III. Conclusões	74
IV. Referências Bibliográficas.....	76

Índice de Figuras

Figura 1- <i>Azadiractha indica</i> (Neem). A – árvore; B – folhas; C – flores; D – frutos (Patel et al., 2016).....	13
Figura 2- Estrutura Química base dos limonóides (Adaptado de Ponnusamy et al., 2015).....	18
Figura 3- Tipos de limonóides, anel fechado (A) e anel aberto (B) (Adaptado de Aarthi et al., 2018).....	18
Figura 4- Carcinoma oral das células escamosas localizado no lábio (Adaptado de Raguezi et al., 2008).....	20
Figura 5- Imagem intra-oral do carcinoma das células escamosas da gengiva, 4º quadrante, zona posterior (Singh & Schenberg, 2013).....	20
Figura 6- Imagem de ortopantomografia demonstrando um zona radiotranslúcida no 4 quadrante, associada ao carcinoma das células escamosas (Singh & Schenberg, 2013).	20
Figura 7- Testes clínicos realizados em animais usando o DMBA (Adaptado de Sophia et al., 2018).....	22
Figura 8- Estrutura química de Nimbolida (A), Azadiractina (B),e Gedunina(C) (Adaptado de Nagini, 2014).	23
Figura 9- Estrutura química da molécula nimbolida (A) (Adaptado de Chien et al., 2017).....	23
Figura 10- Apoptose mediada pelos receptores da superfamília dos factores de necrose tumoral (TNF) (Adaptado de Lodish et al., 2008).....	26
Figura 11- Competição entre Azadiractina e a proteína P53 pela ligação a MDM2. Proteína MDM2 – cor rosa; Azadiractina – cor azul; proteína P53 - cor verde; ligação nos resíduos hidrofóbicos – cor amarela (Adaptado de Gupta, 2018).....	27
Figura 12- Estrutura química da molécula gedunina (Adaptado de Nagini, 2014).....	30
Figura 13- Actividade do fitoquímico nimbolida na metástase tumoral e angiogénese (Adaptado de Kowshik et al., 2017).....	32
Figura 14- Proteína RECK como regulador da via de sinalização Notch (adaptado de Gutiérrez et al., 2015).....	33
Figura 15- Representação esquemática de gedunina, nimbolida e azadiractina as 3 moléculas principais que actuam nas diferentes vias de sinalização oncogénicas (Nagini, 2014).....	35
Figura 16- Activação da via de sinalização WNT (Adaptado de Golpich et al., 2015). 35	
Figura 17- Ligação da molécula nimbolida à proteína AKT. Azul - nimbolida; laranja – proteína AKT; verde – ligações de hidrogénio entre nimbolida e resíduos específicos da proteína AKT (Raja, Elayapillai, Priya, & Balakrishnan, 2016).....	36
Figura 18- Mecanismo de acção de nimbolida no carcinoma oral das células escamosas provocado por DMBA (Sophia et al., 2016).	37
Figura 19- Apoptose via perforina/granzima (Apraiz, 2011).....	40

Figura 20- Mecanismo de apoptose via Fas-FasL (Adaptado de Lodish et al., 2004)...	41
Figura 21- Osteossarcoma na mandibula (Jornal of oral Maxillofacial Pathology.).....	42
Figura 22- Osteossarcoma na maxila (Adaptado de Prabhusankar et al., 2016).	42
Figura 23- Radiografia onde se observa osteossarcoma da mandibula (Adaptado de Naik et al., 2014).	43
Figura 24- Diferentes vias de apoptose provocadas por stress no retículo endoplasmático (RE) (Adaptado de Bahar et al., 2016).	45
Figura 25- Resposta celular ao efeito das espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Adaptado de Wojcik, Kaminska, Blasiak, & Szaflik, 2013).....	47
Figura 26- Formação do biofilme nas superfícies dentárias. A - formação da película; B - adesão inicial; C - maturação; D - dispersão (Adaptado de Huang et al., 2011).	53
Figura 27- Camada de smear layer na parede do canal radicular após a instrumentação (Adaptado de Haapasalo et al., 2014).	54
Figura 28- Parede do canal radicular onde foi utilizado NaOcl durante a instrumentação endodôntica e no final foi usado o irrigante EDTA (Adaptado de Haapasalo et al., 2014).	56
Figura 29- Comparação realizada em percentagem, na redução de microorganismos formados em meio anaeróbio. Grupo I – hipoclorito de sódio; grupo II – gluconato de clorexidina; grupo III – extracto etanólico da folha de neem; grupo IV – combinação de hipoclorito de com extracto etanólico da folha de neem; grupo V – combinação de clorexidina com extracto etanólico da folha de neem; grupo VI – solução salina (Adaptado de Dutta & Kundabala, 2014).	59
Figura 30- A – candidíase pseudomembranosa; B – candidíase eritematosa aguda (Adaptado de Jabra-rizk et al., 2016).	61
Figura 31 - Manifestações clínicas da estomatite protética (Adaptado de Jabra-Rizk et al., 2016).	62
Figura 32- Condicionador de tecidos usado em próteses (Revista Brasileira de Prótese Clínica & laboratorial, 2003).	63
Figura 33 - Estruturas químicas dos polifenóis e uma hipótese de modelo na sua classificação (Adaptado de Ding, Jiang, & Fang, 2018).	65
Figura 34- Estrutura química base dos flavonoides (Adaptado de Li, Zhang, & Chen, 2018).	65
Figura 35- Uma hipótese de mecanismo que mostra o efeito dos flavonóides na inflamação (Adaptado de Leyva-lópez et al., 2016).	67
Figura 36- Modelo de produção de polissacarídeos insolúveis em Streptococcus mutans (Adaptado de Bowen & Koo, 2011).	68
Figura 37- Manifestações clínicas do HSV (Consolaro & Consolaro, 2009)	72
Figura 38- Mecanismo de entrada do vírus HSV na célula hospedeira (Adaptado de Šedý, Spear, & Ware, 2008).	72
Figura 39- Infecção ocular do HSV-1, provocando conjutivite (Adaptado de Uchio, Takeuchi, Itoh, Matsuura, & Ohno, 2000).	73

Índice de Tabelas

Tabela 1- Compostos de Neem (Adaptado de Paul, Prasad, & Sah, 2011).....	15
Tabela 2- Classificação dos compostos de Neem, compostos isoprenóides e não-isoprenóides (Adaptado de Patel et al., 2016).	17
Tabela 3- Tipos de sarcomas originários na cabeça e pescoço (Adaptado de rapidis, 2008).....	38

Lista de Abreviaturas

ADAM-10 – Proteína desintegrina e metaloproteinase-10
AIF – Factor indutor da apoptose
AKT ou PKB – Proteína quinase B
APAF-1 – Protease apoptótica activadora do factor 1
ATF6 – Factor de transcrição activado 6
BAX – Proteína X da família Bcl-2
BAD – Agonista de morte celular da família Bcl-2
BAK – Proteína de morte antagonista homóloga a Bcl-2
Bcl-2 – Linfoma de células Bcl-2
Bcl-XL – Linfoma de células B extra grande
BID – Domínio de morte de interacção com BH3
COX – ciclo-oxigenase
CYP – Citocromo P450
°C – Graus célsius
CK1 – caseína kinase 1
CDK4 – Kinase 4 dependente de ciclina
CD3+ - Linfócitos T
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DMBA – 7,12-dimetilbenzantraceno
EGF - Factor de crescimento epidérmico
ECM – matriz extra celular
ERK – Kinase reguladora por sinal extracelular
eIF2 alfa – Factor de iniciação eucariota 2 alfa
Fas ou CD95 ou APO-1 – Receptor ou proteína da membrana pró-apoptose
Fas ligante ou CD95L – Proteína da membrana que se liga ao Fas
FADD – Dominio de morte associado ao Fas
H2O2 – Peróxido de hidrogénio
HOCl – Ácido hipocloroso
HIV – Virus da imunodeficiência humana
IGF – Factor de crescimento de insulina
IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6
IL-13 – Interleucina 13
IL-10 – Interleucina 10
IKB – Proteína inibidora KB
IKK – Inibidor KB kinase
IKKalfa – Inibidor KB kinase subunidade alfa
IKKbeta – Inibidor KB kinase subunidade beta
IRE1 – Enzima 1 requer inositol
Mdm2 – Duplo mutante murino 2 (murine double mutante 2)
MDSCs – Células supressoras derivadas de células mielóides
MAPK – Proteínas kinases activadas por mitógenos
MARK – *Microtubule-affinity-regulating-kinase protein*
MCL-1 - Proteína de diferenciação celular de leucemia mielóide induzida
MMPs – Metaloproteinases da matriz
miR-21 – Oncogene micro RNA-21
Notch – Genes que regulam vários eventos fisiológicos como sobrevivência, proliferação, diferenciação e apoptose nos diferentes tecidos celulares
NOXA – gene pró-apotótico
NF-KB – Factor nuclear-KB
Na⁺ - Sódio
NK – Células natural killer
Ocl – Iões hipoclorito
PARP – Poli (ADP-ribose) polimerase
PCR – Reacção de cadeia da polimerase
PKA – Proteina kinase A
P21 – Proteina inibidora do ciclo celular de 21KDa
P53 – Fosfoproteina nuclear de 53 KDa
Ph – Potencial Hidrogeniónico
PTEN – Fosfatase homóloga à tensina
PI3K – fosfoinositol-3 kinase
PDK – Quinase dependente de fosfatidilinositol
RNA – Ácido ribonucleico
RECK – Proteína indutora da reversão tumoral rica em cisteína com motivos KASAL
STAT3 – Activadores da transcrição e transduções de sinal 3

TNFR1 – Receptor 1 do factor de necrose tumoral

TRADD – Domínio de morte associado ao receptor TNF

TNFR – Receptor do TNF

TCD8+ - Linfócitos T citotóxicos CD8+

TNF – Factor de necrose tumoral

T regs – Células T reguladoras

Wnt/B-catenina – *Wingless* (drosófilas mutantes sem asas)/Beta-catenina

uPA – Ativador plasminogénio uroquinase

VEGR – Receptor do factor de crescimento vascular endotelial

VECs – Células vasculares endoteliais

I. Introdução

A natureza sempre foi a base para a descoberta de moléculas na produção de medicamentos para a saúde em humanos. Existe uma necessidade em Medicina Dentária de investigar novas terapêuticas baseadas em princípios activos vegetais, *Azadiractha indica* (Neem) é constituída quimicamente por moléculas desconhecidas que futuramente poderão beneficiar o tratamento das várias patologias da cavidade oral.

Neem pertence à família das Meliaceais, é uma árvore perene que se pode encontrar abundantemente na Austrália e em vários países do sul da Ásia (Figura 1) (Saleem, Muhammad, Hussain, & Bukhari, 2018).



Figura 1- *Azadiractha indica* (Neem). A – árvore; B – folhas; C – flores; D – frutos (Patel et al., 2016).

Tem sido usada na Índia para a limpeza dos dentes e manutenção da saúde dos tecidos do periodonto. As folhas, sementes e casca são utilizadas para fazer a higiene oral, ainda existe um hábito nas pessoas de fazerem mastigação a seguir às refeições com estas partes da árvore (Chava VR. Manjunath SM. Rajanikanth AV. Sridevi N., 2012; Rao et al., 2014). Esta planta é utilizada na medicina praticada na Índia, América do sul e Ásia para tratar várias doenças humanas (Nagini, 2014). Durante vários séculos, no oriente, esta planta medicinal tratou febre, infecções virais, hipertensão e inflamação (Aparecida & Mossini, 2005).

A procura de moléculas naturais com potencial curativo, preventivo e baixos efeitos secundários, tem aumentado durante as últimas décadas (Aparecida & Mossini, 2005). Presentemente têm sido identificados inúmeros compostos em extractos de Neem

incluídos no grupo dos limonóides e polifenóis (He et al., 2016). A acção medicinal de Neem é atribuída às diferentes moléculas bioactivos derivadas do metabolismo secundário da planta (Saleem et al., 2018).

Os isoprenóides ou também designados de terpenos, constituem uma das maiores classes de compostos naturais, representando mais de 40 mil compostos individuais (Chien et al., 2017; de Santana Souza et al., 2014; Sastry et al., 2006). Apresentam um enorme potencial medicinal, estes fitoquímicos provêm do metabolismo secundário de algumas espécies vegetais e microorganismos derivando de duas principais vias biossintéticas, ácido mevalónico e 5-fosfato-1-desoxi-D-xilulose respectivamente (Aarthy et al., 2018; Guimarães, Serafini, & Quintans-Júnior, 2014; Silva et al., 2019).

Neem apresenta vários fitoquímicos com uma estrutura química diversificada (P. Sarkar et al., 2016). Existem mais de 135 compostos isolados das várias partes da árvore, em que foi determinada a sua estrutura química, descritos através da literatura científica (Pandreka et al., 2015; Ponnusamy et al., 2015; Rout & Mishra, 2014). As folhas, contém pelo menos 35 compostos biologicamente activos (Tabela 1) (Dasgupta, Banerjee, Yadava, & Rao, 2004).

O objectivo desta monografia foi pesquisar, analisar e descrever os principais compostos bioactivos constituintes desta planta e a sua actividade biológica em patologias da cavidade oral, considerando as evidências científicas disponíveis como testes *in vitro* e testes clínicos. A metodologia efectuada foram as duas principais bases de dados PubMed e B-on nas áreas da neoplasia oral e microbiologia oral, para isso utilizei palavras chave principais como *Azadirachta indica* e cancro oral, Neem e endodontia, sinalização oncogénica, fitoquímicos de Neem. Contribuindo assim nesta linha de pesquisa para evidenciar todo o potencial terapêutico da planta em Medicina Dentária.

	Nome dos constituintes	Fórmula química	Ponto de fusão (°C)	Extração
1	Nimbin	C30H36O9	205	Óleo assencial, tronco, e casca da raiz
2	Nimbinina	C28H34O6	202	Óleo assencial, tronco, e casca da raiz
3	Ácido Nimbídico (Ácido salânico)	C26H34O7	228	Óleo essencial
4	Salannin	C34H44O9	167	Óleo essencial
5	Desacetil nimbin	C28H34O8	208	Sementes e casca
6	Nimbolida	C27H30O7	245	Folhas
7	Meliantriol	C30H50O5	176	Óleo essencial
8	Azadirone	C28H36O4	192	Óleo essencial
9	Epoxyazadiradione	C28H34O6	202	Óleo essencial
10	Azadiradione	C28H34O5	205	Óleo essencial
11	Gedunin	C28H34O7	218	Óleo essencial
12	7-Desacetil Gedunin	C26H34O6	259	Óleo essencial
13	Meldenina	C28H38O5	240	Óleo essencial
14	Salannin-lactona	C34H44O10	244	Óleo essencial
15	Nimbina-lactona	C30H36O10	184	Óleo essencial
16	Azadiractina	C35H44O16	155	Sementes
17	Vepinina	C28H36O5	-	Óleo essencial
18	Nimbolin A	C39H46O8	180	Tronco
19	Nimbolin B	C39H46O10	243	Tronco
20	Nimbidinina	C26H34O6	282	Óleo essencial
21	Vilasinin	C26H36O5	255	Folhas
22	Nomolin	C28H34O6	205	Frutos
23	Nimolicina	C28H34O5	166	Frutos
24	17 β -Hidroxi-azadiradiona	C28H34O6	177	Frutos
25	17-Epi-azadiradione	C28H34O5	205	Frutos
26	1 α -Metoxi-1,2-dihidroepoxi-azadiradiona	C29H38O7	235	Sementes
27	1 β , 2 β -Diepoxy-azadiradione	C28H34O7	110	Sementes
28	7-Acetilneotrichilenone	C28H36O5	208	Sementes
29	7-Desacetil-7 α -benzoilgedunina	C33H36O7	278	Sementes
30	Nimbineno	C28H34O7	134	Óleo essencial, folhas e casca
31	6-Desacetil nimbineno	C26H32O6	141	Óleo essencial, folhas e casca
32	Nimbandiol	C26H32O7	121	Óleo essencial, folhas e casca
33	6-o-Acetil-nimbandiol	C28H34O8	178	Óleo essencial
34	3-Desacetilsalannin	C32H42O8	214	Óleo essencial
35	Salannol	C32H44O8	208	Óleo essencial
36	Glicoproteína da folha de Neem	-	-	Folhas

Tabela 1- Compostos de Neem (Adaptado de Paul, Prasad, & Sah, 2011).

II. Desenvolvimento

II.1. Constituição química de Neem

As folhas apresentam uma composição química complexa constituída por hidratos de carbono, proteínas, compostos sulfurosos e isoprenóides (Chitta et al., 2014). Vários testes clínicos têm evidenciado que os isoprenóides ou terpenos, apresentam benefícios na prevenção e terapia de várias patologias, possuem atividade, antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante e anticancerígena (Garg et al., 2014; P. Manikandan, Letchoumy, Gopalakrishnan, & Nagini, 2008; Zhou, Zhang, Wang, Xu, & Liao, 2017).

Os fitoquímicos extraídos de Neem são agrupados com base na ausência de unidades de isoprenóides ou com base na presença dessas unidades, podendo ser divididos em classes, pelo número de unidades de isoprenos (Tabela 2) (de Santana Souza et al., 2014; Patel et al., 2016).

Estes isoprenóides são um vasto grupo de biomoléculas que contém unidades estruturais repetidas de cinco carbonos conhecidas como unidades de isoprenos, estão unidos sequencialmente como (C5) n estruturas. De acordo com o número de unidades de isoprenos ou unidades C5 presentes a classificação é feita em hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (Guimarães et al., 2014; Silva et al., 2019).

Uma enorme quantidade de compostos foram isolados e caracterizados mas os limonóides ou tetranortripenóides são os principais responsáveis pelas propriedades terapêuticas, constituem um terço dos fitoquímicos de Neem (Tabela 2) (Nagini, 2014; Patel et al., 2016).

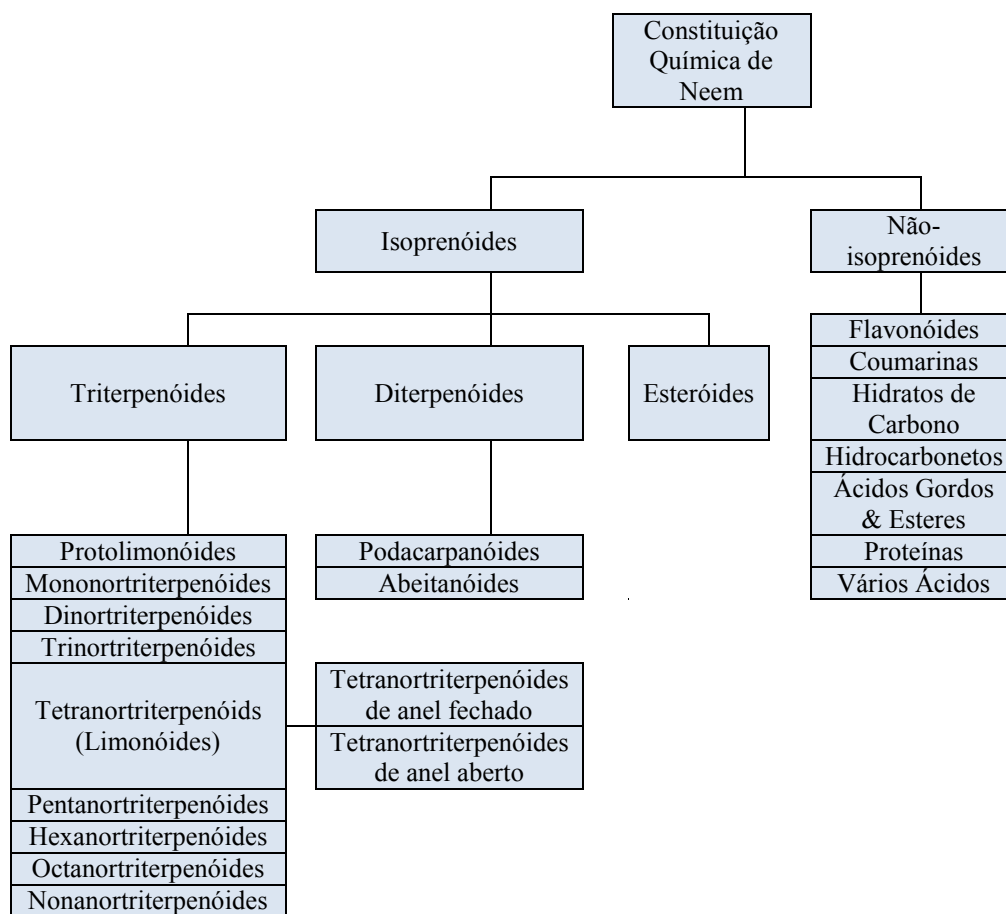


Tabela 2- Classificação dos compostos de Neem, compostos isoprenóides e não- isoprenóides (Adaptado de Patel et al., 2016).

Os limonóides pertencem à classe dos triterpenóides, as diferentes estruturas químicas dos triterpenóides são devido às alterações dos grupos funcionais (Pandreka et al., 2015). Os triterpenóides apresentam 30 átomos de carbono dispostos em 4 anéis com cadeias laterais curtas de átomos de carbono que possuem estrutura cíclica ou acíclica, são subdivididos em classes, baseadas na remoção de átomos de carbono a partir da estrutura química base ou a partir da cadeia lateral, caracterizados em protolimonóides, monotriterpenóides, dinotriterpenóides, trinotriterpenóides, tetranotriterpenóides, pentanotriterpenóides, hexanotriterpenóides, octanotriterpenóides e nonanotriterpenóides (Tabela 2).

Os protolimonóides apresentam como cadeia lateral C8 carbonos com todos os 30 átomos da estrutura química base, semelhantes à estrutura dos triterpenóides. Os monotriterpenóides, dinotriterpenóides, trinotriterpenóides, tetranotriterpenóides, pentanor, hexanor, octanor e nonanotriterpenóides são caracterizados pela perda de 1,2,3,4,5,6,7,8 e 9 carbonos da cadeia lateral respectivamente. Os limonóides estão

ligados a um anel de furano, na qual é formado pela perda de 4 átomos de carbono da cadeia lateral dos protolimonóides (Figura 2) (Patel et al., 2016).

A estrutura química base dos limonóides é constituída por 4,4,8-trimetil-17-furanilesteróide que é substituída por vários grupos funcionais, podem ser classificados em dois grupos, os intactos em anel com 4 anéis, 4,4,8-trimetil-17-furanilesteróide ou então pode haver uma clivagem de um ou mais anéis chamados limonóides de anel aberto, estes apresentam uma enorme actividade farmacêutica, conhecidos principalmente pela sua acção anticancerígena (Figura 3) (Haldar, Mulani, Aarthy, Dandekar, & Thulasiram, 2014; Kowshik et al., 2017; Pandreka et al., 2015; Ponnusamy et al., 2015).

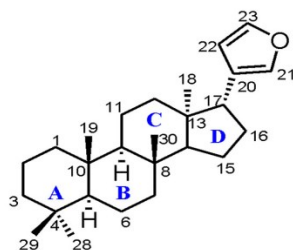


Figura 2- Estrutura Química base dos limonóides (Adaptado de Ponnusamy et al., 2015).

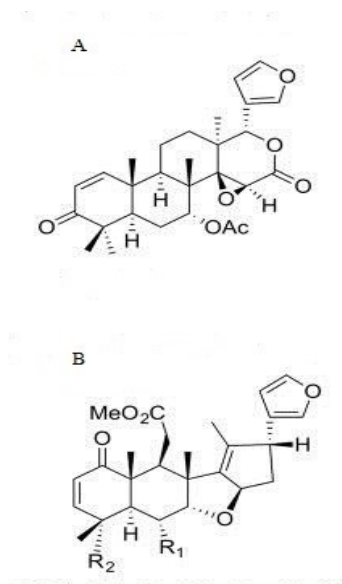


Figura 3- Tipos de limonóides, anel fechado (A) e anel aberto (B) (Adaptado de Aarthy et al., 2018).

II.2. Evidências de efeitos fisiológicos benéficos dos fitoquímicos Nimbolida, Azadiractina, Gedunina e Glicoproteína de Neem no cancro oral

2.1. Carcinoma oral das células escamosas

O cancro oral é classificado como pertencente ao grupo das patologias oncológicas da cabeça e pescoço, este grupo abrange vários locais anatómicos, incluindo faringe, tecidos moles da cabeça, tiróide, cavidade nasal, cavidade oral, glândulas salivares, seios perinasais e laringe (Sinevici & O'sullivan, 2016).

É uma doença multifactorial e uma das principais causas de morte em países desenvolvidos, sendo um grave problema de saúde a nível mundial (Alzohairy, 2016; Bodduluru, Kasala, Thota, Barua, & Sistla, 2014; Elumalai & Arunakaran, 2014).

A maioria das patologias malignas da cavidade oral, aproximadamente 95%, é carcinoma das células escamosas (Ferreira et al., 2018; Paz, Kao, Huang, & Chang, 2017). O cancro oral das células escamosas ou espinocelular da cavidade oral é um dos principais problemas de saúde, sendo o sexto cancro mais comum a nível mundial (Alam, Kashyap, Mishra, & Panda, 2018; Dionne, Warnakulasuriya, Zain, & Cheong, 2014; Kowshik et al., 2017).

Apresenta uma incidência em mais de trezentos mil casos diagnosticados ao ano, afectando maioritariamente o sexo masculino durante a sexta e sétima décadas de vida e novas estratégias na terapia molecular do carcinoma espinocelular da cavidade oral são necessárias na inibição da progressão e desenvolvimento deste carcinoma, geralmente o tempo de vida destes pacientes é muito curto (Ferreira et al., 2018; Sophia, Kiran Kishore T., Kowshik, Mishra, & Nagini, 2016).

Os factores de risco são a exposição à luz solar, contacto com produtos carcinogénicos como óleos, alcatrão, exposição a raios x, uma longa história de consumo de álcool e uso de tabaco, todos estes factores podem predispor à transformação maligna do epitélio (Ferreira et al., 2018; Regezi et al., 2008). Apresenta um grande potencial em metastizar para os gânglios regionais (Regezi et al., 2008).

Uma grande percentagem deste carcinoma ocorre principalmente no lábio ou então no interior da cavidade oral, surgindo na maioria dos casos lesões clínicas assintomáticas, que se podem transformar em lesões malignas (Figuras 4, 5 e 6).

Existem várias lesões potencialmente malignas que precedem ao desenvolvimento do carcinoma oral das células escamosas, as mais comuns são a leucoplasia e a eritroplasia.

A nível de diagnóstico clínico a eritroplasia define-se como uma mancha vermelha ardente na qual não é possível relacioná-la patologicamente a outra doença, a leucoplasia caracteriza-se como placas brancas sem causa definida (Dionne et al., 2014).



Figura 4- Carcinoma oral das células escamosas localizado no lábio (Adaptado de Reguezi et al., 2008).

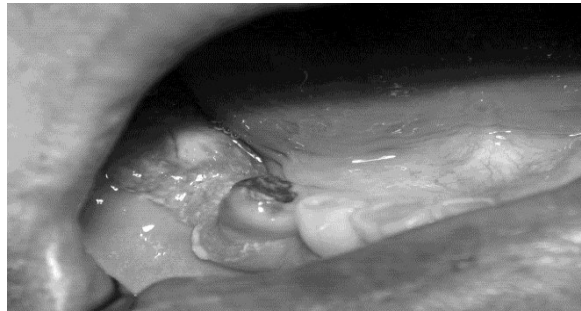


Figura 5- Imagem intra-oral do carcinoma das células escamosas da gengiva, 4º quadrante, zona posterior (Singh & Schenberg, 2013).

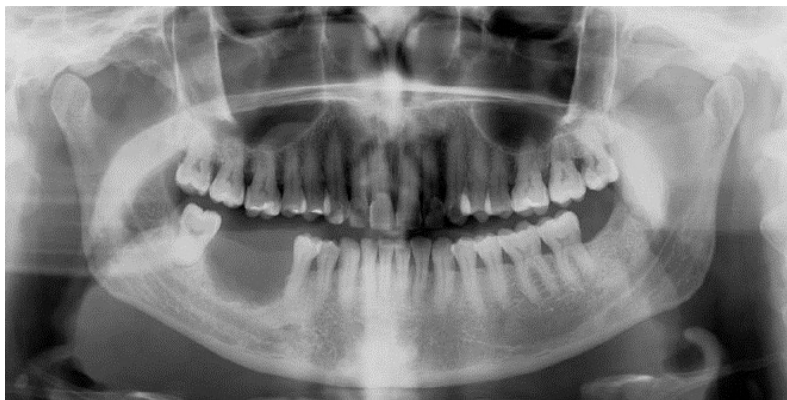


Figura 6- Imagem de ortopantomografia demonstrando um zona radiotranslúcida no 4 quadrante, associada ao carcinoma das células escamosas (Singh & Schenberg, 2013).

2.1.1. Modo de acção dos Fitoquímicos de Neem na terapêutica do Carcinoma oral das células escamosas

Moléculas sintéticas e naturais foram introduzidas na década de 1970 pelo Dr. Michael Sporn, com a intenção de inibir ou bloquear o processo de carcinogénese, dando o nome de quimioprevenção. Um composto quimiopreventivo suprime vários passos na iniciação, promoção e progressão do cancro (Wang et al., 2016).

Os compostos originários de plantas são uma forma de terapia complementar no tratamento do cancro, pois apresentam capacidade de inibirem várias vias de sinalização oncogénicas, provocando uma toxicidade mínima ou quase nula a nível celular (Bodduluru et al., 2014; Dasgupta et al., 2004; Ziech et al., 2012).

Existem vários agentes anti-cancerígenos derivados de plantas que têm contribuído principalmente no tratamento do cancro, como o paclitaxel (*Taxus* sp.), a vincristina (*Catharanthus* sp.), a vinblastina (*Catharanthus* sp.) e as epipodofilotoxinas (*Podophyllum* sp.) (Guimarães et al., 2014; Mahmoud et al., 2018; Sengupta et al., 2017). O irinotecano, etoposide e paclitaxel foram aprovados nos Estados Unidos da América pela Food and Drug Administration (FDA) na terapia de tumores (He et al., 2016).

Apesar de várias drogas existirem como terapêutica anti-cancro, poderá surgir o desenvolvimento da quimiorresistência por parte das células tumorais (Mahmoud et al., 2018; Sengupta et al., 2017; Sinevici & O'sullivan, 2016). A quimiorresistência é a capacidade das células cancerígenas promoverem a sua sobrevivência, através da activação de vários mecanismos intracelulares, como diferentes vias de sinalização oncogénicas e bombas que existem nas membranas celulares onde vão regular a disponibilidade de drogas evitando assim a apoptose (Yeldag, Rice, & Hernández, 2018).

2.1.1.1. Activação da apoptose

A apoptose ou morte celular programada, é caracterizada pela autodigestão controlada dos componentes celulares (Majid, Zaini, & Razak, 2014; Porth et al., 2002). O mecanismo de activação da apoptose é um objectivo importante na terapia do cancro, os defeitos neste mecanismo provocam acumulação de alterações genéticas que desregulam a proliferação celular, interferem na diferenciação das células e promovem

a angiogénese durante a progressão do tumor. As células tumorais podem suprimir a apoptose adquirindo resistência à apoptose através da expressão de proteínas anti-apoptóticas, ou mutações em proteínas pró-apoptóticas (Chien et al., 2017).

Alterações na família das proteínas designadas de linfoma de células B-2 (BCL-2) pró-apoptose promovem a progressão e desenvolvimento de tumores (Alzohairy, 2016). A função normal da BCL-2 é proteger as células da apoptose, mas existem outras proteínas intracelulares da família BCL-2 que promovem a apoptose. A primeira proteína pró-apoptose a ser identificada foi denominada proteína X da família BCL-2 (BAX), foi encontrada associada com a BCL-2, pertence à família de BCL-2. Nos mamíferos proteínas da família BCL-2 evitam a apoptose como BCL-2, BCL-x1, BCL-w, MCL-1 e outras promovem, BAX, BAK, BAD, BID, BCL-xs, NOXA, são proteínas localizadas nas membranas externas de alguns organelos celulares, como as mitocôndrias (Lodish et al., 2004).

Foram realizados testes clínicos onde foi induzido o carcinoma oral em ratos com o carcinogéneo, 7,12-dimetilbenzatraceno (DMBA), devido a este carcinoma apresentar semelhanças a nível de histologia com o carcinoma oral das células escamosas em humanos (Kowshik et al., 2017). O DMBA (7,12-dimetilbenzatraceno) é um hidrocarboneto aromático policíclico é um carcinogéneo poluente do ambiente que provoca mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) em animais de laboratório, forma intermediários electrofílicos ligando-se às bases de adenina do DNA, causando uma instabilidade genómica originando neoplasias (Figura 7) (Manikandan et al., 2008).

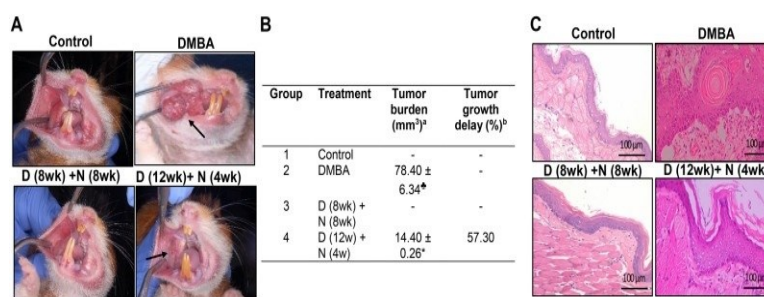


Figura 7- Testes clínicos realizados em animais usando o DMBA (Adaptado de Sophia et al., 2018).

Ambas as moléculas azadiractina, gedunina e nimbolida originárias nos extractos (conjunto de moléculas) de Neem previnem o carcinoma oral das células escamosas provocado por DMBA, estes fitoquímicos utilizam vários mecanismos de acção, provocando uma interrupção nos processos e vias que originam o

desenvolvimento do cancro activando a apoptose tumoral, mas nimbolida apresenta uma maior potência quimiopreventiva quando comparado com azadiractina (Figura 8) (Hao, Kumar, Yadav, & Chandra, 2014).

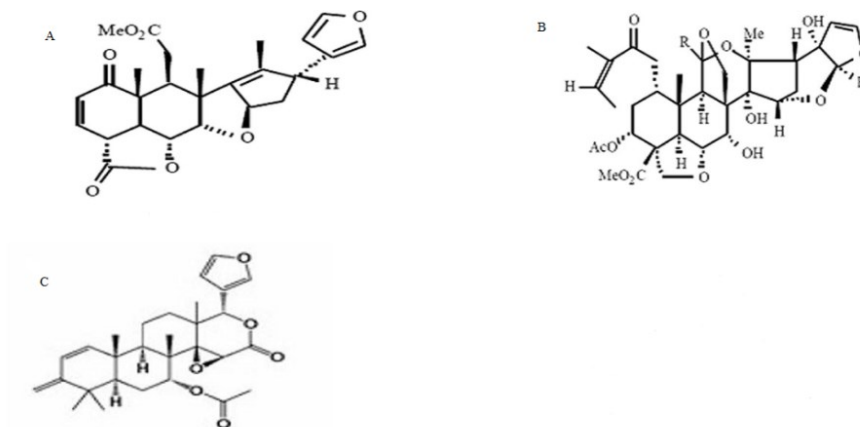


Figura 8- Estrutura química de Nimbolida (A), Azadiractina (B) e Gedunina (C) (Adaptado de Nagini, 2014).

O fitoquímico nimbolida pertence ao grupo dos limonóides e apresenta uma grande acção a nível de citotoxicidade em células tumorais (Alzohairy, 2016; P. Manikandan et al., 2008).

É um composto quimiopreventivo que activa vários mecanismos no tratamento e prevenção do cancro (Priyadarsini, Manikandan, Kumar, & Nagini, 2009) (Bodduluru et al., 2014). Na sua estrutura química existe um sistema cetona alfa,beta-insaturado, este vai activar a via apoptótica em células cancerígenas (Figura 9) (Chien et al., 2017; Elumalai & Arunakaran, 2014; Sastry et al., 2006).

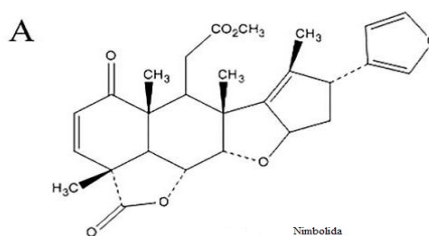


Figura 9- Estrutura química da molécula nimbolida (A) (Adaptado de Chien et al., 2017)

A morte celular programada (apoptose) pode acontecer através de duas formas, a via extrínseca que vai depender de receptores de morte a nível de superfície celular e a

via intrínseca que depende principalmente das mitocôndrias (González-Flores, Rodríguez, & Pariente, 2014).

Nimbolida induz apoptose em células tumorais, devido à libertação de proteínas pró-apoptose através da via extrínseca e intrínseca (Sophia et al., 2016; Wang et al., 2016). Este composto é responsável pelos efeitos pró-apoptóticos nos testes clínicos, activando a caspase 3 (protease) e regulando as proteínas da família BCL-2, anti-apoptose e pró-apoptose. A diminuição da caspase 3 está fortemente associada ao aumento das proteínas anti-apoptose no carcinoma oral das células escamosas (P. Manikandan et al., 2008).

Neem ao activar a via apoptótica intrínseca, provoca activação das caspases 9 e 3 (Chitta et al., 2014). A apoptose induzida por Neem é parcialmente dependente da activação das caspases. Neem pode também provocar a activação do factor indutor da apoptose (AIF), esta proteína existe no citosol migra para o núcleo e provoca a condensação da cromatina e a fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA), este mecanismo é descrito quando ocorre apoptose independente das caspases (Chitta et al., 2014; Srivastava et al., 2012).

A activação constitutiva da sinalização, factor nuclear-KB (NF-KB), é verificada em vários tipos de cancro. O NF-KB foi descoberto em 1986 e pertence aos factores de transcrição melhores estudados, este factor vai regular a transcrição de genes relacionados com a sobrevivência, proliferação, inflamação e angiogénese a nível celular (Elumalai & Arunakaran, 2014; Hao et al., 2014; Hoesel & Schmid, 2013; Mahmoud et al., 2018).

A actividade elevada do factor de transcrição NF-KB em células cancerígenas representa uma acção importante na resistência a drogas (Hoesel & Schmid, 2013). NF-KB activa genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 para evitar a morte das células tumorais (Gupta, 2018), o uso de inibidores de factores de transcrição NF-KB tem como alvo alguns cancros, bloqueando mecanismos anti-apoptose de células malignas (Hoesel & Schmid, 2013).

Segundo os estudos realizados, a aplicação tópica de DMBA que provocou carcinoma das células escamosas na cavidade oral de animais de laboratório, aumentou a expressão da proteína inibidora KB (IKB), levando á sua fosforilação, o que provocou

a libertação do factor transcrição NF-KB que está no citoplasma para o núcleo e a transcrição de genes anti-apoptóticos (Palrasu Manikandan et al., 2012).

A figura 10 (B) representa um esquema simplificado onde os factores de transcrição NF-KB que estão localizados no citoplasma como heterodímero de subunidades P50 e P65, se ligam á proteína inibidora KB (IKB), esta proteína enquanto estiver ligada ao NF-KB, evita que este factor vá para o núcleo. Quando existe uma estimulação da célula, o complexo Inibidor kB Kinase (IKK) é activado, surge fosforilação da, IKB (proteína inibitória KB), esta vai ser degradada no proteossoma, libertando o factor de transcrição NF-KB para o núcleo, envolvido na anti-apoptose e na transcrição de genes que originam a sobrevivência celular (Figura 12B) (Liu, Hou, Lin, Tsao, & Hou, 2015; Palrasu Manikandan et al., 2012).

O factor de transcrição NF-KB, controla vários processos celulares e induz também a citocinas que regulam a resposta imune como o factor de necrose tumoral (TNF) (Elumalai & Arunakaran, 2014; Hoesel & Schmid, 2013; Palrasu Manikandan et al., 2012).

O TNF (factor de necrose tumoral) é uma citocina produzida principalmente por macrófagos e outros tipos de células, tem a capacidade de induzir diferentes respostas biológicas e desempenha um papel importante na inflamação, resposta ao stress e apoptose onde pode activar sinalização pró e anti-apoptótica (González-Flores et al., 2014).

Azadiractina é um limonóide que pertence á classe dos triterpenóides (Aarthy et al., 2018; Fernandes et al., 2019). Este fitoquímico interage com o TNF, com os receptores da superfamília dos factores de necrose tumoral e inibe a sinalização NF-kB, induzindo à activação de caspases (Srivastava et al., 2012).

Na figura 10 (A) é possível observar que o TNF é reconhecido por receptores membranares, um deles designado de receptor 1 do factor de necrose tumoral (TNFR1), esses receptores trimerizam, formam-se 3 sub-unidades, designadas de dominio de morte associado a receptores (TRADD) ligam-se ao trímico e activam o domínio de morte associado ao Fas (FADD), consequentemente a pró-caspase 8, uma caspase iniciadora, nas células que tenham recebido o sinal de destruição vai activar outras caspases que hidrolisam as proteínas da célula, surge apoptose (Figura 10 A) (González-Flores et al., 2014).

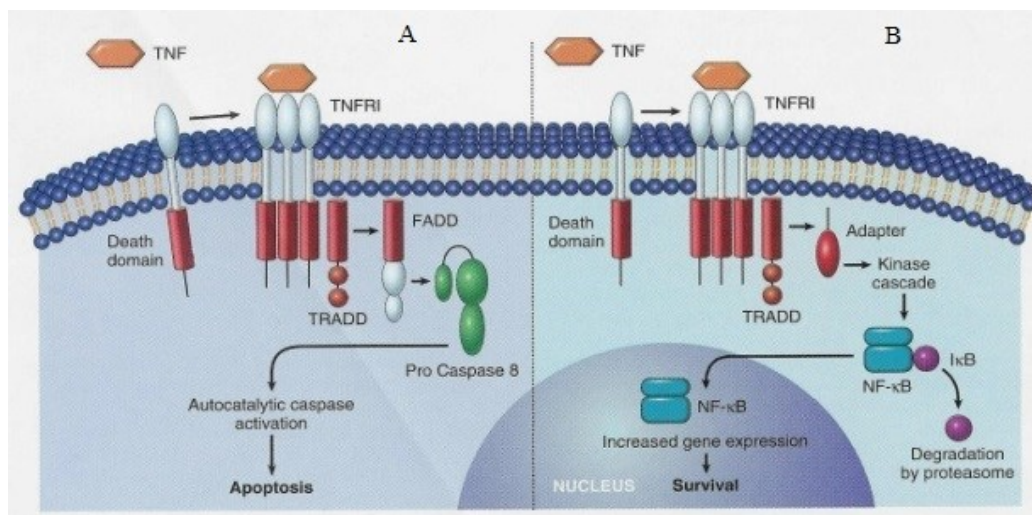


Figura 10- Apoptose mediada pelos receptores da superfamília dos factores de necrose tumoral (TNF) (Adaptado de Lodish et al., 2008).

No teste *in vitro* realizado por Gupta (2018), foram usadas linhas celulares de células tumorais humanas do cancro do pulmão, mama, cólon e fígado, estas células foram tratadas com o fitoquímico azadiractina aumentando a dose progressivamente durante 72 horas. Este composto provocou a morte celular independentemente do tipo de células tumorais, ligou-se directamente ao Inibidor KB kinase- subunidade alfa (IKK α) inactivou a sua fosforilação inibindo a activação de NF- κ B, provocando apoptose nas células tumorais. A apoptose foi verificada através da análise western blot (analisa quantidade de proteínas) verificando a quantidade de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e caspase 8 que neste caso aumentaram. O autor concluiu também que a morte das células tumorais não estava dependente da P53 (Gupta, 2018).

A fosfoproteína nuclear de 53 KDa (P53) é importante na diferenciação celular, reparo do DNA, na progressão do ciclo celular e apoptose e está aumentada no cancro oral, geralmente 50% dos pacientes com cancro oral possuem uma mutação no gene P53 (Ferreira et al., 2018; Sinevici & O'sullivan, 2016).

A P53 é um factor de transcrição localizado no núcleo, uma proteína supressora de tumores, está associada ao stress genotóxico, à instabilidade genómica provoca a paragem do ciclo celular nas fases G1, S e G2 para permitir a reparação do DNA. É um factor de transcrição instável e em condições normais não acumula em níveis suficientemente altos para activar a transcrição de genes, está associada a outra proteína a duplo mutante murino 2 (MDM2), uma ubiquitina ligase, que à medida que a P53 vai sendo feita é também degradada no proteossoma através da MDM2 que induz a sua ubiquitinação. Quando este sistema se desequilibra, a concentração de P53 aumenta,

surge a transcrição de genes, um dos quais o gene que codifica a proteína inibidora do ciclo celular de 21KDa (P21), a P53 activa a P21 e esta proteína faz a paragem das células nas várias fases do ciclo celular e a célula realiza ou não a reparação do DNA. Quando o dano do DNA é muito extenso, a P53 também activa a transcrição de genes que levam à apoptose (Lodish et al.,2004).

Segundo Gupta (2018), as células tratadas com azadiractina expressam a P53 e P21 por análise western blot (analisa quantidades de proteínas), existe um aumento destas proteínas mas não são fosforiladas, logo não ficam activas. O aumento destas proteínas é devido ao fitoquímico azadiractina, este composto vai interagir com MDM2 no sitio de ligação da P53, azadiractina liga-se nos resíduos hidrofóbicos de MDM2 e forma ligações de hidrogénio, inibindo a degradação de P53 mediada por MDM2 (Figura 11). A fosforilação da P53 é realizada pela quinase designada de Ataxia Telangiectáxia Mutada (ATM) na serina 15 (Ser15), enquanto que a fosforilação na serina 46 (Ser46) é um marcador para a célula realizar apoptose.

Gupta (2018), não observou nenhuma activação de P53 mediada pela fosforilação na Ser15 e Ser46, o que permite concluir que não existiu activação da P53, azadiractina ligou-se a MDM2 e inibiu a P53. O fitoquímico azadiractina ligou-se directamente à sub-unidade IKK-alfa inibindo assim a activação de NF-KB e provocou apoptose tumoral activando caspases.

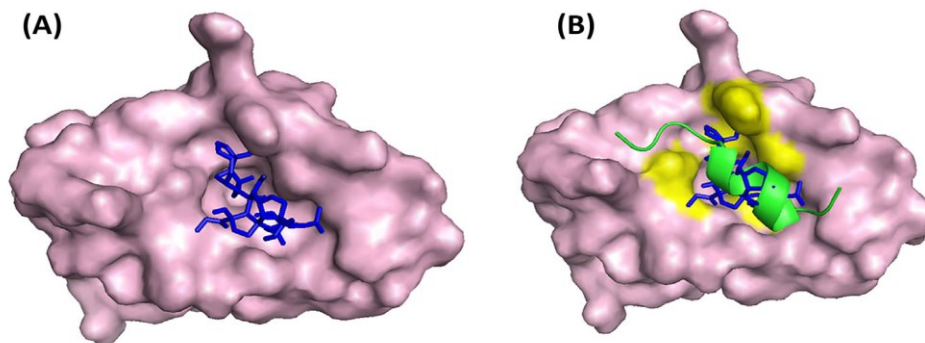


Figura 11- Competição entre Azadiractina e a proteína P53 pela ligação a MDM2. Proteína MDM2 – cor rosa; Azadiractina – cor azul; proteína P53 - cor verde; ligação nos resíduos hidrofóbicos – cor amarela (Adaptado de Gupta, 2018).

2.1.1.2. Inibição da angiogénese e metástase tumoral

A angiogénese é um processo em que existe a formação de novos vasos capilares sanguíneos a partir de vasos preexistentes fornecendo O₂ e outros nutrientes ao corpo, permitindo o seu crescimento e cicatrização de feridas, entre outros. No entanto a

angiogénese também está associada a situações patológicas, sendo essencial no crescimento e metástase tumoral (Alzohairy, 2016; Gutiérrez et al., 2015).

O crescimento e proliferação das células neoplásicas é uma das características principais no desenvolvimento de metástases na patologia cancerígena (Hao et al., 2014). Aproximadamente 90% das mortes relacionadas com cancro, são devido a metástases tumorais (Wang et al., 2016).

O principal indutor fisiológico e patológico da angiogénese é a hipóxia, quando num determinado tecido os níveis de oxigénio (O₂) caem, o sistema de resposta à hipóxia promove a activação dos factores indutíveis de hipoxia (HIFs) (Gutiérrez et al., 2015). O tumor diferencia-se em duas regiões, uma zona periférica relacionada com a vasculatura sanguínea e uma zona central, a zona central do tumor é onde existe maior hipóxia (Goswami et al., 2016).

A activação da sub-unidade alfa do factor indutível de hipóxia 1 (HIF-1alfa) surge quando existem baixos níveis de oxigénio nesse tecido, inicia-se a formação e crescimento de novos vasos sanguíneos que garantem as necessidades de O₂ e outros nutrientes nos tecidos pouco oxigenados (Gutiérrez et al., 2015). O HIF-1alfa estimula a adaptação metabólica em condições de hipóxia beneficiando a sobrevivência dos tumores, origina também a activação de factores de transcrição oncogénicos, induzindo à proliferação da célula neoplásica (Sinevici & O'sullivan, 2016).

A activação das vias de sinalização oncogénicas PI3K/AKT e NF-KB são reconhecidas por promoverem a angiogénese através da activação da subunidade alfa do factor de indução de hipóxia 1 (HIF-1alfa) e o factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Kishore T, Ganugula, Gade, Reddy, & Nagini, 2016).

A via de sinalização oncogénica fosfoinositol-3 kinase/proteína quinase B (PI3K/AKT) é desregulada numa ampla gama de neoplasias malignas e tem um papel principal na progressão e desenvolvimento de tumores (Kishore T et al., 2016).

PI3K/AKT está envolvida na carcinogénese oral, inibindo a apoptose tumoral através da activação do factor de transcrição NF-KB. A activação da PI3K, provoca o recrutamento da proteína quinase B (AKT) da membrana plasmática para a membrana celular, seguidamente AKT é fosforilada pela quinase dependente de fosfatidilinositol (PDK), AKT fica activa e vai fosforilar várias proteínas, como a proteína inibidora Kappa B Kinase (IKK), este complexo ao ficar fosforilado activa a proteína inibidora

KB (IKB) e esta é degradada no proteossoma, activando o factor de transcrição NF-KB para o núcleo, este vai transcrever genes que activam proteínas relacionadas com a sobrevivência das células tumorais como HIF-1alfa e VEGF (Kishore T et al., 2016; Sinevici & O'sullivan, 2016).

O factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) libertado na matriz extracelular, desencadeia uma rede de vias de sinalização que promove a angiogénese (Priyadarsini et al., 2009). Durante o crescimento tumoral existe uma expressão aumentada de proteínas da família de factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) e os seus receptores do factor de crescimento vascular endotelial (VEGFR2) estas proteínas, produzem o revestimento de novos vasos sanguíneos para o fornecimento de nutrientes ao tumor em crescimento, provocando neovascularização (Banerjee et al., 2014).

O uso do fitoquímico gedunina que faz parte do extracto (conjunto de moléculas) das folhas de Neem, bloqueou o desenvolvimento do carcinoma oral das células escamosas, através da inibição das vias de sinalização NF-KB e PI3K/AKT, inactivando o inibidor Kappa B quinase (IKK) e a proteína AKT (PKB) respectivamente. Este estudo demonstrou que gedunina ao bloquear a sinalização PI3K/AKT e NF-KB, inibe a expressão da subunidade alfa do factor de indução de hipóxia 1 (HIF-1alpha) e o factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) no carcinoma oral, uma vez que o factor NF-KB já não vai ser libertado no núcleo e consequentemente não existe a activação de VEGF e HIF-1alfa (Kishore T et al., 2016).

Fitoquímicos que actuam nas vias de sinalização, fosfoinositol-3kinase (PI3K) e aldose redutase (AR), sugerem ser uma importante estratégia para bloquearem a angiogénese em neoplasias malignas. A aldose redutase (AR) é uma enzima que cataliza e redução de aldeídos lipídicos e estimula as reacções redox nas vias de sinalização oncogénicas, mediando os sinais de hipóxia que provocam a angiogénese (Kishore T et al., 2016).

No teste clinico realizado por Kishore et al. (2016), onde se induziu o carcinoma oral das células escamosas com DMBA, foi administrado gedunina, (Figura 12), numa concentração de 1, 10 e 100 microgramas/kg durante 14 semanas em ratos, existiu uma redução do tumor significativamente, este fitoquímico liga-se a várias quinases, das vias de sinalização oncogénica como a quinase Akt (proteína quinase B) na lisina 277 (Lys277) e ligou-se à Aldose Redutase (AR) no aminoácido glutamina 49 (Gln49).

Gedunina diminui a expressão da AR devido a formar ligações estáveis com o aminoácido Gln 49 no seu sítio activo.

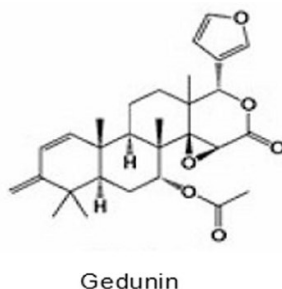


Figura 12- Estrutura química da molécula gedunina (Adaptado de Nagini, 2014).

Segundo Kishore T et al.,(2016), existem estudos que confirmam que a inibição da AR inactiva a sinalização PI3K/AKT e NF-KB inibindo assim a angiogénese. O autor Kishore T et al. (2016), justifica que existe uma associação entre a enzima AR e o oncogene microRNA-21. O composto Gedunina está associado à inibição da aldose redutase (AR), este fitoquímico ao inibir a AR provoca uma regulação negativa ou diminuição do microRNA-21 (miR-21). O miR-21 é uma molécula associada a tumores agressivos, activa várias vias oncogénicas, uma destas é a via de sinalização PI3K/AKT. O microRNA-21 activa a via PI3K/AKT através da inibição do gene que codifica a proteína fosfatase homóloga á tensina (PTEN), e conseqüentemente vai promover a angiogénese (Kishore T et al., 2016). A inactivação do gene PTEN é verificada em vários tipos de cancro (Alzohairy, 2016; Elumalai & Arunakaran, 2014; Mahmoud et al., 2018). Este gene PTEN se estiver activo é um gene supressor de tumores, regula a fosforilação da proteína PI3K (Kishore T et al., 2016).

A matriz extra celular (ECM) constituída por várias proteínas apresenta uma acção importante na homeostasia dos tecidos (Kowshik et al., 2017). As metaloproteinases da matriz (MMPs) degradam a ECM provocando angiogénese e invasão tumoral (Kowshik et al., 2017; Priyadarsini et al., 2009). As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco e cálcio, actuam na modificação da matriz extracelular degradando elementos específicos nos diferentes processos biológicos, como remodelação dos tecidos, migração e angiogénese (Gutiérrez et al., 2015).

As células vasculares endoteliais são constituídas por vários tipos de enzimas como metaloproteinases da matriz (MMPs) e ADAM (proteínas desintegrinas e

metaloproteinases). A proteína RECK (proteína indutora da reversão tumoral rica em cisteína com motivos kazal (motivos proteicos conservados evolutivamente, inibidores de proteases)) é uma glicoproteína da membrana celular, muito importante na remodelação da matriz extracelular regulando a actividade das metaloproteinases da matriz e das proteases ADAM (proteínas desintegrinas e metaloproteinases) que estão ancoradas nas membranas celulares nas células vasculares endoteliais. A nível de estrutura química esta proteína é rica em cisteína e é constituída por regiões hidrofóbicas nos domínios terminais amino terminal (NH₂) e carboxilo terminal (COOH). RECK é constituída por três domínios, o domínio terminal NH₂ actua como um sinal peptídico, o domínio terminal COOH, serve de sinal na membrana celular para fazer a ancoragem da proteína, via glicosilfosfatidilinositol (GPI) e o motivo Kazal é um motivo tipo inibidor serino-protease (enzimas que clivam proteínas e na sua composição central apresentam resíduos de serina), inibe a actividade das proteases (Gutiérrez et al., 2015).

RECK apresenta uma acção fundamental na inibição das metástases e angiogénese (Bahgat, Shahin, Makar, Aziz, & Hunter, 2016; Gutiérrez et al., 2015; Kowshik et al., 2017). Esta proteína existe em grande quantidade nos tecidos normais mas diminui nos fibroblastos alterados por oncogenes e em vários tumores (Kowshik et al., 2017). Uma diminuição do gene RECK provoca invasão e angiogénese em vários tumores. Sinais de hipóxia e miRs (microRNAs) provocam uma inibição da transcrição do gene RECK e activam MMPs que degradam a ECM (Kowshik et al., 2017).

Kowshic et al. (2017), verificaram através de análises de reacção de cadeia da polimerase (PCR) que ao induzir o carcinoma oral das células escamosas com DMBA durante 12 semanas, o oncogene miR-21 aumentou sequencialmente durante a progressão deste carcinoma, finalizadas estas 12 semanas foi utilizado o fitoquímico nimbolida das 12 às 16 semanas, nimbolida inibiu o miR-21 nos testes em animais e activou RECK. Os autores sugeriram que o miR-21 inibe directamente a expressão de RECK e promove a angiogénese, concluíram que este poderia ser um mecanismo de regulação da proteína RECK. O mecanismo exacto da inibição do miR-21 pelo nimbolida não está totalmente compreendido.

O uso de nimbolida reduziu o tumor no seu crescimento em aproximadamente 53%, este composto activou RECK em condições de hipóxia, e evita a degradação da

matriz extracelular, RECK inibiu MMPs-2 e MMPs-9, nimbolida inibiu a activação da sinalização VEGF mediada por HIF-1alfa, este fitoquímico formou ligações de hidrogénio no domínio PAS-A de HIF-1alfa, inactivando este factor, inibindo assim a angiogénese (figura 13) (Kowshik et al., 2017).

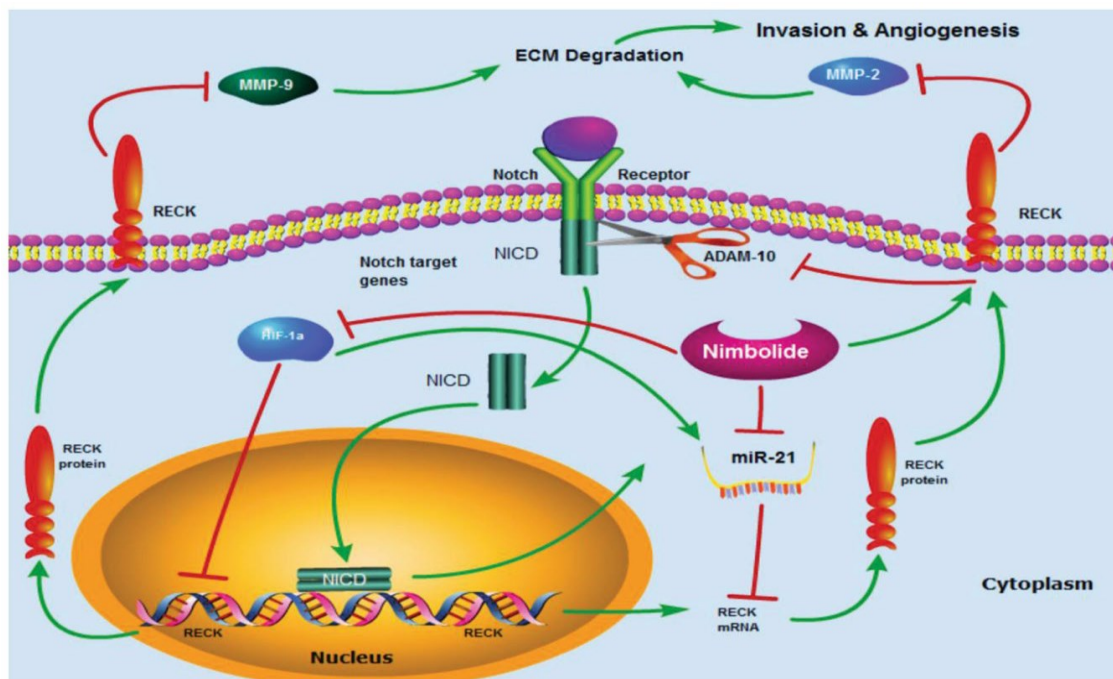


Figura 13- Actividade do fitoquímico nimbolida na metástase tumoral e angiogénese (Adaptado de Kowshik et al., 2017).

A alteração na expressão do gene RECK está associada à sinalização VEGF e Notch. O aumento de RECK provoca uma inibição na progressão e desenvolvimento de tumores devido a induzir a inibição do VEGF (factor de crescimento endotelial vascular) e inibe também a via Notch. A activação da via Notch, uma via relacionada com genes que regulam vários eventos fisiológicos como a sobrevivência, proliferação, diferenciação e apoptose nos diferentes tecidos celulares, facilita a progressão tumoral (Kowshik et al., 2017). A diminuição de RECK aumenta ADAM-10 uma protease que activa a sinalização Notch provocando um aumento da angiogénese (Gutiérrez et al., 2015; Kowshik et al., 2017).

Na figura 14, podemos observar a célula que emite sinal Notch expressa o ligante Notch, este ligante liga-se ao seu receptor Notch da célula receptora de sinal (1), seguidamente a ligação do ligante no seu receptor sofre uma mudança de conformação, levando à exposição do domínio da região extracelular na membrana plasmática, existe

uma primeira clivagem dessa zona pela protease ADAM-10 (2), depois surgem clivagens realizadas por uma enzima, a gama-secretase, esse domínio intracelular da via Notch (NICD) é activado e vai para o núcleo fazer a transcrição de genes que actuam na sinalização Notch (3). RECK pode inactivar ADAM-10 e ADAM-17, na célula receptora de sinal Notch, inibindo a primeira clivagem que é realizada por ADAM-10, inactivando a protease ADAM-10, bloqueando assim a activação do NICD (domínio intracelular da via Notch) (4). O contrário também existe a proteína RECK é expressa na célula que emite sinal notch e protege os ligandos Notch da ADAM-10 e ADAM-17, potencializando a sinalização Notch (5) (figura 14) (Gutiérrez et al., 2015).

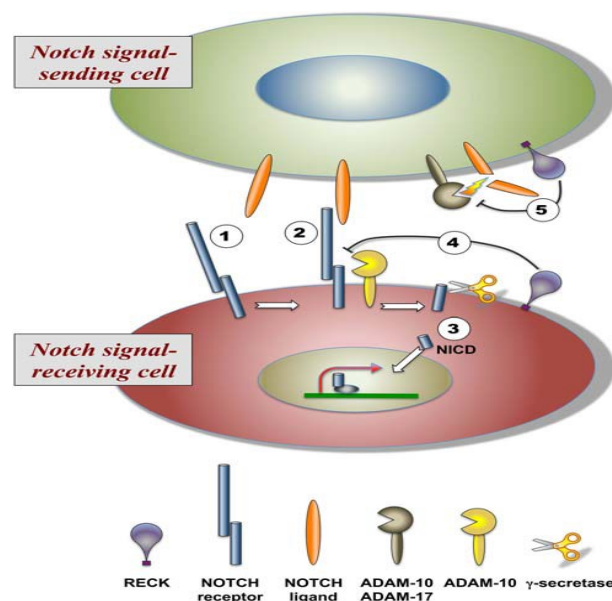


Figura 14- Proteína RECK como regulador da via de sinalização Notch (adaptado de Gutiérrez et al., 2015).

A activação da via de sinalização Notch facilita a progressão do tumor e RECK inibe esta sinalização através da inactivação de ADAM-10. Nimbolide inibe o miR-21, e consequentemente activa RECK, RECK vai inibir ADAM-10 e evita assim a activação do NICD, não existe a transcrição de genes que activam a sinalização Notch diminuindo assim a angiogénese e metástase tumoral (Kowshik et al., 2017).

A quinase glicogénio sintetase-3beta (GSK-3B), está relacionada com a síntese do glicogénio e com várias vias de sinalização que regulam a mobilidade celular, síntese proteica, sobrevivência e proliferação celular. A desregulação de GSK-3B (quinase glicogénio sintetase-3beta) está relacionada com várias doenças malignas, incluindo

cancro oral. A inactivação da GSK-3B por fosforilação do aminoácido serina9 (ser9) e a activação das vias de sinalização oncogénicas PI3K/AKT, proteína Kinase activada por mitógenos/quinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK) e wingless/beta-catenina (Wnt/B-catenina), estão associados à inibição da apoptose e ao aumento da proliferação celular durante a evolução gradual do carcinoma oral das células escamosas. A actividade da GSK-3B que desempenha um papel central na via WNT/B-catenina (wingless/beta-catenina) é regulada pela fosforilação específica na Ser9 e tirosina216 (Tyr216). Várias quinases inactivam a GSK-3B, esta é inactiva principalmente pelas vias PI3K/AKT (fosfoinositol-3 kinase/proteína kinase b) e ERK/MAPK (quinase regulada por sinal extracelular/ proteína quinase activada por mitógenos) (Sophia et al., 2016).

Na figura 15 é possível observar num modelo simplificado que a PI3K activa AKT (proteína kinase B) para a membrana citoplasmática activando a quinase dependente de fosfatidilinositol (PKD), AKT activada vai fosforilar GSK-3B esta fica inactiva, levando à activação da via de sinalização WNT (wingless/beta-catenina).

Observando a figura 16, a ligação dos ligantes WNT ao receptor frizzled activa a sinalização WNT, surge acumulação de B-catenina (beta-catenina) no citosol que depois vai para o núcleo fazer a transcrição de genes relacionados com a angiogénese, metástases, invasão, inflamação, apoptose e progressão do ciclo celular.

Na ausência de sinais WNT, o factor de transcrição B-catenina mantido em um complexo multiproteico com GSK-3B, sofre fosforilação sequencialmente pela caseína quinase1(CK1) e GSK-3B, posteriormente é ubiquitinado e degradado nos proteossomas (Figura 15) (Sophia et al., 2016).

Nimbolida inibiu a passagem para o núcleo de Beta-catenina, devido a activar GSK-3beta, bloqueando a activação das quinases ERK (kinases reguladas por sinais extracelulares) e PI3K/AKT (Figuras 15 e 17) (Sophia et al., 2016).

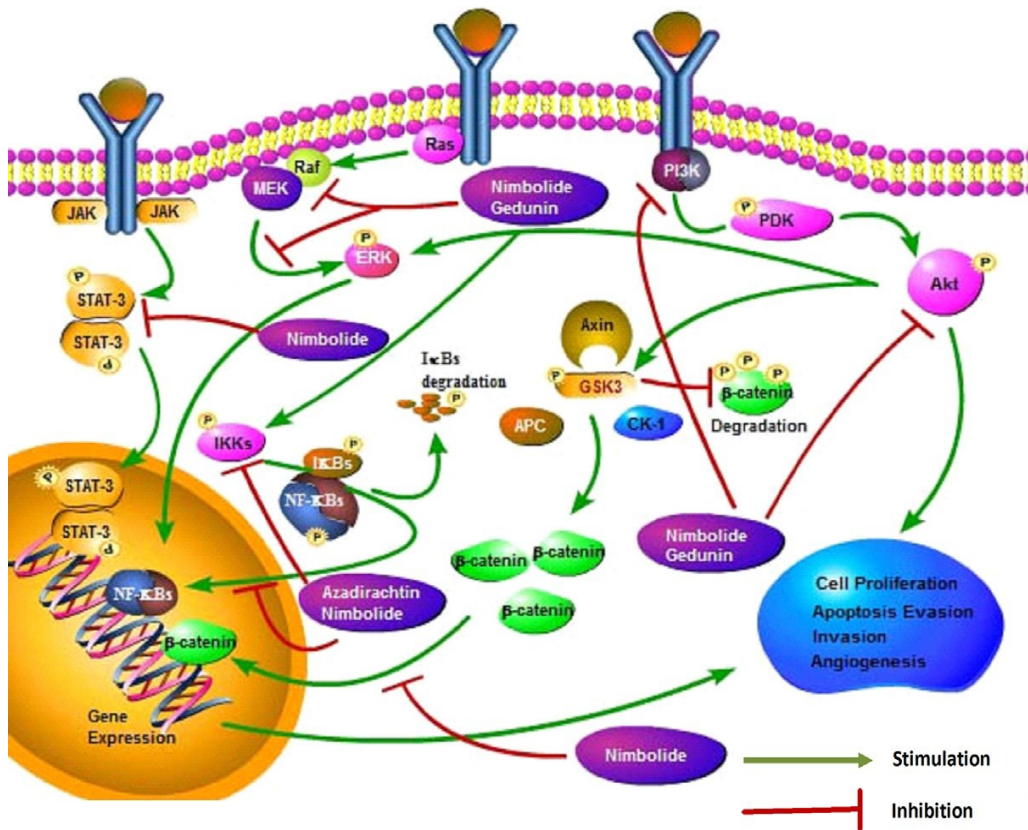


Figura 15- Representação esquemática de gedunina, nimbolida e azadiractina as 3 moléculas principais que actuam nas diferentes vias de sinalização oncogénicas (Nagini, 2014).

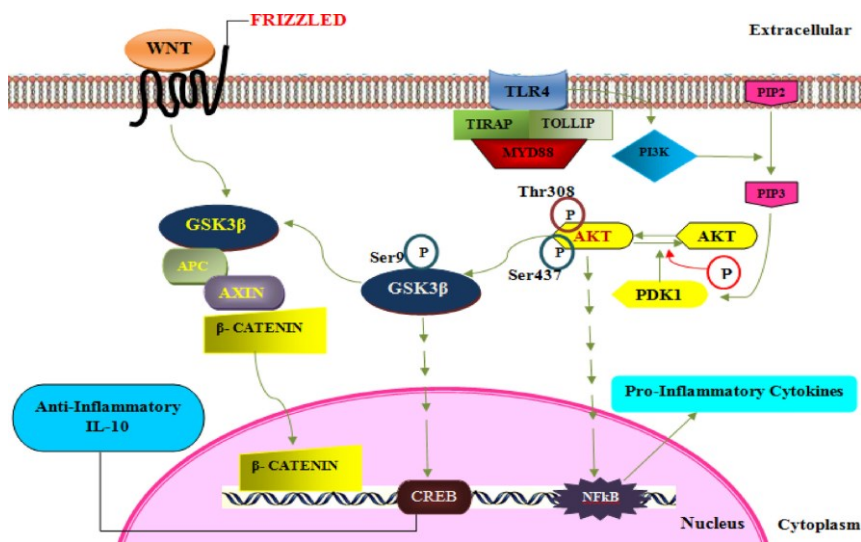


Figura 16- Ativação da via de sinalização WNT (Adaptado de Golpich et al., 2015).

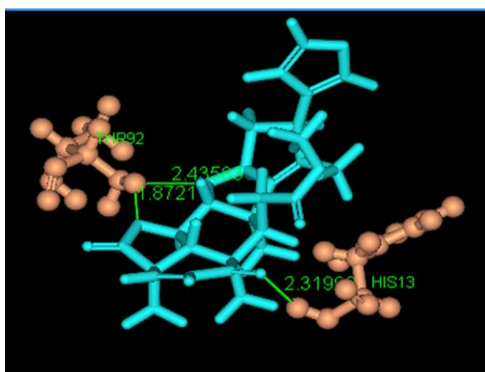


Figura 17- Ligação da molécula nimbolida à proteína AKT. Azul - nimbolida; laranja – proteína AKT; verde – ligações de hidrogénio entre nimbolida e resíduos específicos da proteína AKT (Raja, Elayapillai, Priya, & Balakrishnan, 2016).

Num estudo realizado por, Sophia et al.,(2016), foram realizados testes clínicos onde se avaliou os vários mecanismos de sinalização da GSK-3B no carcinoma oral das células escamosas, provocado pelo uso tópico de DMBA e a acção quimioterapêutica de nimbolida nesse tipo de carcinoma. Os autores ao usarem DMBA tópicamente verificaram um aumento de PI3K, AKT, kinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), ciclina D1 e quinase 4 dependente de ciclina (CDK4) e uma diminuição da proteína inibidora do ciclo celular de 21KDa (P21) em relação ao grupo control, entre as 0 e 16 semanas. Após 12 semanas utilizou-se o fitoquímico Nimbolida 100microgramas/KG por via oral e Wortmannina (um inibidor da PI3K) 500microgramas/kg, das 12 às 16 semanas existiu uma redução dos tumores, nimbolida foi utilizado em concentração cinco vezes menor que a Wortmannina.

Na figura 18 é possível observar que nimbolida liga-se á proteína PI3K inibindo-a e inactiva também ERK, esta acção provoca activação de GSK-3beta, esta vai fosforilar e inactivar a ciclina D1 (Figura 18), a ciclina D1 é o substrato da GSK-3beta, ao ficar fosforilada sai do núcleo para o citoplasma e é degradada (Sophia et al., 2016). D1é uma proteína reguladora essencial na transição da fase G1 para a fase S (Sinevici & O'sullivan, 2016). As ciclinas do tipo D foram identificadas como proto-oncogenes (genes cuja função consiste na indução da proliferação celular), a sua superexpressão está activada numa grande variedade de cancros humanos, como carcinomas da cabeça e pescoço, cancros da mama e sarcomas (Dionne et al., 2014; Elumalai & Arunakaran, 2014; Gordon, Ravicz, Liu, Chawla, & Hall, 2018). A apoptose das células tumorais foi verificada pelo aumento de Bax, citocromo c, caspase 9 e 3 proteínas pró-apoptóticas e diminuição de Bcl-2, anti-apoptótica (Sophia et al., 2016).

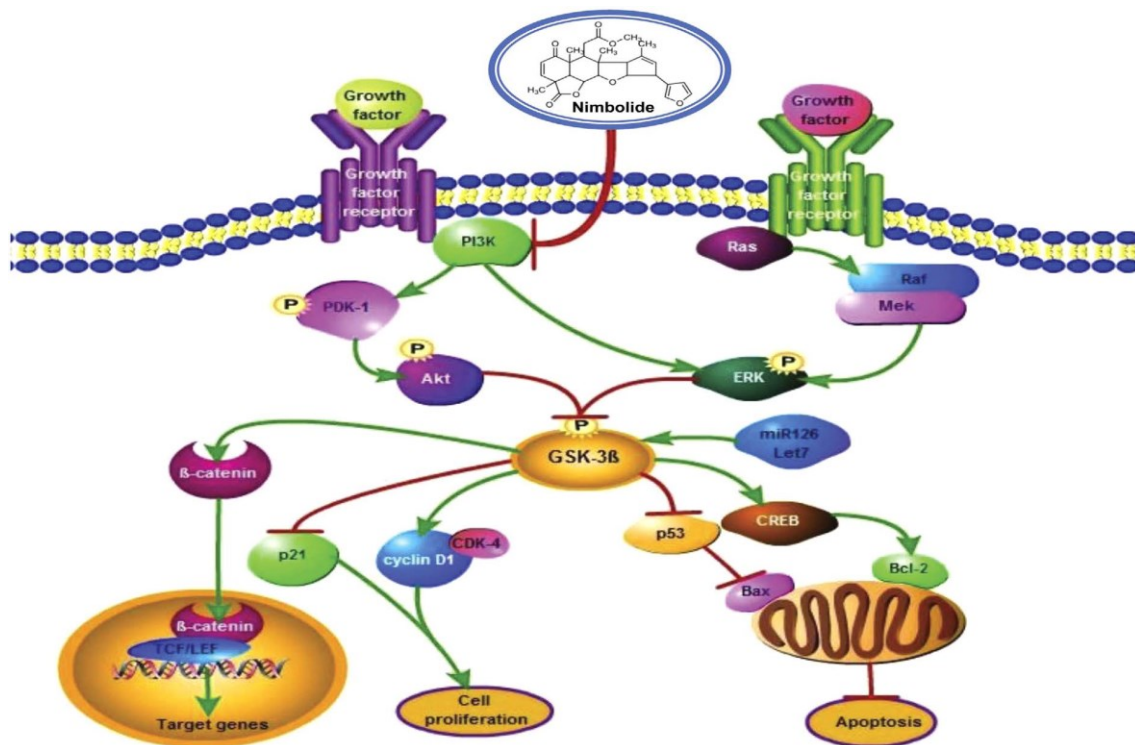


Figura 18- Mecanismo de acção de nimbolida no carcinoma oral das células escamosas provocado por DMBA (Sophia et al., 2016).

2.2. Sarcomas

Sarcomas são um grupo heterogénio de tumores malignos que surgem em qualquer parte do corpo, originários de tecido mesenquimal, um tecido embrionário derivado da mesoderme e geralmente são classificados em dois tipos, os sarcomas que possuem origem nos tecidos moles (tecido conjuntivo) e sarcomas que se originam a partir dos ossos que constituem o esqueleto humano. A sua histologia é diversa, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica 50 subtipos histológicos de sarcomas, o diagnóstico e classificação é feito por amostras de biópsia e marcadores oncológicos (Tabela 3) (Breakey, Crowley, Anderson, Milner, & Ragbir, 2017; Makary & Gopinath, 2017; Neill, Bilsky, & Kraus, 2013; Rapidis, 2008; Tudor-green, 2017; Vassiliou et al., 2017).

Existem vários factores de risco associados à patogénese de sarcomas dos ossos e partes moles como carcinogénicos químicos, radiação, quimioterapia, mutações genéticas adquiridas, irritação crónica e infecções virais. A nível de diagnóstico clínico os pacientes apresentam sintomas associados pelo envolvimento das estruturas anatómicas adjacentes ao tumor, envolvimento da base do crânio pode provocar

diplopia, proptose, dor facial e dor de cabeça, envolvimento do trato sinusal pode surgir epistaxe, obstrução nasal e dor, envolvimento da laringe pode provocar dispneia oral ou disфонia (Makary & Gopinath, 2017).

A ocorrência de sarcomas da cabeça e pescoço originários de tecidos moles e tecidos duros são aproximadamente 10% de todos os sarcomas. Embora os sarcomas sejam raros, esta patologia representa um desafio importante a nível terapêutico devido à sua taxa de sobrevivência em cinco anos ser relativamente baixa (Makary & Gopinath, 2017; Rapidis, 2008)

Classificação dos sarcomas da cabeça e pescoço

- | | |
|-----------|---|
| A. | Tumores malignos dos tecidos moles |
| | <ol style="list-style-type: none">1. Fibrossarcoma (sinónimos: fibromixossarcoma, condromixofibrosarcoma)2. Sarcoma pleomórfico (histiocitoma fibroso maligno; sinónimos: fibroxantossarcoma, xantoma fibroso maligno, mixofibrossarcoma, histiocitoma fibroso maligno mixóide)3. Leiomiossarcoma4. Rbdomiossarcoma (sinónimos: mioossarcoma, sarcoma embrionário, rbdomioma maligno, rbdomiossarcoma, sarcoma botróide, sarcoma embrionário, rbdomioblastoma)5. Angiossarcoma (sinónimos: hemangioendotelioma maligno, angioendotelioma maligno, linfangiossarcoma, hemangiossarcoma)6. Lipossarcoma7. Sarcoma sinovial8. Sarcoma epitelióide9. Sarcoma de Kaposi10. Tumor maligno da bainha do nervo periférico (sinónimos: sarcoma neurogênico, schwannoma maligno, neurofibrossarcoma, tumor de Triton)11. Dermatofibrossarcoma protuberante12. Sarcoma alveolar de partes moles |
| B. | Tumores malignos dos ossos e cartilagens |
| | <ol style="list-style-type: none">1. Condrossarcoma, incluindo condrossarcoma mesenquimatoso (sinónimo: poli-histioma)2. Osteossarcoma (sinónimo: sarcoma osteogénico) |
| C. | Tumores hematolinfóides |
| | <ol style="list-style-type: none">1. Sarcoma mielóide extramedular (sinónimos: sarcoma granulocítico, tumor mielóide extramedular, cloroma)2. Sarcoma histiocítico3. Sarcoma / tumor de células dendríticas foliculares |
| D. | Tumores neuroectodérmicos |
| | <ol style="list-style-type: none">1. Sarcoma de Ewing |
| E. | Sarcomas odontogénicos |
| | <ol style="list-style-type: none">1. Fibrossarcoma ameloblástico (sinónimos: sarcoma ameloblástico, fibrodentino sarcoma ameloblástico, fibro-odontossarcoma, dentinosarcoma ameloblástico, odontossarcoma ameloblástico, sarcoma odontogénico) |
| F. | Sarcomas induzidos por radiação |

Tabela 3- Tipos de sarcomas originários na cabeça e pescoço (Adaptado de rapidis, 2008).

A recidiva de tumores no pós-operatório é uma situação bastante comum, sendo a principal causa de morte em sarcomas da cabeça e do pescoço, antes do desenvolvimento de metástases (Makary & Gopinath, 2017; M. Sarkar et al., 2017).

A indução da imunidade reduz o risco de patologias na cavidade oral (Doddana et al., 2012). A activação ou adaptação do sistema imunológico num paciente após cirurgia, ou após cirurgia em combinação com radioterapia/quimioterapia pode resultar em inibição do crescimento tumoral e inibição de metástases (M. Sarkar et al., 2017).

Segundo estudos realizados, a glicoproteína que existe em folhas de Neem, impede a recidiva, após a cirurgia de sarcomas (M. Sarkar et al., 2017). Esta glicoproteína constituída por 33% de hidratos de carbono e a estrutura restante é formada por proteínas, apresenta um efeito imunomodulador no sistema imunológico de animais de laboratório (Goswami et al., 2016; M. Sarkar et al., 2017).

As células neoplásicas, apresentam várias características específicas, como a inibição do sistema imunológico, as células T reguladoras (Tregs) são uma subpopulação hereditária das células T que suprimem o sistema imunológico para prevenir reacções imunes e autoimunidade excessivas, no entanto o desenvolvimento de tumores envolve um aumento acentuado de células Tregs (T reguladoras) como um mecanismo para suprimir a actividade imune contra células tumorais no hospedeiro e está associado com o pior prognóstico em pacientes com cancro (Hao et al., 2014).

A activação de células natural killer (NK) e células linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (TCD8⁺), induzidas por Neem reduzem a acumulação e a capacidade de supressão das células MDSCs (células supressoras derivadas de células mielóides) provocando apoptose celular mediada pela via receptor membranar Fas-Fas ligando (FAS-FASL). Estas células MDSCs vão inibir as funções das células TCD8⁺, produzem óxido nítrico que se vai combinar com a arginase e vai provocar apoptose das células TCD8⁺. A actividade da arginase1 causa a diminuição de arginina e bloqueio traducional da cadeia CD3epsilon, que impede que as células T respondam a vários estímulos. O pré-tratamento com a glicoproteína da folha de Neem vai facilitar a infiltração das células TCD8⁺ dentro do parênquima tumoral (Banerjee et al., 2014).

Os linfócitos NK (natural killer) e os linfócitos T citotóxicos apresentam dois mecanismos principais de morte celular em células-alvo, a via perforina/granzima e a via Fas-FasL (Cavalcanti, 1997). As células TCD8⁺ apresentam funções citotóxicas formando poros nos seus alvos utilizando a perforina, seguidamente provocam a lise por libertação de grânulos de granzima B (figura 19) (M. Sarkar et al., 2017).

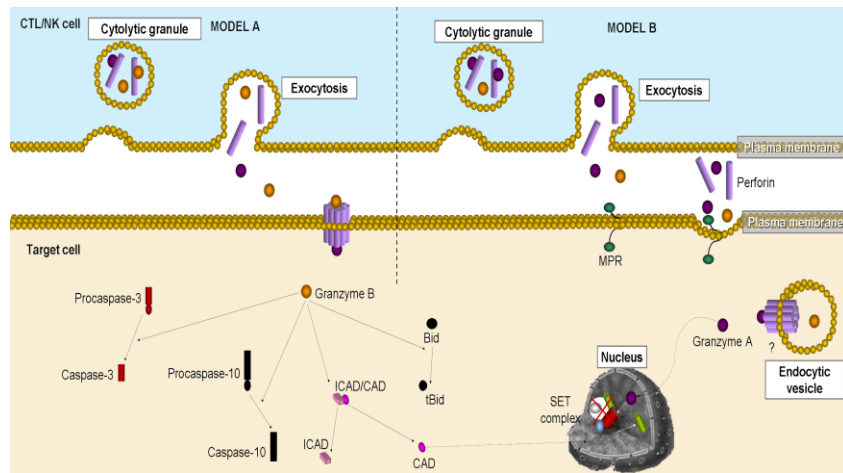


Figura 19- Apoptose via perforina/granzima (Apraiz, 2011).

Não está claro o mecanismo exacto de libertação dos grânulos de granzima, Apraiz (2011) descreve 2 mecanismos, no modelo A, a perforina forma directamente poros na membrana plasmática e liberta as granzimas no citoplasma onde vão activar proteínas provocando apoptose. As granzimas B activam caspases clivando-as, as granzimas A provocam apoptose independente de caspases, via dano directo no DNA. No modelo B o mecanismo é descrito via endocitose, formando vesículas na passagem de granzimas para o citoplasma das células alvo.

Observando a figura 20, o FAS ligando (FASL), produzido por células do sistema imunitário, como linfócitos T citotóxicos e NK, é um sinal, que induz à morte celular, liga-se ao receptor FAS da membrana celular, trimeriza activa a pró-caspase 8 e depois as caspases (Figura 20) (Lodish et al., 2004).

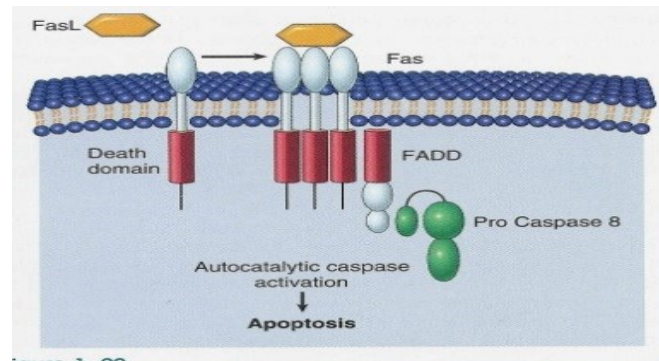


Figura 20- Mecanismo de apoptose via Fas-FasL (Adaptado de Lodish et al., 2004).

2.2.1. Osteossarcoma

O osteossarcoma é um tipo de sarcoma, é um tumor maligno primário associado ao tecido ósseo, pode ocorrer em qualquer idade mas o pico de incidência da patologia surge durante os 20 e os 30 anos (Rapidis, 2008). Tem um mau prognóstico e geralmente é de difícil tratamento a nível de quimioterapia. O tratamento quimioterápico é realizado como adjuvante para melhorar o prognóstico (Liu et al., 2015; Rickel, Fang, & Tao, 2017).

A recidiva desta patologia, manifesta-se localmente ou para ossos distantes, ocorrendo na maior parte das vezes como metástase pulmonar, o que dificulta o prognóstico. A quimioterapia e a cirurgia são os tratamentos de eleição e a taxa de cura é de 58% a 76% (Liu et al., 2015).

Os osteossarcomas surgem dos tecidos mineralizados e correspondem aproximadamente a 20% de todos os sarcomas, 5% dos osteossarcomas ocorrem nos ossos gnáticos. A nível histológico podem ser classificadas em 3 subgrupos, condroblásticos, fibroblásticos e osteoblásticos, definidos de acordo com a presença e natureza da matriz tumoral e local de origem. Os tumores justacorticais, que surgem na superfície do perióstio, designados de osteossarcomas condroblásticos (25%), na qual apresentam um grau variável de áreas de tecido condróide, misturadas com células fusiformes, são caracterizados pela produção de matriz cartilaginosa. Osteossarcomas extra-esqueléticos, originam-se nos tecidos moles, designados do tipo fibroblástico (25%), apresentam células fusiformes indiferenciadas com capacidade de produzir tecido fibroso e o osteossarcoma tipo convencional designado de osteoblástico, surge da cavidade medular, com grau variável de mineralização sendo caracterizado pela

produção em grande quantidade de matriz osteóide (Figura 21) (Rickel et al., 2017; Reguezi et al., 2008).

A síndrome de Li Fraumeni e displasias ósseas como a doença de Paget e displasia fibrosa predisõem à ocorrência de osteossarcomas. Os osteossarcomas também podem surgir após tratamentos com radioterapia (Neill et al., 2013).

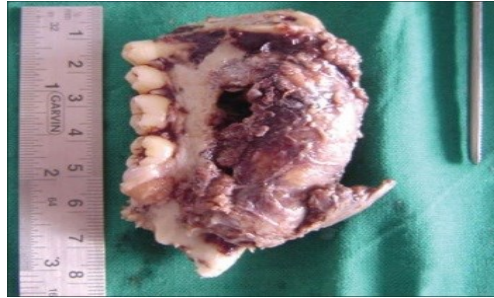


Figura 21- Osteossarcoma na mandíbula (Jornal of oral Maxillofacial Pathology¹.)

A nível de características clínicas, a mandíbula é mais afectada do que a maxila, a maioria dos osteossarcomas mandibulares surgem no corpo da mandíbula. No maxilar superior o tumor localiza-se no seio maxilar e no rebordo alveolar e palato. É uma neoplasia maligna que apresenta uma predilecção pelos homens em aproximadamente 60%, a média de idade em que ocorre esta patologia é de 35 anos (Figura 22) (Neill et al., 2013; Reguezi et al., 2008).

No tratamento clínico os pacientes são tratados de forma idêntica, independentemente dos subtipos desta patologia, as mutações ou genes condutores que originam o osteossarcoma ainda não estão bem esclarecidas (Rapidis, 2008; Rickel et al., 2017).



Figura 22- Osteossarcoma na maxila (Adaptado de Prabhusankar et al., 2016²).

¹ Fonte: <http://www.jomfp.in/text.asp?2014/18/4/143/141371>

² Fonte: <http://www.jispcd.org/text.asp?2016/6/8/171/189762>

Nos osteossarcomas da mandíbula e maxila as características clínicas a nível de sinais e sintomas são dor localizada, mobilidade e perdas dentárias, parestesia envolvendo o nervo alveolar inferior e infraorbitário na mandíbula e maxilar superior, respectivamente, poderá também surgir obstrução nasal e problemas oculares (Neill et al., 2013; Reguezi et al., 2008).

A nível de imagem radiográfica, observa-se espessamento do ligamento periodontal, este é devido à invasão tumoral e poderá também observar-se reabsorção do osso alveolar circundante. Nos tumores avançados as imagens de rx, podem apresentar radiopacidades irregulares e maldefinidas (figura 23), ou então radiotranslucidez tipo “roído de traça” (Reguezi et al., 2008).



Figura 23- Radiografia onde se observa osteossarcoma da mandíbula (Adaptado de Naik et al., 2014³).

2.2.1.1 Avaliação do fitoquímico Nimbolida na terapêutica do Osteossarcoma

Neste modelo de estudo *in vitro*, nimbolida inibiu várias vias de sinalização oncogénicas em células humanas de osteossarcoma, nimbolida reduz a metástase tumoral, diminuindo a expressão de integrina alfaV beta 5, em células de osteossarcoma (Liu et al., 2015).

As integrinas são glicoproteínas transmembranares heterodiméricas que desempenham um papel principal na metástase e invasão das células tumorais, podem activar várias vias de sinalização de sobrevivência e proliferação celular, facilitam a adesão célula-matriz extracelular, célula-célula e migração celular (Schneider, Amend, & Weilbaecher, 2011). Fornecem uma conexão física entre a ECM (matriz extra celular) e o citoesqueleto de actina e participam na sinalização bidirecional através da membrana plasmática (Morse, Brahme, & Calderwood, 2014).

³ Fonte: <http://www.jomfp.in/text.asp?2014/18/4/143/141371>.

Este estudo realizado em células humanas de osteossarcoma, revelou que nimbolida pode regular a migração de células de osteossarcoma através da proteína integrina alfaV beta 5, a expressão da proteína integrina alfaV beta 5 é regulada pelas vias de sinalização PI3K/Akt e NF-KB.

Nos testes in vitro, as células humanas de osteossarcoma foram incubadas com nimbolida durante 24 horas e a percentagem de células em apoptose foi verificada e comparada com o grupo control. Nimbolida tem um papel fundamental nas vias de sinalização PI3K/Akt e NF-KB. O tratamento com nimbolida, diminui a fosforilação da subunidade P65 de NF-KB e a fosforilação das subunidades IKKalpha e IKKbeta, nas células humanas de osteossarcoma. Doses baixas de nimbolida inibiram a invasão e migração celular não afectando a viabilidade celular (Liu et al., 2015).

O retículo endoplasmático (RE) é responsável pela síntese, maturação e enrolamento de proteínas, entre outros, alterações na homeostase do cálcio, acumulação de hipóxia celular, falta de nutrientes, stress oxidativo e outras desregulações metabólicas provocam stress no RE, esse stress é detectado por proteínas sensores de resposta a proteínas desenroladas (UPR), como enzima 1 requer inositol (IRE1), proteína kinase do reticulo endoplasmático (PERK) e o factor de transcrição activado 6 (ATF6), estas proteínas sensor tornam-se activas e recuperam as funções normais no RE, se estas funções não forem corrigidas então estas proteínas poderão provocar apoptose (Bahar, Kim, & Yoon, 2016; Liu et al., 2015).

Na figura 24 podemos observar uma hipótese de modelo de várias vias de activação da apoptose em condições de stress no RE, quando existe stress prolongado no RE, IRE1, PERK e ATF6 podem induzir à sinalização pró-apoptose activando a proteína homóloga do factor de transcrição (CHOP), CHOP é considerado um factor de transcrição que induz apoptose mediada por stress no RE, através da regulação das proteínas pró-apoptose BCL-2 nas membranas das mitocôndrias. A activação de IRE1 pode activar também a via de sinalização pró-apoptose IRE1-TRAF2-JNK provocando apoptose. A associação IRE1-TRAF2 derivada de stress no RE pode activar a prócaspase 12, esta activa a caspase 9, depois a activação da caspase 3 e surge apoptose (Figura 24).

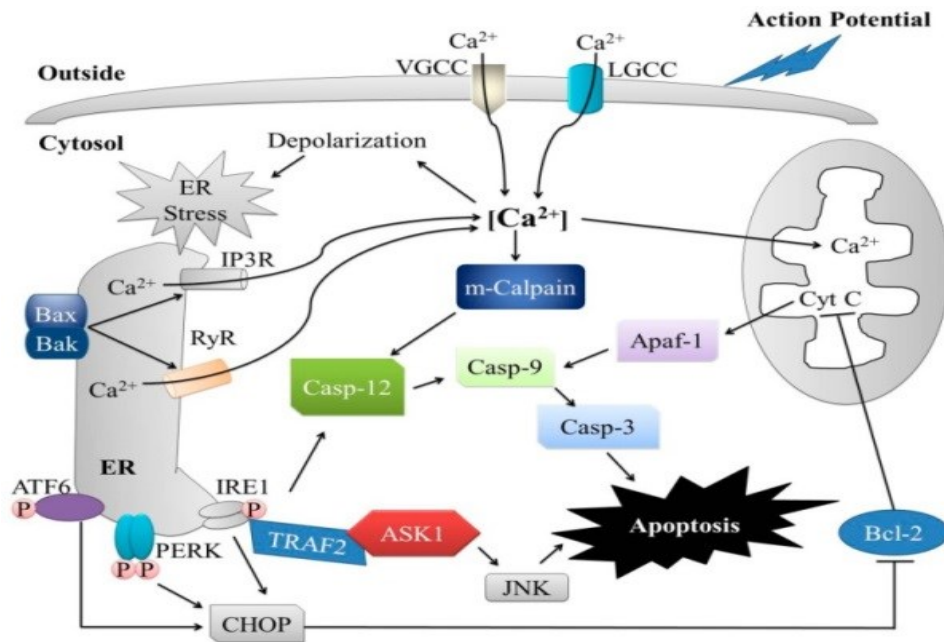


Figura 24- Diferentes vias de apoptose provocadas por stress no retículo endoplasmático (RE) (Adaptado de Bahar et al., 2016).

Um outro mecanismo de ativação da apoptose devido a stress no RE está relacionado com as proteínas BAX e BAK da família BCL-2 pró-apoptose, estas proteínas estão envolvidas na apoptose mediada por cálcio (Ca^{2+}) devido a stress no RE, o Ca^{2+} é um regulador da sobrevivência celular, o aumento de Ca^{2+} no lúmen do RE leva à sua libertação no citosol através dos canais designados receptores inositol 1,4,5 trifosfato (IP3Rs) e receptores rianodina (RyRs), surge despolarização da membrana do RE, existem alterações conformacionais de BAK e BAX existentes na membrana do RE, inicia-se um efluxo de Ca^{2+} para o citosol, este Ca^{2+} vai activar proteínas m-calpaínas, seguidamente estas proteínas vão clivar e activar pró-caspases 12, provocando uma activação na cascata de caspases e surge apoptose (figura 24) (Bahar et al., 2016). As proteínas calpaínas são proteases activadas por cálcio, que clivam várias proteínas alvo activando-as (del Carmen Lafita-Navarro & Conacci-Sorrell, 2019).

O stress do RE poderá activar também a apoptose, através da mitocôndria, que liberta proteínas da família Bcl-2 pró-apoptóticas como Bax e Bak (Liu et al., 2015). O Ca^{2+} libertado através dos receptores IP3Rs do RE em contacto com as mitocôndrias provoca um aumento dos níveis de Ca^{2+} nas mitocôndrias, posteriormente existe uma activação do Citocromo c, bax e bak vão aumentar a permeabilidade do Citocromo c

para o citosol e este activa a Apaf-1, surge activação das caspases 9 e 3 provocando apoptose (figura 24) (Bahar et al., 2016).

Nimbolida activa o mecanismo apoptótico dependente de stress no RE, relacionado com a libertação de cálcio do RE, este fitoquímico induziu à saída do cálcio para o citosol e activou as proteínas m-calpaínas, seguidamente estas vão activar caspases, surge apoptose das células tumorais. Liu et al. (2015), verificaram através de análise western blot que existiu um aumento das proteínas m-calpaínas, o tratamento com nimbolida activou a caspase 9 e 3 provocando apoptose tumoral. Este foi um acontecimento ainda não verificado noutros tipos de cancro (figura 24).

Segundo Liu et al.,(2015), afirmaram que as vias de sinalização apoptóticas relacionadas com stress no RE são complexas, e não especificaram qual a via exacta de apoptose derivada de stress no RE provocada pela molécula nimbolida, relataram que existiu uma saída do Ca^{2+} do RE para o citosol provocando um aumento de proteínas m-calpaínas no citosol, e que futuramente iriam examinar os detalhes desta sinalização na apoptose provocada por stress no RE.

Os autores Liu et al., (2015), referem também que nimbolida provocou apoptose mitocondrial nas células de osteossarcoma aumentando a quantidade de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Liu et al., 2015). As espécies reactivas de oxigénio (ROS) são iões, moléculas ou radicais que apresentam na sua configuração electrónica um electrão desemparelhado, devido a esta característica são altamente reactivas (Liou & Storz, 2010).

Nas células normais, ROS que é constituído principalmente por peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o anião superóxido de hidrogénio (O_2^-) e o radical hidroxilo (OH^-) estão em equilíbrio redox celular com antioxidantes bioquímicos e são produzidos como subprodutos do metabolismo. Um aumento na produção de ROS pode provocar stress oxidativo, que se pode definir como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (Liu et al., 2015; Ziech et al., 2012).

O stress oxidativo provoca peroxidação lipídica, desintegra as membranas celulares que são ricas em ácidos gordos polinsaturados, estas ficam susceptíveis à oxidação, a célula perde toda a sua função (Ahmad et al., 2018).

Os agentes em radioterapia e quimioterapia são tóxicos para as células cancerígenas, devido aumentarem a produção de ROS (Liu et al., 2015). ROS é uma substância metabólica que se forma endogenamente no retículo endoplasmático, nas mitocôndrias e peroxissomas pelas enzimas do citocromo P450 (CYP) mas também se pode formar exógenamente, através da exposição à radiação ionizante e radiação ultravioleta (Figura 25) (Ziech et al., 2012).

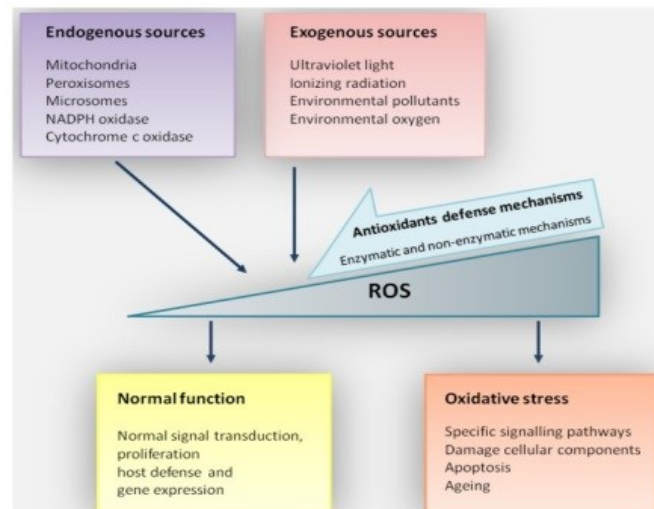


Figura 25- Resposta celular ao efeito das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Adaptado de Wojcik, Kaminska, Blasiak, & Szaflik, 2013).

Na figura 25 podemos observar que ROS se pode formar a nível endógeno e exógeno. A produção de ROS, representada no triângulo de cor cinza, é regulada pelos mecanismos de defesa antioxidantes, em condições normais as moléculas enzimáticas e não-enzimáticas diminuem a quantidade de ROS e mantêm a homeostase celular, importante na manutenção das funções fisiológicas como transduções de sinal, proliferação, defesa do hospedeiro e transcrição genética. Um aumento na produção de ROS pode causar stress oxidativo, levando a apoptose, alteração das vias de transdução de sinal, danos nos componentes celulares e envelhecimento da célula (Adaptado de Wojcik, Kaminska, Blasiak, & Szaflik, 2013).

O aumento de ROS a nível celular, provoca dano celular excessivo resultando na eliminação de células defeituosas através da apoptose (Hao et al., 2014). ROS desempenha um papel principal na apoptose, acumula-se nas mitocôndrias diminuindo o potencial de membrana mitocondrial (MMP), provocando apoptose celular. A apoptose

na mitocôndria está associada a um aumento de stress oxidativo mitocondrial, libertação do citocromo c e activação de caspases (Giampazolias & Tait, 2016; Liu et al., 2015).

Nimbolida provoca um aumento de ROS em células humanas de osteossarcoma, este fitoquímico aumenta o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) nas membranas mitocondriais, diminuindo o potencial de membrana mitocondrial e inicia assim o mecanismo de apoptose nas mitocôndrias, surge aumento de proteínas pró-apoptose, Bak, Bax e Citocromo c, esta liga-se à Apaf-1 e as caspases são activadas provocando apoptose tumoral (Liu et al., 2015).

2.3. Combinação de fitoquímicos de Neem com a Quimioterapia

A actividade, quimiopreventiva e antígeno-tóxica dos compostos da folha de Neem, no carcinoma oral das células escamosas é mediada pela indução da quantidade de antioxidantes (Dasgupta et al., 2004).

O aumento de antioxidantes a nível sanguíneo está relacionado com baixa incidência de cancro (Dasgupta et al., 2004; Priyadarsini et al., 2009). Neem é constituído por vários princípios activos com propriedades antioxidantes, a principal função do antioxidante é neutralizar os radicais livres, evitando danos celulares (Ahmad et al., 2018). A neutralização da acção dos radicais livres é importante na prevenção de várias patologias (Alzohairy, 2016).

Em estudos realizados por Dasgupta et al.,(2003), 80% de extracto da folha de Neem foi utilizado em duas doses diferentes, 250 e 500mg por kg de peso corporal, em animais de laboratório com tumores no fígado, pulmão e rim, induzidos pelo benzopireno. Para avaliar a capacidade deste extracto na desintoxicação destes órgãos, verificou-se o aumento de várias enzimas antioxidantes, como a glutathione s-transferase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase que protegem as macromoléculas celulares contra danos oxidativos. O aumento da superóxido dismutase, provoca a remoção de ROS (espécies reactivas de oxigénio), a catalase ajuda a remover o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), produzido pela actividade da superóxido dismutase, a actividade da super óxido dismutase (SOD) em conjunto com a catalase, explica a diminuição da peroxidação lipídica, que é um indicador de stress oxidativo existente na célula (Dasgupta et al., 2004).

Os compostos de Neem apresentam uma boa sinergia com alguns medicamentos anti-cancerígenos, aumentando a eficácia de alguns compostos quimioterápicos (Hao et al., 2014). A hidroxiureia é um medicamento usado frequentemente na anemia falciforme, infecção pelo vírus da imunodeficiência humano (HIV) e em vários tipos de cancro (Ahmad et al., 2018).

Segundo Ahmad et al. (2018), foi demonstrado a eficácia de nimbolida, esta molécula diminui os efeitos adversos causados pela Hidroxiureia. Neste teste clínico, realizado em animais, nimbolida melhorou, a peroxidação lipídica, a fisiologia dos hepatócitos e dos corpúsculos renais, que estava alterada devido aos efeitos adversos da Hidroxiureia, o autores sugeriram que nimbolida poderá ser uma molécula adjuvante nos tratamentos com o medicamento hidroxiureia reduzindo a toxicidade induzida pela quimioterapia.

Moneim et al. (2014), avaliaram a acção protectora, do extracto metanólico de folhas de Neem (MLEN), por via oral, 500 miligramas/Kg de peso corporal em animais de laboratório, no stress oxidativo e nefrotoxicidade induzido pela cisplatina (CP), sendo esta injectada intraperitoneal 5 miligramas/Kg. A cisplatina é uma das principais moléculas químicas utilizadas na quimioterapia, em carcinomas do ovário, pulmão, bexiga, cabeça e pescoço e outros tipos de cancro, o principal efeito colateral deste composto é a nefrotoxicidade, 20% dos pacientes que usam cisplatina apresentam lesão renal grave, que leva a uma insuficiência renal aguda. Os túbulos proximais das células renais são os mais afectados, devido à cisplatina se acumular no rim em maior quantidade do que nos outros órgãos. A CP provoca stress oxidativo renal seguidamente existe um aumento de ROS e RNS (espécies reactivas de nitrogénio) a resposta a esta actividade é um grande aumento da inflamação, a actividade do factor transcrição nuclear NF-kB aumenta nas células renais dos ratos provocando aumento de quimiocinas e citocinas. A intoxicação com cisplatina provocou uma diminuição da actividade das enzimas antioxidantes renais como a super óxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) comparando com o grupo control. A toma oral de MLEN (extracto metanólico das folhas de Neem) antes ou depois do tratamento com CP melhorou significativamente a função renal dos animais de laboratório, diminui as lesões nos túbulos e corpúsculos renais, esta actividade protectora celular deve-se à grande quantidade de antioxidantes presentes nos polifenóis, que apresentam a capacidade de

remoção dos radicais livres e aumentam as enzimas de defesa antioxidantes, protegendo os rins do stress oxidativo (Abdel Moneim, Othman, & Aref, 2014).

II.3. Evidências da atividade antimicrobiana de Neem na Microbiota Oral

3.1. Avaliação da atividade dos fitoquímicos de Neem em Endodontia

Os efeitos colaterais das drogas sintéticas e o aumento das cepas resistentes aos antibióticos, chamadas de bactérias multirresistentes, têm promovido vários pesquisadores a procurar alternativas, analisando moléculas naturais (Al Saiqali, Tangutur, Banoth, & Bhukya, 2018; Ghonmode et al., 2013).

Os limonóides são um exemplo de substâncias lipossolúveis com grupos funcionais como fenóis, álcoois ou aldeídos que interferem nas proteínas enzimáticas associadas ou integradas nas membranas bacterianas parando a sua produção e actividade (Borzini, Condò, De Dominicis, Casaglia, & Cerroni, 2016).

As plantas medicinais são fontes muito ricas de micro e macromoléculas bioactivas como proteínas e pequenos péptidos com aplicação terapêutica. Estas proteínas e péptidos, isolados de extractos de plantas poderão ser uma alternativa co-adjuvante às que existem a nível farmacêutico, pois estes compostos naturais apresentam um amplo espectro de actividade biológica, em relação a bactérias, fungos e vírus (Al Saiqali et al., 2018).

Al Saiqali et al.,(2018), avaliou in vitro a actividade bactericida de polipéptidos de baixo peso molecular entre os 11 e os 250 KDa extraídos das folhas de Neem em relação a várias bactérias patogéneas em humanos, tais como, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* e a estirpe fúngica *Candida tropicalis*. Os polipéptidos com tamanho entre os 11 e os 20 KDa foram os que apresentaram melhor actividade antimicrobiana. *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Candida tropicalis* foram os que mostraram a maior zona de inibição de crescimento. O mecanismo de acção pelo qual as proteínas e os polipéptidos extraídos

de Neem actuam ainda não está bem definido poderá actuar de duas formas, uma é na membrana das bactérias em que existe uma ruptura, a outra forma é a nível intracelular provocam lise da bactéria. *Pseudomonas aeruginosa* foi a única bactéria das gram negativas sensível.

Segundo, Al Saiqali et al.,(2018), existem algumas hipóteses, uma destas é que as bactérias gram negativas são constituídas por uma membrana interna rica em fosfolípidos de fosfatidiletanolamina que não vão ficar expostos ao meio ambiente, devido a estarem cobertos de lipopolissacáridos aniónicos e os peptídeos só se ligam às membranas bacterianas quando os fosfolípidos de fosfatidiletanolamina ficam expostos, outra explicação é as bactérias gram negativas apresentam capacidade de alterar as suas cargas de potencial de membrana (Al Saiqali et al., 2018).

Os compostos fitoquímicos que estão presentes em Neem com atividade bactericida eficaz são nimbolida, azadiractina, ácido gálico, nimbidina, nimbina, catequinas e epicatequinas. O que apresenta actividade antimicrobiana mais potente é azadiractina (Lakshmi, Krishnan, Rajendran, & Madhusudhanan, 2015). A acção antibacteriana do princípio activo azadiractina, destrói a parede celular em bactérias, alterando a pressão osmótica, provocando a morte bacteriana (chatterjee et al., 2011).

Desde 1894, Miller provou existirem bactérias no interior dos canais radiculares, esses microorganismos provocavam patologias perirradiculares e pulpares (Babaji, Jagtap, Lau, Bansal, & Thajuraj, 2016; Misuriya et al., 2014). Nestes canais radiculares com necrose pulpar existem mais de 700 espécies microbianas diferentes, algumas das quais ainda não foram identificadas (Borzini et al., 2016).

As infecções endodônticas são de natureza polimicrobiana, onde predominam as bactérias anaeróbias obrigatórias (Almadi & Almohaimede, 2018; Borzini et al., 2016; Tyagi et al., 2013).

Podem ser agrupadas com base na localização anatómica da infecção, designadas de intra-radiculares e extra-radidulares. As infecções intra-radiculares podem ser divididas em infecções primárias, secundárias e persistentes, na infecção primária os microorganismos inicialmente invadem e colonizam o tecido pulpar necrótico, na infecção secundária os microorganismos que não estavam presentes no início do tratamento entram pelos canais radiculares após ou durante a intervenção terapêutica como em casos de cáries remanescentes, dentes mantidos abertos para

drenagem, material contaminado, mau uso do isolamento absoluto, fractura e perda de material restaurador. A infecção secundária pode apresentar apenas uma única espécie, na sua maioria gram+ (gram positivos) facultativos e podem ser espécies orais e não orais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*, espécies de *Candida* e *Enterococcus faecalis*.

A Infecção endodôntica persistente é considerada a principal causa dos problemas endodônticos como, flare-up, exsudação e sintomatologia persistente. É caracterizada pela existência de microorganismos que pertenceram à infecção endodôntica primária ou secundária mas adquiriram resistência durante o tratamento dos canais radiculares, geralmente são bactérias anaeróbias gram+ e o fungo *Candida albicans* (Floriano et al., 2016; Ozsezer & Onuk, 2017).

Uma das principais causas das infecções persistentes nos canais radiculares é a invasão dos túbulos dentinários por vários tipos de microorganismos, uma vez que a anatomia e profundidade desses túbulos dentinários dificultam a penetração dos vários tipos de substâncias utilizadas nos canais radiculares em endodontia (Chandra, Kumar, Reddy, & Kiran, 2015; Dutta & Kundabala, 2014; Sinha et al., 2015).

A erradicação destes microorganismos no canal radicular é fundamental para evitar que eles alcancem os tecidos periapicais (Ghonmode et al., 2013).

O objectivo do tratamento endodôntico é eliminar vários tipos de microorganismos dos canais radiculares e câmara pulpar proporcionando um ambiente favorável na cicatrização dos tecidos (Babaji et al., 2016; Borzini et al., 2016; Ghonmode et al., 2013).

A desinfecção dos canais radiculares dentários é realizada de duas formas, através de meios químicos, com soluções de irrigação e a outra forma é a acção mecânica fazendo a instrumentação com limas, criando uma condição favorável para a cura perirradicular (Almadi & Almohaimede, 2018; Borzini et al., 2016; Mustafa, 2016).

Uma terapia endodôntica com sucesso, depende de três factores principais, a instrumentação, desinfecção e obturação adequadas, reduzindo as colónias bacterianas em aproximadamente 95% (Borzini et al., 2016).

O tratamento endodôntico exige desbridamento e desinfecção eficazes dos canais radiculares e do biofilme, seis semanas é o tempo necessário para o biofilme iniciar a mineralização (Garg et al., 2014). O biofilme é constituído por uma matriz extracelular que actua como uma protecção das bactérias tornando-as mil vezes mais resistentes aos anticorpos e agentes antimicrobianos (Garg et al., 2014; Misuriya et al., 2014).

O biofilme em endodontia pode ser classificado como, biofilme extrarradicular, intrarradicular, periapical e biofilme formado em biomateriais. É caracterizado por populações de bactérias polimicrobianas constituídas por células que apresentam vários fenótipos diferentes de crescimento alterados, ligados a um substrato, localizadas numa matriz de polissacarídeos, que aderem às superfícies dentárias ou entre elas. A formação do biofilme corresponde a várias etapas, no início surge a deposição do biofilme, depois a adesão e colonização dos microorganismos, seguidamente inicia-se o crescimento bacteriano, que provoca a expansão do biofilme e no final surge o desprendimento dos microorganismos ao seu redor (Figura 26) (Chandra et al., 2015).

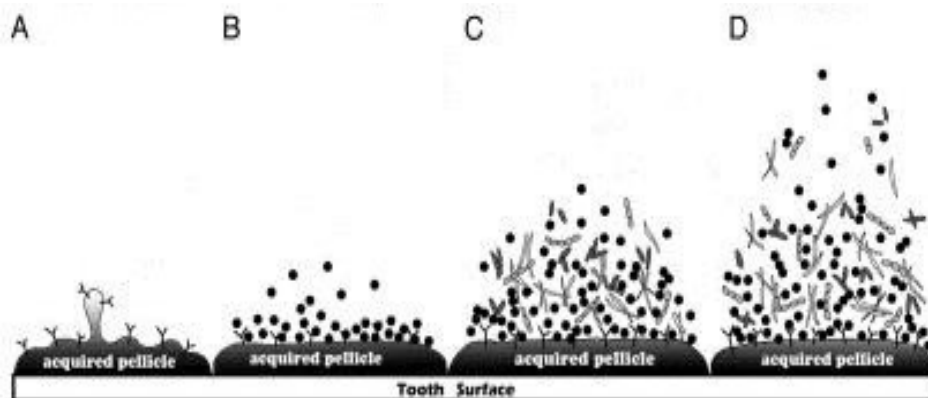


Figura 26- Formação do biofilme nas superfícies dentárias. A - formação da película; B - adesão inicial; C - maturação; D - dispersão (Adaptado de Huang et al., 2011).

Técnicas de instrumentação em endodontia induzem à formação de uma camada de smear layer (Misuriya et al., 2014). A camada de smear layer é constituída por detritos inorgânicos como restos de dentina e componentes orgânicos, tais como microorganismos e tecido remanescente de necrose pulpar de processos odontoblásticos. Apresenta duas camadas, uma mais superficial de 1-2 micrómetros de espessura e uma porção mais dentro dos túbulos dentinários que chega a 40 micrómetros de profundidade, estando frouxamente aderida aos túbulos dentinários. A remoção da smear layer produz uma melhoria na desinfecção de microorganismos, ao abrir os túbulos dentinários vai permitir uma melhor penetração da medicação e soluções

irrigantes, diminuindo a sua quantidade de microorganismos e adaptando melhor as superfícies dos canais na aderência com o material de preenchimento do canal (Figura 27) (kuruvilla et al., 2015; Misuriya et al., 2014; Pintor et al., 2016).

A utilização de substâncias ou irrigantes que dissolvam a camada de smear layer nos canais radiculares reduz as hipóteses de multiplicação e sobrevivência de microorganismos (Ghonmode et al., 2013; Haapasalo, Shen, Wang, & Gao, 2014).

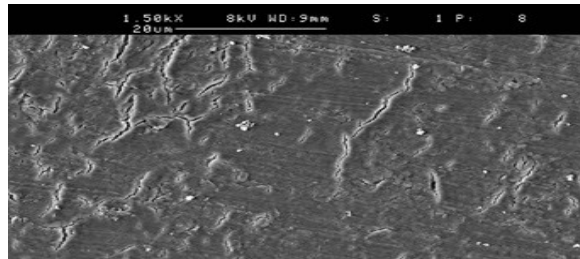


Figura 27- Camada de smear layer na parede do canal radicular após a instrumentação (Adaptado de Haapasalo et al., 2014).

Durante e após a instrumentação uma solução irrigante facilita a remoção do tecido inflamado necrótico e detritos de dentina (Haapasalo et al., 2014). A irrigação no tratamento endodôntico apresenta muitas funções importantes, nos canais radiculares estas funções podem variar de acordo com a utilização do tipo de irrigante (Borzini et al., 2016; Haapasalo et al., 2014).

Um irrigante ideal deve ser relativamente barato, fácil de aplicar, ter a capacidade de dissolver a camada de smear layer que se forma devido à instrumentação, ter um amplo espectro antimicrobiano, apresentar baixa tensão superficial para alcançar áreas inacessíveis às limas, não causar descoloração dos dentes, não pode ser carcinogênico nem tóxico, deverá ser biocompatível, uma vez que existe um contacto próximo aos tecidos do periodonto (Borzini et al., 2016).

Existem algumas substâncias de extractos vegetais que têm demonstrado resultados promissores in vitro, futuramente estas substâncias poderão ser uma alternativa ao hipoclorito de sódio em tratamentos endodônticos (Borzini et al., 2016).

O hipoclorito de sódio (NaOCl), tem sido utilizado durante mais de 70 anos, é um dos irrigantes endodônticos mais recomendados e utilizados, devido à sua

capacidade de dissolver tecidos orgânicos e acção antibacteriana (Borzini et al., 2016; Ghonmode et al., 2013).

Apresenta propriedades germicidas, relacionadas com a formação do ácido hipocloroso, devido à libertação dos iões de cloreto em solução, o seu ph elevado contribui para a dissolução dos tecidos necróticos (Misuriya et al., 2014). O NaOCl (hipoclorito de sódio) ioniza em água o sódio (Na^+) e os iões hipoclorito (OCl^-) e estabelece um equilíbrio com o ácido hipocloroso (HOCl). Em ph ácido e neutro, a maior parte do cloro existe como HOCl (ácido hipocloroso) enquanto em ph de 9 e acima, o ião OCl^- (hipoclorito) é o mais abundante. O ácido hipocloroso tem um efeito antibacteriano mais forte, o ião OCl^- (hipoclorito) é menos efectivo (Haapasalo et al., 2014).

A acção antibacteriana do ácido hipocloroso, ocorre devido à oxidação de enzimas bacterianas provocando desorganização no metabolismo dessas bactérias (Misuriya et al., 2014). O ácido hipocloroso afecta directamente as funções vitais da célula microbiana, resultando rapidamente em morte celular. O hipoclorito de sódio é usado em concentrações entre 1 e 6%, em alta concentração apresenta uma acção mais eficaz do que as soluções de 1 e 2% (Haapasalo et al., 2014). Em concentrações baixas diminui a sua acção antimicrobiana e a sua capacidade de dissolução dos tecidos (Ghonmode et al., 2013).

Embora seja um dos irrigantes mais utilizados em endodontia apresenta algumas desvantagens, pode causar dor severa e duradoura quando existe extrusão desta substância química pelo foramen apical ao atingir os tecidos perirradiculares (Babaji et al., 2016; Borzini et al., 2016; Garg et al., 2014; Haapasalo et al., 2014). Em altas concentrações também apresenta a desvantagem de provocar dissolução de restos de polpa necrótica e vital, outra desvantagem do NaOCl é a diminuição da resistência mecânica na dentina provocando deterioração das proteoglicanas e do colagénio, predispondo o dente á fractura vertical (Borzini et al., 2016; Ghonmode et al., 2013). O hipoclorito de sódio apresenta gosto desagradável e não possui a capacidade de remover a camada de smear layer (Babaji et al., 2016; Garg et al., 2014; Ghonmode et al., 2013).

Geralmente em endodontia após a utilização de hipoclorito de sódio utiliza-se o ácidoetilenodiaminotetracético (EDTA), este é usado como irrigante final na remoção da smear layer (Ghonmode et al., 2013; Haapasalo et al., 2014). Os agentes quelantes como o EDTA produzem uma superfície radicular limpa para posterior obturação (Figura 28) (kuruvilla et al., 2015; Misuriya et al., 2014; Pintor et al., 2016).

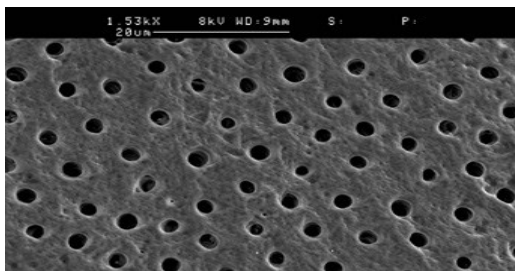


Figura 28- Parede do canal radicular onde foi utilizado NaOCl durante a instrumentação endodôntica e no final foi usado o irrigante EDTA (Adaptado de Haapasalo et al., 2014).

O tratamento endodôntico do hipoclorito de sódio alternado com o EDTA deve ser evitado devido ao EDTA neutralizar a actividade antibacteriana do NaOCl. Quando existe a remoção da smear layer pelo uso de EDTA, o NaOCl não deve ser usado novamente uma vez que causa erosão na dentina e conseqüentemente colapso dos túbulos dentinários (Haapasalo et al., 2014).

O EDTA apresenta actividade microbiana reduzida enfraquecendo a membrana da célula bacteriana sem provocar a sua morte, a sua acção principal é remover a parte inorgânica da dentina e a camada de smear layer. Pode actuar de forma sinérgica com outras substâncias, como a clorexidina que apresenta uma acção mais potente na parede celular bacteriana (Haapasalo et al., 2014).

A clorexidina foi descoberta em 1950, e presentemente é uma das substâncias mais eficazes na Medicina Dentária (Prashant et al., 2007). O gluconato de clorexidina ou clorexidina é constituído por um sal de clorexidina e um ácido glucónico, é usado na periodontite, gengivite e como desinfectante dos canais radiculares, melhorando a regeneração e cicatrização dos tecidos (Chandra et al., 2015).

A clorexidina na presença de sangue mantém a sua acção antimicrobiana, essa eficácia da clorexidina é devido á interacção da carga positiva da molécula e a carga negativa do grupo fosfato da parede celular do microorganismo, isto vai permitir a destruição da parede celular. A molécula de clorexidina é hidrofóbica e lipofílica, com carga positiva, interage com os fosfolípidos e lipopolissacáridos carregados negativamente na membrana celular dos microorganismos, entra na célula e altera o equilíbrio osmótico da célula, isso provoca um aumento de permeabilidade da parede

celular à molécula de clorexidina. Seguidamente existe uma perda dos constituintes intracelulares, como os ácidos nucleicos e adenosina trifosfato (ATP), o citoplasma fica congelado devido á perda dos constituintes celulares (Sinha et al., 2015).

A clorexidina apresenta uma acção antimicrobiana de amplo espectro contra organismos gram negativos e gram positivos (Haapasalo et al., 2014). Possui uma alta substantividade, isto é, uma grande capacidade de se ligar aos tecidos orais por períodos prolongados, onde é libertada lentamente (Kuruvilla Jr.,1998).

É usada em Medicina Dentária na presença de placa bacteriana, em endodontia geralmente utiliza-se como irrigante final após o EDTA, devido a não causar erosão dentinária. A clorexidina não deve ser usada como único agente irrigante na terapêutica endodôntica, uma vez que não dissolve matéria inorgânica e orgânica. Uma vantagem desta substância em relação ao hipoclorito de sódio, é que se existir uma extrusão para a zona periapical não causa dor. No entanto provoca a morte de bactérias mais lentamente que o hipoclorito de sódio e a sua acção em biofilmes bacterianos é mais fraca do que 5 e 6% de NaOCl (Haapasalo et al., 2014).

A inter-acção entre clorexidina e NaOCl (hipoclorito de sódio) apresenta um risco sistémico, pois pode decompor-se em sub-produtos reactivos como a formação de um precipitado castanho alaranjado que contém paracloroanilina uma substância potencialmente cancerígena (Babaji et al., 2016; Borzini et al., 2016; Haapasalo et al., 2014). O canal radicular deve ser lavado, por exemplo com soro fisiológico ou água entre o uso desses dois cloretos, com a intenção de evitar reacções químicas tóxicas (Haapasalo et al., 2014).

Actualmente nenhuma das soluções irrigantes em endodontia pode ser considerada ideal, presentemente a combinação de soluções irrigantes com uma sequência específica é importante, pois contribui para o sucesso nos tratamentos endodônticos (Haapasalo et al., 2014).

O uso de compostos de Neem como irrigantes endodônticos, pode ser vantajoso, a biocompatibilidade destes compostos poderá não provocar dor e lesões em tecidos periapicais (Ghonmode et al., 2013).

Um estudo realizado in vitro por Mustafa (2016), verificou no teste de difusão em agar que a eficácia dos extractos de Neem era comparada a 2% de clorexidina e 3%

de NaOCl, concluindo que estes extractos poderiam ser usados na desinfecção dos canais radiculares em endodontia (Mustafa, 2016).

A clorexidina possui actividade reduzida contra o biofilme formado por *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (Borzini et al., 2016). *E. faecalis*, é uma bactéria gram positiva responsável por 80 a 90% das infecções pulpares, é o coco anaeróbio facultativo patogénico predominante associado ao retratamento endodôntico. Apresenta capacidade de invasão dos túbulos dentinários e não depende da sobrevivência das outras bactérias (Babaji et al., 2016; Chandra et al., 2015; Ghonmode et al., 2013).

E. faecalis, resiste às altas concentrações de medicamentos intracanalares, às amplas variações de PH e a irrigantes endodônticos (Chandra et al., 2015). A capacidade de adaptação de *E. faecalis* a condições ambientais adversas, pode ser uma vantagem em relação a outras espécies (Borzini et al., 2016).

Sobrevive em condições adversas devido à formação de biofilmes, aumentando a capacidade de resistência bacteriana após tratamentos antimicrobianos em canais radiculares, com alta prevalência na infecção endodôntica secundária (Babaji et al., 2016; Bhardwaj, Srivastava, Rana, Adlakha, & Asthana, 2018; Borzini et al., 2016; Garg et al., 2014).

Segundo Ghonmode et al. (2013), extractos de folha de Neem apresentaram *in vitro*, maiores zonas de inibição bacteriana contra *E. faecalis*, em relação ao hipoclorito de sódio a 3%, este estudo foi realizado em placas de agar medindo a zona de inibição (Ghonmode et al., 2013).

A actividade antibacteriana de Neem é atribuída à presença dos princípios activos como, nimbolida, gedunina e azadiractina. Estes compostos desacoplam a fosforilação oxidativa mitocondrial, inibindo assim a cadeia respiratória. Isso provoca uma actividade antiaderente, alterando a adesão bacteriana e a capacidade do microorganismo colonizar, causando redução máxima na aderência de *E. faecalis* à dentina (Garg et al., 2014).

No ensaio *in vitro* realizado por Dutta & Kundabala (2014), em que o objectivo foi avaliar a acção antimicrobiana do extracto etanólico de Neem como irrigante endodôntico, comparando este extracto com hipoclorito de sódio e gluconato de clorexidina em 36 dentes anteriores unirradiculares com patologia pulpar. Obtiveram-se esfregaços pré-irrigantes e pró-irrigantes e foram colocados em placas de agar, os canais

radiculares dos pacientes foram irrigados com 3ml do irrigante. Posteriormente as culturas incubaram a 37°C em meio anaeróbio, passadas 72h os organismos foram contados como unidades formadoras de colônias/ml (UFC/ml).

Estes procedimentos foram realizados em 6 grupos diferentes e em cada grupo foram avaliados 6 dentes, o grupo 1 com hipoclorito de sódio, grupo 2 continha gluconato de clorexidina, grupo 3 apresentava extracto etanólico das folhas de Neem, grupo 4 existia uma combinação de hipoclorito de sódio com extracto etanólico das folhas de Neem, grupo 5 combinação de clorexidina com extracto etanólico das folhas de Neem e o grupo 6 era o grupo control com uma solução salina.

O estudo demonstrou que o irrigante com extrato de Neem possui eficácia antimicrobiana em canais radiculares, segundo Dutta & Kundabala (2014), as combinações de irrigantes utilizados neste estudo, extracto etanólico das folhas de Neem combinado com clorexidina correspondente ao grupo 5 e extracto etanólico das folhas de Neem combinado com hipoclorito de sódio pertencente ao grupo 4, apresentam melhores propriedades antimicrobianas que o uso dos irrigantes individualmente, existe um efeito sinérgico em que o extracto de Neem poderá ter rompido o biofilme aderido às paredes do canal radicular, auxiliando o hipoclorito de sódio na permeabilização bacteriana (Figura 29) (Dutta & Kundabala, 2014).

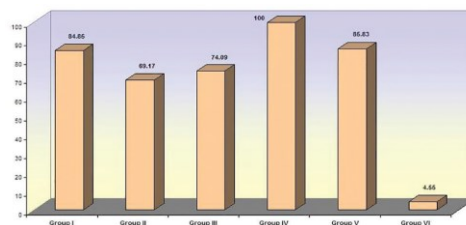


Figura 29- Comparação realizada em percentagem, na redução de microorganismos formados em meio anaeróbio. Grupo I – hipoclorito de sódio; grupo II – gluconato de clorexidina; grupo III – extracto etanólico da folha de neem; grupo IV – combinação de hipoclorito de com extracto etanólico da folha de neem; grupo V – combinação de clorexidina com extracto etanólico da folha de neem; grupo VI – solução salina (Adaptado de Dutta & Kundabala, 2014).

O fungo *Candida albicans* (*C. albicans*) produz várias enzimas hidrolíticas que estão relacionadas com a destruição dos tecidos perirradiculares e do colagénio da dentina tipo 1 e 4, este fungo, também é constituído por moléculas na sua superfície celular que medeiam a adesão do fungo aos tecidos orais. *Candida albicans* é um fungo dimórfico que se apresenta em forma de hifas e levedura, ambas as formas provocam infecção (Sinha et al., 2015).

Geralmente *Candida albicans* é o fungo que predomina em retratamentos endodônticos, formando biofilmes. A formação do biofilme de *Candida albicans*,

apresenta um período inicial de aderência de 0 a 2 horas, seguidamente formam-se microcolônias entre 2 a 4 horas, depois surge alteração na sua morfologia, transição das formas de leveduras para pseudo-hifas e hifas em 4 a 6 horas. As microcolônias interligam-se através das extensões das hifas formando uma monocamada, entre 6 a 8 horas. O biofilme vai amadurecendo e assume arquitectura 3D heterogénica constituído por células de levedura, pseudo-hifas e hifas. A alteração na morfologia do fungo *C. albicans*, de levedura para hifas, mudança dimórfica é um fator essencial na formação de biofilmes, aumentando o potencial patogénico de *C. albicans*. Os mutantes de *C. albicans* que são deficientes na produção de hifas demonstram uma incapacidade de formar biofilmes 3D (Tyagi et al., 2013).

A capacidade inicial de adesão produzida pelo fungo *Candida*, influencia a sua capacidade de infecção e o seu potencial em colonizar (Polaquini, Svidzinski, Kimmelmeier, & Gasparetto, 2006).

Os compostos de Neem contribuem para a actividade antifúngica, inibem a adesão microbiana e a capacidade do microorganismo fazer a sua colonização na dentina (Sinha et al., 2015). Os extratos de Neem aumentam as concentrações dos compostos bioactivos e conseqüentemente aumenta o efeito fungicida.

Segundo Mahmoud et al. (2011), demonstraram *in vitro* que a atividade antifúngica de Neem contra *C. albicans* poderá ser devido á acção sinérgica dos diferentes constituintes do extracto de Neem (Mahmoud, D.A;Hassanein, N.M.;Youssef, K.A.; Abou Zeid, 2011).

No ensaio *in vitro* realizado por Sinha et al., (2015) referente á desinfecção dos túbulos dentinários em 105 dentes pré-molares extraídos em mandibulas para tratamento ortodôntico, essa desinfecção foi feita a 200 e 400 micrómetros de profundidade ao 1, 3 e 5 dias com 2% clorexidina, hidróxido de cálcio, extracto aquoso e alcoólico de Neem e própolis contra o biofilme formado por *Candida albicans*, concluíram que Neem apresentou uma acção igualmente eficaz em relação é clorexidina a 2% sendo uma boa alternativa (Sinha et al., 2015).

II.4. Evidências da acção de Neem na Candidiase Oral

Na maioria das infecções designadas de Candidiase oral a espécie *C. Albicans* é o fungo mais comum que está presente na cavidade oral (Doddana et al., 2012). *Candida*

albicans reside na cavidade oral das pessoas saudáveis, apresentando uma patogenicidade diminuída, existe uma necessidade de factores que predisõem á doença (Reguezi et al.,2008).

As infecções orais por *Candida*, são consideradas infecções oportunistas, têm aumentado em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes que fazem quimioterapia, em diabéticos, no uso de próteses dentárias e antibióticos (Barua, Basavanna, & Varghese, 2017; Reguezi et al., 2008).

A forma aguda pseudomembranosa é a que ocorre mais frequentemente na cavidade oral, também conhecida como sapinho, os idosos e os bebés são os mais afectados, os bebés é devido ao seu sistema imunitário imaturo, os idosos é consequência do seu sistema imune debilitado, esta patologia é também comum em pacientes tratados com quimioterapia e radioterapia. As lesões orais relacionadas com a Candidíase aguda pseudomembranosa são colónias brancas tipo placas macias, compostas por fungos, células epiteliais descamadas, células inflamatórias, fibrina e bactérias.

A localização da patologia na cavidade oral é a língua, mucosa jugal, fundo do vestibulo e orofaringe, geralmente a pseudomembrana permanece intacta e os sintomas associados são poucos, surge alguma ardência e sensibilidade (figura 30 A). Quando a pseudomembrana é perdida a candidíase classifica-se como candidíase eritematosa aguda, onde surgem lesões vermelhas, este tipo de Candidíase é muito frequente associado ao uso de antibióticos, os sintomas aqui são mais acentuados devido à inflamação e erosão (Figura 30 B) (Reguezi et al., 2008).

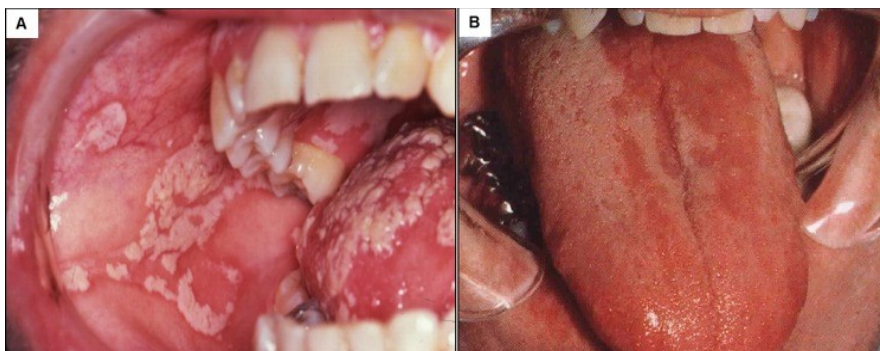


Figura 30- A – candidíase pseudomembranosa; B – candidíase eritematosa aguda (Adaptado de Jabra-rizk et al., 2016).

A candidíase eritematosa crónica ou também designada de estomatite protética é considerada um tipo de candidíase oral e está associada a pacientes que usam próteses, afectando aproximadamente 65% desse grupo de pessoas, geralmente são pacientes que

fazem quimioterapia, imunocomprometidos e idosos (Kumar SM, Kumar V A, Natarajan P, 2018; Reguezi et al., 2008). Surge uma inflamação da mucosa onde a prótese acenta (Barua et al., 2017; Reguezi et al., 2008).

As características clínicas são a área da superfície da mucosa oral que serve de base á prótese fica vermelha, pouco queratinizada com aspecto de veludo e rugosa (Figura 31) (Reguezi et al., 2008).

A sua etiologia é multifactorial, como trauma oclusal devido a próteses mal adaptadas, infecções fúngicas existentes, uso contínuo das próteses sem um período de remoção para descanso dos tecidos orais, falta de higiene oral e alergia ao material da prótese. Próteses que apresentam rugosidades e microporos, estarão mais sujeitas á aderência do fungo *Candida albicans* e conseqüentemente a formação de colónias na superfície protética (Kumar SM, Kumar V A, Natarajan P, 2018).

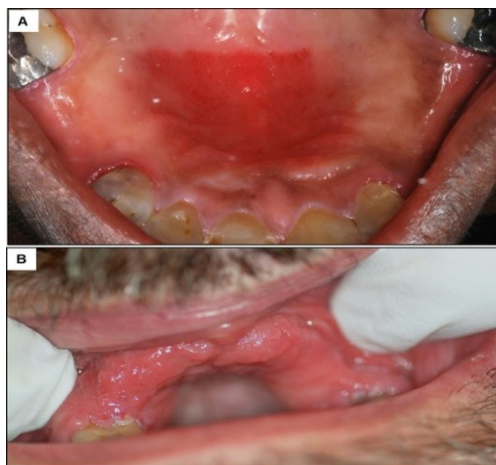


Figura 31 - Manifestações clínicas da estomatite protética (Adaptado de Jabra-Rizk et al., 2016).

Existem outras espécies de microorganismos que estão associadas também á etiologia da estomatite protética, são biofilmes de multiespécies onde se pode incluir o *Streptococcus mutans* e o *Staphylococcus aureus* (Barua et al., 2017).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), causa várias patologias, desde pequenas infecções cutâneas ou então patologias mais graves, como endocardite, pneumonia, osteomielite e septicémia (G. H. Kumar, Vidya Priyadarsini, Vinothini, Vidjaya Letchoumy, & Nagini, 2010).

No ensaio *in vitro* realizado por Sarkar et al.,(2016), foi revelada a actividade antibacteriana de nimbolida este composto provocou a inibição da parede celular e conseqüentemente inibição do biofilme formado por estirpes *S.aureus*, em que a formação do biofilme foi reduzida, devido à estrutura do biofilme ser interrompida. A

exposição de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) ao nimbolida durante um longo período de tempo, 8 semanas, não provocou nenhuma resistência a esta molécula (P. Sarkar et al., 2016).

Apesar de vários antifúngicos serem eficazes no tratamento da candidíase, não é incomum o fungo *Candida albicans* apresentar resistências durante as terapias. Alternativas antimicrobianas têm sido propostas e o uso de princípios activos vegetais é considerada uma opção com grande potencial em patologias de origem fúngica (Doddana et al., 2012).

Os condicionadores de tecidos usados em próteses são utilizados para adaptarem e tratarem as zonas das próteses mal adaptadas que provocam lesões na mucosa, são aplicados nas superfícies das próteses ajudando a distribuir as forças oclusais durante a mastigação, produzindo também um efeito de amortecimento entre a base da prótese e os tecidos orais, melhorando assim a saúde dos tecidos. Estes condicionadores geralmente são mais propensos á colonização de microorganismos em comparação com o material acrílico das próteses dentárias, estão sujeitos á adesão do fungo *C. albicans* (Figura 32) (Barua et al., 2017; Kumar SM, Kumar V A, Natarajan P, 2018).



Figura 32- Condicionador de tecidos usado em próteses (Revista Brasileira de Prótese Clínica & laboratorial, 2003⁴).

O uso de substâncias antimicrobianas em condicionadores de tecidos orais pode ser benéfico no controle de microorganismos, reduzindo o risco de contrair infecções. O ensaio in vitro de Barua et al.,(2017), demonstrou o efeito antibacteriano e antifúngico do extracto de Neem incorporado num condicionador de tecidos contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, concluindo que Neem poderá ser usado no tratamento da estomatite protética. As principais vantagens do uso de Neem, é a sua baixa toxicidade e

⁴ Fonte: <https://www.dtscience.com/wp-content/uploads/2015/11/Cirurgia-Pr%C3%A9-prot%C3%A9tica-Utilizando-Laser-de-Diodo-Associada-a-Reembasamento-Com-Condicionador-de-Tecidos-Relato-de-Caso-Cl%C3%ADnico.pdf>

até ao momento não existe nenhuma resistência de microorganismos (Barua et al., 2017).

Segundo Kumar et al.(2018), um estudo in vitro realizado durante 10 dias, para observação do crescimento de *Candida albicans* em trinta discos preparados com polimetilmetacrilato, material usado na fabricação de próteses removíveis, seguidamente foi colocado um condicionador de tecidos, adicionando a esse material pó de Neem. Não foram observadas colónias após o 2, 4 e 7 dias, concluíram in vitro, que as concentrações libertadas dos materiais de revestimento com extractos de plantas, induziram um efeito antifúngico contra *C. albicans* em culturas de agar (Kumar SM, Kumar V A, Natarajan P, 2018).

II.5. Evidências da acção de Neem na Periodontite

A periodontite é caracterizada pela destruição e inflamação dos tecidos do periodonto (Prashant et al., 2007). Inicia-se uma infecção polimicrobiana multifactorial, em que predominam principalmente as bactérias anaeróbias orais, como a *Fusobacterium nucleatum* e a *Porphyromonas gingivalis* (Heyman et al., 2017).

A adesão de bactérias patogénicas nas células da mucosa é uma etapa principal no desenvolvimento da infecção periodontal, seguidamente essas bactérias formam um biofilme, ou então infiltram-se em biofilmes existentes, vão colonizar a cavidade oral sob a forma de placa bacteriana onde poderão causar doença periodontal (Ali, Muhammad, Ayaz, Danfeng, & Hussain, 2017; Chandra et al., 2015). Interferem na imunidade do hospedeiro provocando a destruição dos tecidos do periodonto levando à perda dentária (Bunte, Hensel, & Beikler, 2019; Heyman et al., 2017).

Devido existir um aumento na resistência bacteriana aos antibióticos, surge uma necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, sendo os polifenóis derivados de plantas importantes na prevenção e tratamento da doença periodontal. Presentemente, mais de 8000 mil compostos foram descritos e uma classificação universal ainda não foi estabelecida, devido à complexidade das estruturas químicas (figura 33).

Os polifenóis mais abundantes são os flavonóides, estes compartilham uma estrutura comum, que é constituída por 2 anéis aromáticos A e B e 3 átomos de carbono

que ligam estes anéis, criando um heterociclo oxigenado chamado anel C (Figura 34) (Bunte et al., 2019).

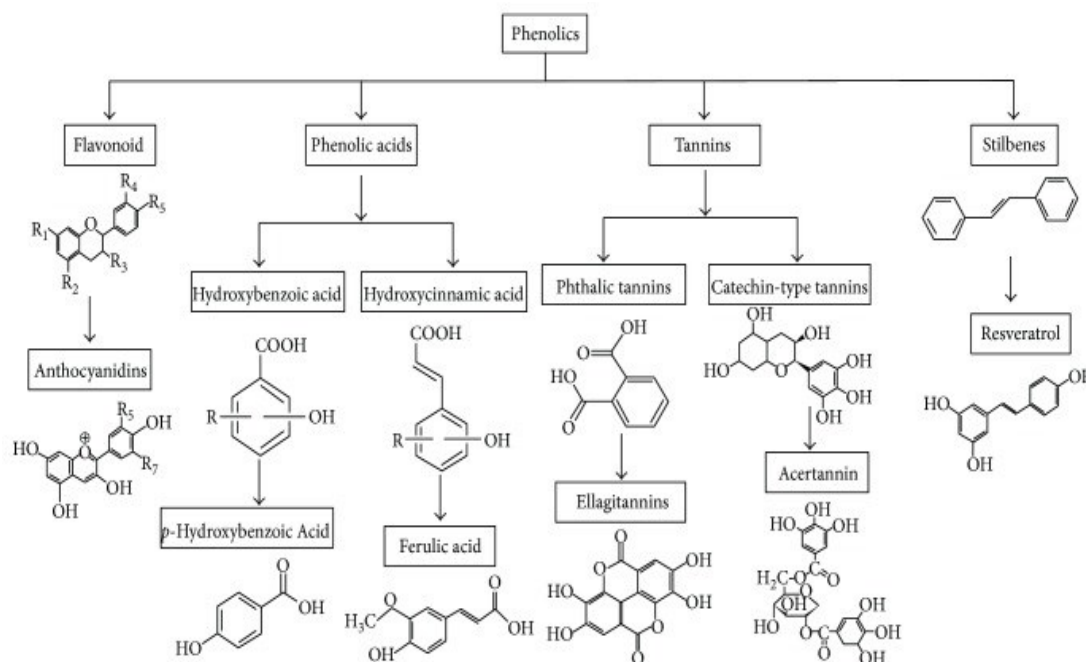


Figura 33 - Estruturas químicas dos polifenóis e uma hipótese de modelo na sua classificação (Adaptado de Ding, Jiang, & Fang, 2018).

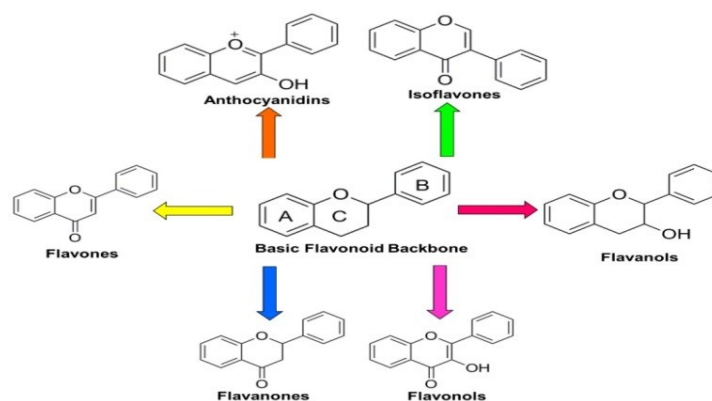


Figura 34- Estrutura química base dos flavonoides (Adaptado de Li, Zhang, & Chen, 2018).

Folhas de Neem são usadas na Índia na prevenção e tratamento da gengivite e periodontite (Prashant et al., 2007). Bochechos orais formulados com plantas poderão ser úteis no controle e prevenção da doença periodontal a longo prazo devido à sua acção antimicrobiana e antiinflamatória (Bunte et al., 2019).

Os extractos de folha de Neem contêm polifenóis como flavonóides e taninos que possuem propriedades antibacterianas, antiinflamatórias, antioxidantes e imunomoduladoras, estes polifenóis aderem às superfícies orais e aumentam o seu efeito

microbiano quando existe a presença de glóbulos vermelhos, plaquetas e enzimas, os polifenóis melhoram a ligação destas células às superfícies bacterianas contribuindo para amplificar o seu poder antioxidante, diminuindo a inflamação dos tecidos do periodonto (Heyman et al., 2017).

Através da figura 35 pode-se observar que o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano que se liga ao receptor toll-like receptor 4 (TLR4) das células do sistema imunitário é uma endotoxina faz parte da membrana exterior das bactérias gram negativas (gram-), contribui para a integridade estrutural da bactéria e protege a membrana bacteriana de ataques químicos, desencadeia a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir das mitocôndrias e da Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato-oxidase (NADPH) nas células imunológicas. As reações redox mediadas por ROS ativam a transcrição do fator nuclear κ B (NF- κ B). A activação do NF- κ B aumenta a expressão da óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e ciclo-oxigenase (COX). Ambas as actividades da ciclo-oxigenase 1 (COX-1) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) medeiam a produção de prostaglandinas (Leyva-lópez, Gutierrez-grijalva, Ambriz-perez, & Heredia, 2016).

Os compostos activos de origem fenólica, podem ser os responsáveis na eliminação de radicais livres gerados pelas bactérias (Garg et al., 2014). A acção antiinflamatória de Neem poderá também ser devido á inibição de prostaglandinas (Prashant et al., 2007).

Os flavonóides podem actuar na produção de eicosanóides, suprimindo a síntese de prostaglandinas e leucotrienos e inibindo a libertação de radicais livres e a produção de óxido nítrico (ON) (Figura 35) (Garg et al., 2014).

Segundo um estudo realizado in vitro, por Heyman et al. (2017), os extractos etanólicos de Neem poderão actuar na patologia periodontal, diminuindo a inflamação devido ao seu poder antioxidante, suprimem espécies reactivas de oxigénio (ROS) e apresentam propriedades antibacterianas contra a bactéria *Porphyromonas gengivalis*.

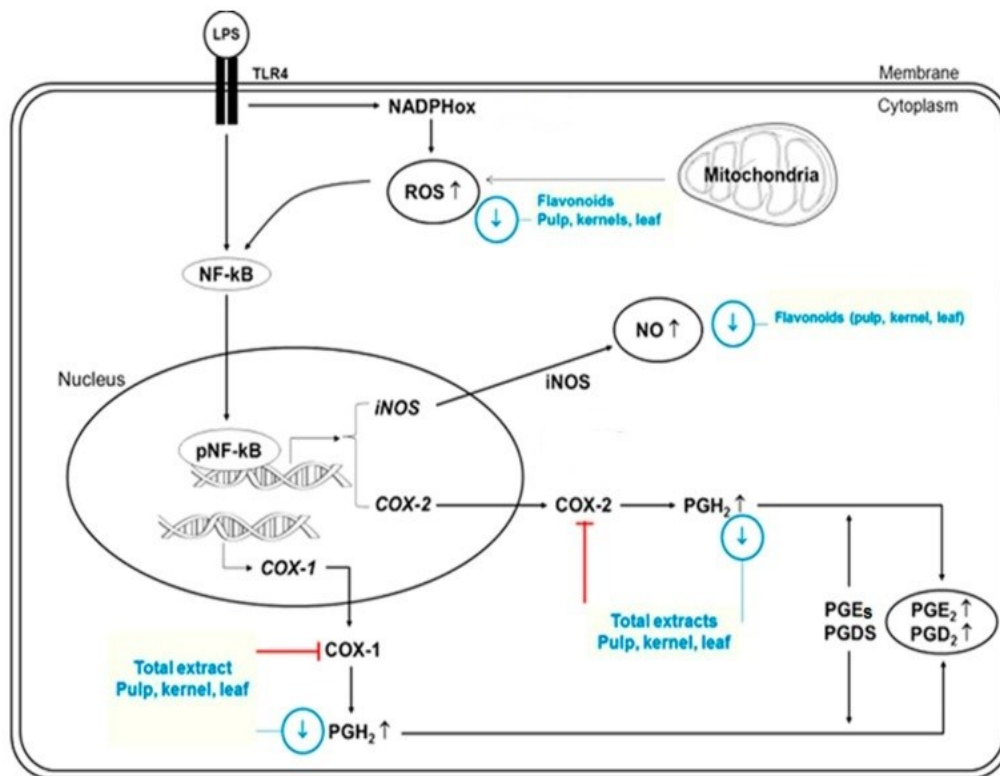


Figura 35- Uma hipótese de mecanismo que mostra o efeito dos flavonóides na inflamação (Adaptado de Leyva-lópez et al., 2016).

II.6. Evidências da acção de Neem na Gengivite

A propriedade de adesão dos microorganismos no início da formação do biofilme é essencial na ligação irreversível às superfícies (Garg et al., 2014; Misuriya et al., 2014). A síntese de glucano insolúvel está relacionada com a aderência bacteriana aos cristais de hidroxiapatita, a produção de polissacarídeos insolúveis pelas glicosiltransferases em *Streptococcus* provoca acumulação da placa bacteriana (Prashant et al., 2007; Wolinsky, Mania, Nachnani, & Ling, 1996). A inibição da actividade das glicosiltransferases também pode ter efeito significativo sobre a formação total de placa (Wolinsky et al., 1996).

Streptococcus mutans expressa 3 glicosiltransferases (Gtfs), cada enzima tem uma acção diferente, mas sobreposta no desenvolvimento da placa bacteriana. As Gtfs (glicosiltransferases) sintetizam glucanos com estrutura química diferente da sacarose. A Gtf B (glicosiltransferase B) sintetiza glucanos insolúveis ricos em ligações alfa-1,6, a Gtf C (glicosiltransferase C) sintetiza uma mistura de glucanos solúveis com insolúveis e a Gtf D (glicosiltransferase D) forma predominantemente glucanos solúveis (Bowen & Koo, 2011).

Na figura 36 é possível observar uma explicação do modelo de produção de polissacáridos em *Streptococcus mutans* em que as glucosiltransferases secretadas pelos *Streptococcus* irão ser depositadas na película de biofilme que adere às superfícies dentárias. Geralmente estas glicosiltransferases são designadas de Gtfs C, as que são adsorvidas nas superfícies bacterianas são as Gtfs B incluindo microorganismos que não sintetizam glicosiltransferases como os *Actinomyces* spp..

As Gtfs B e C fixas nas superfícies vão utilizar a sacarose proveniente da dieta para sintetizar glucanos solúveis e insolúveis, além disso a alfa-amilase salivar também se encontra na película de biofilme, o amido é digerido pela alfa-amilase salivar originando maltose, maltotriose e outros oligossacarídeos, eles podem ser incorporados na molécula de glucano particularmente por Gtf B adsorvido à superfície.

As Gtfs fixadas no esmalte e superfícies microbianas produzem uma matriz insolúvel para a placa bacteriana. Os glucanos solúveis formados pela Gtf D, poderão servir de substrato à Gtf B (glicosiltransferase B) para aumentar a síntese de exopolissacáridos. Após o estabelecimento de uma matriz de biofilme rica em glucanos, a bioflora oral por exemplo, o pH determinará quais bactérias podem sobreviver e dominar dentro da placa sob exposição frequente à sacarose ou a outro hidrato de carbono fermentável (Figura 36) (Bowen & Koo, 2011).

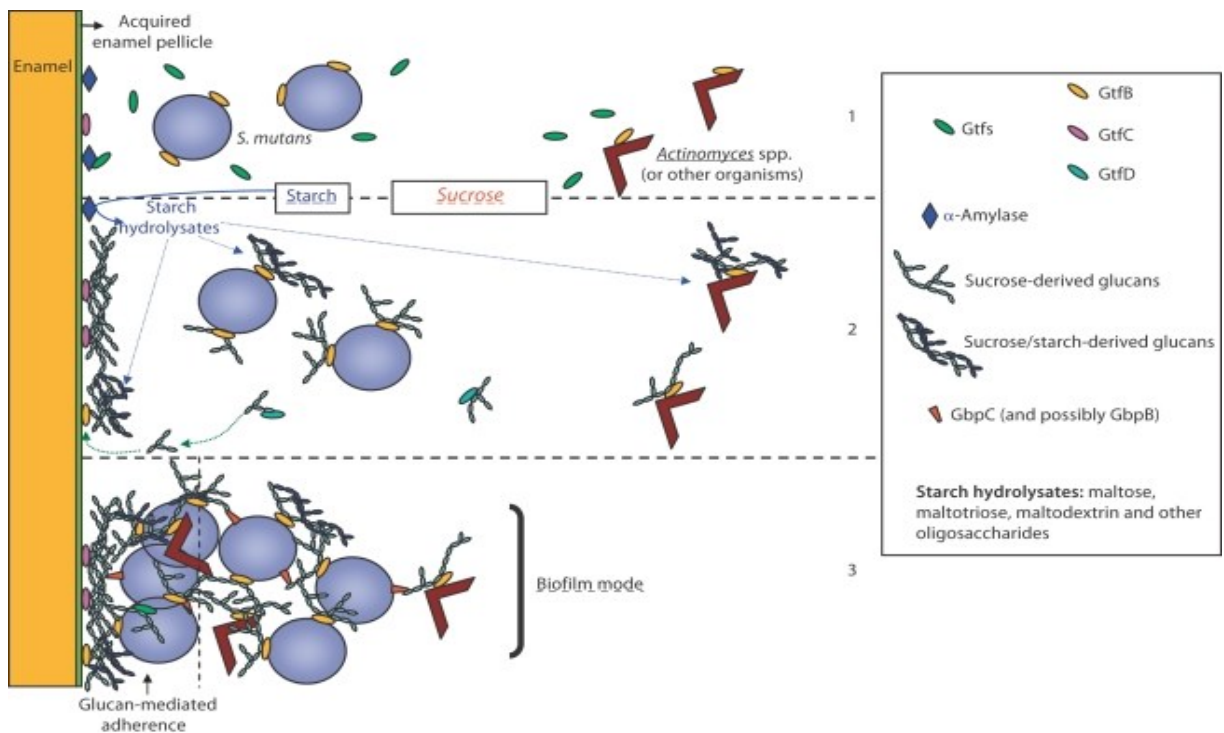


Figura 36- Modelo de produção de polissacáridos insolúveis em *Streptococcus mutans* (Adaptado de Bowen & Koo, 2011).

Os mecanismos exactos de inibição de Gtfs por fitoquímicos, ainda precisam de ser elucidados (Bowen & Koo, 2011). Os principais fitoquímicos que apresentam actividade antimicrobiana directa são os taninos, flavonóides e alguns polipéptidos vegetais (Doddana et al., 2012; Dutta & Kundabala, 2014).

Os polifenóis, principalmente os taninos apresentam uma grande actividade anti-Gtfs (Bowen & Koo, 2011). Os taninos são potentes inibidores da síntese de glucanos apresentam grande afinidade por certas proteínas, resultando na sua precipitação diminuindo dessa maneira a formação de placa bacteriana (Wolinsky et al., 1996).

Neem é constituído por uma grande quantidade de taninos e sais como, fluoretos, enxofre e cloretos. Os taninos provocam um efeito adstringente, formando um revestimento sobre o esmalte dentário, importantes na prevenção da cárie dentária, o enxofre e os cloretos têm propriedades antisépticas que provocam a inibição do crescimento bacteriano. O flúor apresenta propriedades anticariogénicas devido á sua afinidade com os cristais de hidroxiapatite (Chava VR. Manjunath SM. Rajanikanth AV. Sridevi N., 2012; Prashant et al., 2007; R. Sharma, Hebbal, Ankola, Murugaboopathy, & Shetty, 2014).

A bactéria *Streptococcus mutans* é uma das principais bactérias na etiologia da cárie dentária (A. Sharma et al., 2014). Neem é uma planta com um enorme potencial, poderá, reduzir a capacidade das bactérias *Streptococcus* colonizarem as superfícies dos dentes (Prashant et al., 2007).

Segundo Prashant et al.,(2007) extratos de Neem podem ser usados em bochechos e géis nos pacientes que desejam evitar álcool, conservantes e corantes artificiais, como alternativa à clorexidina pois apresentam uma actividade relativamente eficaz na inibição do crescimento de *S. mutans* in vitro. Nestes ensaios in vitro de realizados em placas de agar, o extracto aquoso de Neem, reduziu a capacidade de alguns *Streptococcus* colonizarem a superfície dentária, inibiu o crescimento de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* (Prashant et al., 2007).

Kankariya et al.,(2016), comprovaram a eficácia de azadiractina, ao avaliarem diferentes concentrações deste fitoquímico em *Streptococcus mutans*, comparando o efeito com a clorexidina. Este estudo foi realizado em 30 crianças com idades entre a

faixa etária dos 8 aos 11 anos, em que existiu uma colheita de colónias de bactérias a nível oral e posteriormente foram colocadas em placas de agar em condições aeróbicas durante 48 horas a 37 °C (graus celsius), após a incubação, houve uma identificação das colónias com características morfológicas de *Streptococcus mutans*. Essas colónias foram colocadas em contacto com azadiractina solúvel em água em cinco concentrações diferentes, de 10, 20, 30, 40 e 50% e com clorhexidina de 0,2%.

O ensaio *in vitro* de Kankariya et al.(2016), revelou que em 40% de azadiractina solúvel em água, a zona de inibição bacteriana foi semelhante com a zona de inibição da clorexidina de 0,2%. A molécula de clorexidina tem a capacidade de se ligar aos tecidos da cavidade oral, a sua acção antibacteriana é devido a ser permeável nas paredes celulares seguidamente provoca coagulação das macromoléculas citoplasmáticas. O autor sugeriu que azadiractina solúvel em água pode ser usada para a prevenção de cáries dentárias, devido a apresentar uma acção antibacteriana em organismos aeróbios (kankariya et al., 2016).

No ensaio *in vitro* realizado por Chava et al.,(2012), o objectivo foi verificar o efeito de várias concentrações de extractos de Neem em *Streptococcus mitis*, *salivarius*, *sanguis* e *mutans*. Obtiveram-se extractos de Neem de 5%, 10% e 50%, em que os extractos de Neem a 50% apresentaram actividade bactericida, onde houve uma inibição total contra *Streptococcus mutans*, esta actividade bactericida foi devido à inibição da síntese da parede celular (Chava VR. Manjunath SM. Rajanikanth AV. Sridevi N., 2012).

O desenvolvimento de agentes químicos que inibem a formação de placa bacteriana tem sido relevante em Medicina Dentária (Wolinsky et al., 1996). A remoção de placa bacteriana através de meios mecânicos é um método eficiente no controlo da inflamação gengival, mas a maioria dos pacientes não realiza esse controlo mecânico adequadamente, logo os bochechos podem ser uma boa solução para atingir o nível de higiene oral necessário (Dhingra & Vandana, 2017).

Um ensaio clínico realizado em 105 crianças numa faixa etária dos 12 aos 15 anos, em que foram examinados os índices de placa bacteriana e índices gengivais em 3 grupos diferentes, fizeram bochechos 2 vezes ao dia com extracto de Neem, bochechos 2 vezes ao dia com extracto de manga e bochechos 2 vezes ao dia com clorexidina, durante 21 dias, chegaram à conclusão que todos os três tipos de bochecho orais foram

eficazes como agentes antigengivite e antiplaca, Neem e clorexidina apresentaram praticamente a mesma eficácia na redução de placa bacteriana (R. Sharma et al., 2014).

Chatterjee et al. (2011), observaram a eficácia de Neem na redução de índices de gengivite provocados por placa bacteriana em 45 indivíduos através de bochechos orais feitos duas vezes ao dia durante 21 dias, chegando à conclusão que Neem foi igualmente eficaz à clorexidina (Chatterjee et al., 2011).

No ensaio clínico realizado durante 7 dias em 54 pacientes com gengivite crónica entre os 17 e 65 anos de idade, os pacientes efectuaram bochechos orais durante 30s 2x ao dia a seguir ao pequeno almoço e ao almoço em que o objectivo foi verificar a eficácia dos extractos de Neem a 25%, comparando com gluconato de clorexidina 0,12%, foram medidos os índices de placa bacteriana, índice gengival e índice de sangramento e foi feita a contagem de bactérias cariogénicas *Streptococcus mutans* em saliva não estimulada antes e após o tratamento, segundo Botelho et al. (2008), obtiveram resultados estatisticamente semelhantes com extractos de Neem a 25% e 0,12% de gluconato de clorexidina (Botelho et al., 2008).

Em relação aos efeitos adversos, a clorexidina apresenta alguns efeitos colaterais durante o seu uso a longo prazo na periodontite e gengivite, como, manchar os dentes de cor castanha, sabor desagradável, boca seca, distúrbios no sabor, sensação de queimação, alterações do paladar e coloração da língua em castanho (Bhat et al., 2014; Prashant et al., 2007; R. Sharma et al., 2014).

Algumas plantas medicinais têm efeitos colaterais mínimos em comparação com compostos químicos. Bochechos sintéticos e géis como clorexidina apresentam o risco de ingestão, daí uma alternativa natural, pode ser complementada, devido aos bochechos com extractos naturais de plantas serem seguros e viáveis (Prashant et al., 2007).

II.7. Evidências da acção de Neem no Vírus Herpes Simples-1

O vírus do herpes apresenta o seu DNA rodeado por uma cápside e um envelope, pertencendo ao grupo das doenças viróticas. O contacto físico com a pessoa infectada é a forma principal de inoculação do HSV (vírus herpes simples) embora a disseminação da infecção também surja por gotículas presentes no ar, por contacto com objectos inanimados e por meio de água contaminada, o período de incubação após a exposição

vai de alguns dias até duas semanas. As infecções causadas pelo HSV (vírus herpes simples) surgem em duas formas, uma de natureza localizada ou secundária e a outra sob a forma primária ou sistêmica. A infecção na forma primária designada de gengivostomatite herpética primária é caracterizada clinicamente por ardência ou dor e prurido no local das lesões, chamados de sintomas prodrômicos, as várias úlceras pequenas que aparecem dão origem a vesículas, estas lesões são mais comuns no palato duro, gengiva e nos lábios, sendo o número de recidivas variável desde uma por ano até uma por mês (Figura 37) (Reguezi et al., 2008).



Figura 37- Manifestações clínicas do HSV (Consolaro & Consolaro, 2009)

A infecção primária inicia-se com a entrada do HSV nas células do hospedeiro, surge interação dos receptores da superfície celular da célula do hospedeiro, as proteoglicanas, a sulfato de heparano com as glicoproteínas do envelope viral, seguidamente são activados genes específicos durante a fase lítica da infecção (Figura 38) (Reguezi et al., 2008; Vaibhav Tiwari, Nissar A. Darmani1, Beatrice Y. J. T. Yue and Deepak Shukla, 2009).

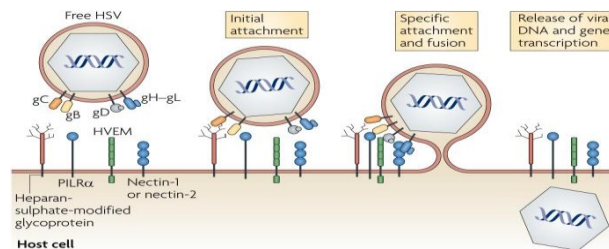


Figura 38- Mecanismo de entrada do vírus HSV na célula hospedeira (Adaptado de Šedý, Spear, & Ware, 2008).

Após a resolução da infecção primária, o vírus migra ao longo da bainha periaxónica do nervo trigémio para o gânglio trigeminal onde permanece num estado latente, inactivo (Tiwari et al., 2009). A recidiva da forma secundária é comum, devido ao vírus permanecer no tecido ganglionar no estado latente (Reguezi et al., 2008). A reactivação pode acontecer devido a stress, frio, imunossupressão causando uma infecção secundária, o vírus reactivado, desloca-se pelo nervo trigémio, até ao local da superfície epitelial onde inicialmente ocorre a infecção onde ocorre a replicação do vírus.

O vírus herpes HSV-1 causa problemas de saúde, que se podem agravar, surge esporadicamente do estado latente provocando lesões na pele, mucosa e córnea, entre outras localizações. As infecções na córnea derivadas do HSV-1 podem originar deficiência visual ou cegueira, devido ao desenvolvimento de ceratite estromal herpética (Figura 39) (Tiwari et al., 2009).



Figura 39- Infecção ocular do HSV-1, provocando conjutivite (Adaptado de Uchio, Takeuchi, Itoh, Matsuura, & Ohno, 2000).

Existem outras patologias provocadas pela infecção do HSV como meningite, renite e encefalite (Tiwari et al., 2009). O HSV tem sido tratado com sucesso utilizando o aciclovir desde 1970, mas o uso contínuo a longo prazo provocou resistências (Bharitkar et al., 2014).

O ensaio *in vitro* de Tiwari et al. (2009), revelou que o extracto aquoso da casca de Neem, com as quantidades entre 100 e 1000 microgramas/mililitro, inibiu o vírus HSV-1 nas células de ovário de hamster que expressam receptores da glicoproteína D (gD), em células Vero (células epiteliais obtidas do rim de macaco), Hela (células obtidas do cancro cervical humano) e fibroblastos da córnea humana. A actividade inibidora foi observada quando o extracto aquoso foi pré-incubado com o HSV-1 nesse procedimento e posteriormente usadas para infectar as células, Neem bloqueou a etapa inicial de ligação do vírus à célula alvo.

Tiwari et al. (2009) comprovaram também a eficácia do extracto aquoso da casca de Neem, bloqueando a propagação viral ao inibir a fusão das células infectadas pelo vírus HSV-1. A fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática da célula alvo requer glicoproteínas. Os autores chegaram à conclusão que o extracto de Neem interage com as glicoproteínas do envelope do vírus HSV-1, inactivando-as, impedindo assim a ligação e o processo de fusão.

Um outro estudo *in vitro* realizado por Bharitkar et al. (2014), revelou que um glicolípido isolado das folhas de Neem, o sulfonoquinossyldiacylglycerido apresentou

actividade antivirótica até 24 horas em células Vero infectadas com os vírus HSV-1 (Bharitkar et al., 2014).

II.8. Toxicidade de NEEM

A medição da toxicidade de uma molécula natural é fundamental para seguidamente poder ser utilizada em farmacologia como medicamento, estudos in vitro e testes clínicos demonstram que os extractos de Neem com os seus princípios activos são seguros, dentro dos valores utilizados nesses modelos de estudo (Alzohairy, 2016). Existem alguns relatos em humanos, casos raros de intoxicação que provoca algumas alergias nos pacientes mas isso acontece devido à toma ou uso exagerado de Neem, uma vez que é habitual nos países asiáticos utilizarem o óleo de Neem em vários tratamentos (Prashant et al., 2007; Romita et al., 2019; S. Kumar & Kumar, 2014; Sarre, Mancel, Drouet, & Avenel-Audran, 2017).

III. Conclusões

Com esta revisão bibliográfica pode-se concluir que:

Segundo estudos realizados em carcinomas originários na cavidade oral, os fitoquímicos de Neem (nimbolida e azadiractina) demonstraram que a morte das células tumorais está dependente de caspases (proteases). Neem também activa a apoptose independente de caspases, mas essa situação surge em carcinomas não originários na cavidade oral. O mecanismo está relacionado com o factor indutor da apoptose (FIA), esta proteína existe no citosol e migra para o núcleo das células tumorais, provoca apoptose sem activar caspases.

Geralmente 50% dos doentes com cancro oral apresentam a P53 com mutações tornando-a inactiva. A P53 no estado selvagem, activa diversas proteínas que suprimem o cancro, existem evidências científicas que a molécula azadiractina pode ser importante no tratamento dos carcinomas em que P53 está alterada, inactiva. Azadiractina não depende da P53 para provocar apoptose das células tumorais, inibe factores de sinalização oncogénica (NF-KB) e provoca apoptose nos tumores.

Um dos mecanismos que provocou apoptose nas células humanas de osteossarcoma, foi devido à molécula nimbolida provocar stress no retículo endoplasmático dessas células, existiu uma perturbação na homeostase de Ca²⁺, provocando a sua saída para o citosol, activando as proteínas m-calpaínas e estas activaram caspases. O mecanismo de activação das proteínas m-calpaínas só existiu nesta patologia.

Presentemente existe pouca investigação sobre a farmacocinética e biodisponibilidade destes fitoquímicos em relação aos efeitos no cancro, estudos futuros devem incidir nesta área para encontrar a quantidade de dose segura para posteriormente dar início a ensaios clínicos em humanos.

Moléculas antimicrobianas que fazem parte dos extractos de Neem podem ser uma fonte de novas substâncias em tratamentos endodônticos. A sua potente actividade antimicrobiana é devido à acção sinérgica das várias moléculas e péptidos constituintes desse extracto que vão permitir aumentar a capacidade de destruição das bactérias, fungos e vírus.

Os extratos das folhas de Neem têm demonstrado *in vitro*, através da inibição de biofilmes, diminuir a adesão de microorganismos patogénicos nas superfícies dentárias, essa acção poderá ser devido à presença e concentração de polifenóis, estes

fitoquímicos podem ser importantes no controlo da placa bacteriana, principalmente em crianças.

A resistência de bactérias aos antibióticos usados em Medicina Dentária, poderão abrir uma porta ao estudo destes fitoquímicos, os extractos de Neem são uma fonte muito rica de novas moléculas, que podem ser combinadas com moléculas sintéticas e contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos.

IV. Referências Bibliográficas

- Aarthy, T., Mulani, F. A., Pandreka, A., Kumar, A., Nandikol, S. S., Haldar, S., & Thulasiram, H. V. (2018). Tracing the biosynthetic origin of limonoids and their functional groups through stable isotope labeling and inhibition in neem tree (*Azadirachta indica*) cell suspension, 1–21.
- Abdel Moneim, A. E., Othman, M. S., & Aref, A. M. (2014). *Azadirachta indica* attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/647131>
- Ahmad, M. F., Ansari, M. O., Jameel, S., Wani, A. L., Parveen, N., Siddique, H. R., & Shadab, G. G. H. A. (2018). Protective role of nimbolide against chemotherapeutic drug hydroxyurea induced genetic and oxidative damage in an animal model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 60, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.04.006>
- Aintzane Apraiz, M. D. B. and A. A. (2011). Cell-Centric View of Apoptosis and Apoptotic Cell Death-Inducing Antitumoral Strategies, 1042–1080. <https://doi.org/10.3390/cancers3011042>
- Al Saiqali, M., Tangutur, A. D., Banoth, C., & Bhukya, B. (2018). Antimicrobial and anticancer potential of low molecular weight polypeptides extracted and characterized from leaves of *Azadirachta indica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114(2017), 906–921. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.169>
- Alam, M., Kashyap, T., Mishra, P., & Panda, A. K. (2018). Role and regulation of proapoptotic Bax in oral squamous cell carcinoma and drug resistance, (September 2017), 1–13. <https://doi.org/10.1002/hed.25471>
- Ali, Z., Muhammad, B., Ayaz, H., Danfeng, A., & Hussain, H. A. (2017). Ac ce p d u s c r t. *Archives of Oral Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.05.011>
- Almadi, E. M., & Almohaimede, A. A. (2018). Natural products in endodontics. *Saudi Medical Journal*, 39(2), 124–130. <https://doi.org/10.15537/smj.2018.2.21038>
- Alzohairy, M. A. (2016). Therapeutics role of *azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7382506>
- Aparecida, S., & Mossini, G. C. K. (2005). A árvore Nim (*Azadirachta indica* A . Juss

-): M ú ltiplos Usos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 24(1), 139–148.
- Babaji, P., Jagtap, K., Lau, H., Bansal, N., & Thajuraj, S. (2016). Comparative evaluation of antimicrobial effect of herbal root canal irrigants (*Morinda citrifolia* , *Azadirachta indica* , *Aloe vera*) with sodium hypochlorite : An in vitro study, 196–199. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.183104>
- Bahar, E., Kim, H., & Yoon, H. (2016). ER Stress-Mediated Signaling : Action Potential and Ca^{2+} as Key Players, 6, 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms17091558>
- Bahgat, D. M. R., Shahin, R. M. H., Makar, N. N., Aziz, A. O. A., & Hunter, S. S. (2016). Reversion-Inducing-Cysteine-Rich Protein With Kazal Motifs (RECK) Gene Single Nucleotide Polymorphism With Hepatocellular Carcinoma: A Case-Control Study. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30(1), 36–40. <https://doi.org/10.1002/jcla.21806>
- Banerjee, S., Ghosh, T., Barik, S., Das, A., Ghosh, S., Bhuniya, A., ... Baral, R. (2014). Neem leaf glycoprotein prophylaxis transduces immune dependent stop signal for tumor angiogenic switch within tumor microenvironment. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110040>
- Barua, D. R., Basavanna, J. M., & Varghese, R. K. (2017). Efficacy of neem extract and three antimicrobial agents incorporated into tissue conditioner in inhibiting the growth of *C. Albicans* and *S. Mutans*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(5), ZC97–ZC101. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23784.9950>
- Bhardwaj, A., Srivastava, N., Rana, V., Adlakha, V. K., & Asthana, A. K. (2018). How efficacious are Neem , Tulsi , Guduchi extracts and chlorhexidine as intracanal disinfectants ? A comparative ex vivo study. <https://doi.org/10.4103/ayu.AYU>
- Bharitkar, Y. P., Bathini, S., Ojha, D., Ghosh, S., Mukherjee, H., Kuotsu, K., ... Mondal, N. B. (2014). Antibacterial and antiviral evaluation of sulfonoquinovosyldiacylglyceride: A glycolipid isolated from *Azadirachta indica* leaves. *Letters in Applied Microbiology*, 58(2), 184–189. <https://doi.org/10.1111/lam.12174>
- Bhat, N., Mitra, R., Oza, S., Mantu, V. K., Bishnoi, S., Gohil, M., & Gupta, R. (2014). The antiplaque effect of herbal mouthwash in comparison to chlorhexidine in human gingival disease: A randomized placebo controlled clinical trial. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11(2), 129–137. <https://doi.org/10.1515/jcim-2014-0002>

- Bodduluru, L. N., Kasala, E. R., Thota, N., Barua, C. C., & Sistla, R. (2014). Chemopreventive and therapeutic effects of nimbolide in cancer: The underlying mechanisms. *Toxicology in Vitro*, 28(5), 1026–1035. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.04.011>
- Borzini, L., Condò, R., De Dominicis, P., Casaglia, A., & Cerroni, L. (2016). Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against. *The Open Dentistry Journal*, 10(1), 692–703. <https://doi.org/10.2174/1874210601610010692>
- Botelho, M. A., Araujo, R., Martins, J. G., Carvalho, O., Paz, M. C., Azenha, C., ... Ruela, F. I. (2008). Efficacy of a mouthrinse based on leaves of the neem tree (*Azadirachta indica*) in the treatment of patients with chronic gingivitis: A double-blind, randomized, controlled trial, 2(11), 341–346.
- Bowen, W. H., & Koo, H. (2011). Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms, 69–86. <https://doi.org/10.1159/000324598>
- Breakey, R. W. F., Crowley, T. P., Anderson, I. B., Milner, R. H., & Ragbir, M. (2017). The surgical management of head and neck sarcoma: The Newcastle experience *. *British Journal of Plastic Surgery*, 70(1), 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2016.09.026>
- Bunte, K., Hensel, A., & Beikler, T. (2019). Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: A systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. *Fitoterapia*, 132(November 2018), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.11.012>
- Cavalcanti, K. M. M. (1997). ORIGINAL ARTICLE Shunsuke Mori Anahid Jewett Kaoru Murakami-Mori Marta Cavalcanti Benjamin Bonavida, 282–290.
- Chandra, P., Kumar, V. H., Reddy, S. J., & Kiran, D. R. (2015). biofilm forming capacity of *Enterococcus faecalis* on Gutta-percha points treated with four disinfectants using confocal scanning laser microscope: An in vitro study, 12(4), 331–336.
- chatterjee 2011 To evaluate the antigingivitis and antipalque effect of an *Azadirachta indica*. (n.d.).
- Chava VR. Manjunath SM. Rajanikanth AV. Sridevi N. (2012). The efficacy of neem extract on four microorganisms responsible for causing dental caries. *Journal of Contemporary Dental Practice [Electronic Resource]*, 13(6), 769–772.
- Chien, S. Y., Hsu, C. H., Lin, C. C., Chuang, Y. C., Lo, Y. S., Hsi, Y. T., ... Chen, M.

- K. (2017). Nimbolide induces apoptosis in human nasopharyngeal cancer cells. *Environmental Toxicology*, 32(8), 2085–2092. <https://doi.org/10.1002/tox.22423>
- Chitta, K. S., Khan, A. N. H., Ersing, N., Swaika, A., Masood, A., Paulus, A., ... Chanan-Khan, A. A. (2014). Neem leaf extract induces cell death by apoptosis and autophagy in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia and Lymphoma*, 55(3), 652–661. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.807927>
- Dasgupta, T., Banerjee, S., Yadava, P. K., & Rao, A. R. (2004). Chemopreventive potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1), 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.12.004>
- de Santana Souza, M. T., Almeida, J. R. G. da S., de Souza Araujo, A. A., Duarte, M. C., Gelain, D. P., Moreira, J. C. F., ... Quintans-Júnior, L. J. (2014). Structure-activity relationship of terpenes with anti-inflammatory profile - A systematic review. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 115(3), 244–256. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12221>
- del Carmen Lafita-Navarro, M., & Conacci-Sorrell, M. (2019). Identification of calpain-activated protein functions. *Methods in Molecular Biology*, 1915, 149–160. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8988-1_12
- Dhingra, K., & Vandana, K. L. (2017). Effectiveness of *Azadirachta indica* (neem) mouthrinse in plaque and gingivitis control: a systematic review. *International Journal of Dental Hygiene*, 15(1), 4–15. <https://doi.org/10.1111/idh.12191>
- Ding, S., Jiang, H., & Fang, J. (2018). Regulation of immune function by polyphenols. *Journal of Immunology Research*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1264074>
- Dionne, K. R., Warnakulasuriya, S., Zain, R. B., & Cheong, S. C. (2014). Potentially malignant disorders of the oral cavity : Current practice and future directions in the clinic and laboratory, 1–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.28754>
- doddana 2012 ORIGINAL RESEARCH. (n.d.).
- Dutta, A., & Kundabala, M. (2014). Comparative anti-microbial efficacy of *Azadirachta indica* irrigant with standard endodontic irrigants: A preliminary study. *Journal of Conservative Dentistry*, 17(2), 133. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.128047>
- Elumalai, P., & Arunakaran, J. (2014). Review on Molecular and Chemopreventive, 12(4), 156–164.
- Fernandes, S. R., Barreiros, L., Oliveira, R. F., Cruz, A., Prudêncio, C., Oliveira, A. I.,

- ... Morgado, J. (2019). Chemistry, bioactivities, extraction and analysis of azadirachtin: State-of-the-art. *Fitoterapia*, 134(January), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.02.006>
- Ferreira, S., Brennan, P. A., Gomez, R. S., Fregnani, R., Santos-silva, A. R., Martins, M. D., & De, G. (2018). Molecular basis of oral squamous cell carcinoma in young patients: is it any different from older patients? <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Floriano, M., Santos, L., Coutinho, T. M., Barrocas, D., Rodrigues, J. T., Odontologia, F. De, & Janeiro, R. De. (2016). Infecção secundária e persistente e sua relação com o fracasso do tratamento endodôntico, 212–217.
- Garg, P., Maccune, E., Malik, V., Singh, U., Sinha, D., & Tyagi, S. (2014). Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, Morinda citrifolia, Azadirachta indica, triphala, green tea polyphenols and 5.25% sodium hypochlorite against Enterococcus fecalis biofilm. *Saudi Endodontic Journal*, 4(3), 122. <https://doi.org/10.4103/1658-5984.138141>
- Ghonmode, W. N., Balsaraf, O. D., Tambe, V. H., Saujanya, K. P., Patil, A. K., & Kakde, D. D. (2013). Antimicrobial efficiency of herbal alternatives & 3% sodium...Ghonmode WN et al Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against E. feacalis – An in vitro study. *Journal of International Oral Health*. Nov-Dec, 5(6), 61–66.
- Giampazolias, E., & Tait, S. W. G. (2016). Mitochondria and the hallmarks of cancer, 283, 803–814. <https://doi.org/10.1111/febs.13603>
- Golpich, M., Amini, E., Hemmati, F., Mohamed, N., Rahmani, B., Mohamed, Z., ... Ahmadiani, A. (2015). Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) signaling: Implications for Parkinson's disease. *Pharmacological Research*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.03.010>
- González-Flores, D., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2014). TNF α -induced apoptosis in human myeloid cell lines HL-60 and K562 is dependent of intracellular ROS generation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 390(1–2), 281–287. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-1979-5>
- Gordon, E., Ravicz, J., Liu, S., Chawla, S., & Hall, F. (2018). Cell cycle checkpoint control: The cyclin G1/Mdm2/p53 axis emerges as a strategic target for broad- spectrum cancer gene therapy - A review of molecular mechanisms for oncologists. *Molecular and Clinical Oncology*, 115–134. <https://doi.org/10.3892/mco.2018.1657>

- Goswami, K. K., Sarkar, M., Ghosh, S., Saha, A., Ghosh, T., Guha, I., ... Baral, R. (2016). Neem leaf glycoprotein regulates function of tumor associated M2 macrophages in hypoxic tumor core: Critical role of IL-10/STAT3 signaling. *Molecular Immunology*, *80*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.10.008>
- Guimarães, A. G., Serafini, M. R., & Quintans-Júnior, L. J. (2014). Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *24*(3), 243–265. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.870154>
- Gupta, P. (2018). Suppression of IKK , but not activation of p53 is responsible for cell death mediated by naturally occurring oxidized tetranortriterpenoid, (August 2017), 1–14. <https://doi.org/10.1002/jcb.26879>
- Gutiérrez, J., A Droppelmann, C., Salsoso, R., Westermeier, F., Toledo, F., Salomon, C., ... Sobrevia, L. (2015). A hypothesis for the role of RECK in angiogenesis. *Current Vascular Pharmacology*, *14*(1), 106–115. <https://doi.org/10.2174/1570161113666151014130746>
- Haapasalo, M., Shen, Y., Wang, Z., & Gao, Y. (2014). Irrigation in endodontics. *British Dental Journal*, *216*(6), 299–303. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.204>
- Haldar, S., Mulani, F. A., Aarthy, T., Dandekar, D. S., & Thulasiram, H. V. (2014). Expedient preparative isolation and tandem mass spectrometric characterization of C-seco triterpenoids from Neem oil. *Journal of Chromatography A*, *1366*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.006>
- Hao, F., Kumar, S., Yadav, N., & Chandra, D. (2014). Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, *1846*(1), 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.07.002>
- He, Z., Jiang, C., Zhang, J., Yin, Z., Yin, Z., Zhu, Y., & Fu, J. (2016). Neem tree (*Azadirachta indica*) extract specifically suppresses the growth of tumors in H22-bearing Kunming mice. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *71*(7–8), 201–208. <https://doi.org/10.1515/znc-2014-4210>
- Heyman, L., Hourri-Haddad, Y., Heyman, S. N., Ginsburg, I., Gleitman, Y., & Feuerstein, O. (2017). Combined antioxidant effects of Neem extract, bacteria, red blood cells and Lysozyme: possible relation to periodontal disease. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*(1), 399. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1900-3>

- Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
- Jabra-rizk, M. A., Kong, E. F., Tsui, C., Nguyen, M. H., Clancy, C. J., Fidel, P. L., & Noverr, M. (2016). *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe, 84(10), 2724–2739. <https://doi.org/10.1128/IAI.00469-16>. Editor
- kankariya 2016 The effect of different concentrations of water soluble azadirachtin. (n.d.).
- Kishore T, K. K., Ganugula, R., Gade, D. R., Reddy, G. B., & Nagini, S. (2016). Gedunin abrogates aldose reductase, PI3K/Akt/mToR, and NF- κ B signaling pathways to inhibit angiogenesis in a hamster model of oral carcinogenesis. *Tumor Biology*, 37(2), 2083–2093. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4003-0>
- Kowshik, J., Mishra, R., Sophia, J., Rautray, S., Anbarasu, K., Reddy, G. D., ... Nagini, S. (2017). Nimbolide upregulates RECK by targeting miR-21 and HIF-1 α in cell lines and in a hamster oral carcinogenesis model. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01960-5>
- Kumar, G. H., Vidya Priyadarsini, R., Vinothini, G., Vidjaya Letchoumy, P., & Nagini, S. (2010). The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit cell proliferation and induce apoptosis in an animal model of oral oncogenesis. *Investigational New Drugs*, 28(4), 392–401. <https://doi.org/10.1007/s10637-009-9263-3>
- Kumar, S., & Kumar, N. (2014). Neem oil poisoning as a cause of toxic encephalopathy in an infant. *Indian Journal of Pediatrics*, 81(9), 955. <https://doi.org/10.1007/s12098-013-1327-x>
- Kumar SM, Kumar V A, Natarajan P, S. G. (2018). Antifungal efficacy and the mechanical properties of soft liners against *Candida albicans* after the incorporation of garlic and neem: An In vitro study. Department of Prosthodontics, Sri Ramachandra University, Room No. 8, Chennai - 600 102, Tamil Nadu India: . J Int Soc Prevent Communit Dent [serial online] 2018 [cited 2018 Oct 22];8:212-7. Available. https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_343_17
- kuruvilla 2015 A comparative evaluation of smear layer removal by using edta. (n.d.).
- Lakshmi, T., Krishnan, V., Rajendran, R., & Madhusudhanan, N. (2015). *Azadirachta indica*: A herbal panacea in dentistry - An update. *Pharmacognosy Reviews*, 9(17), 41. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.156337>
- Leyva-lópez, N., Gutierrez-grijalva, E. P., Ambriz-perez, D. L., & Heredia, J. B. (2016).

- Flavonoids as Cytokine Modulators : A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. <https://doi.org/10.3390/ijms17060921>
- Li, Y., Zhang, T., & Chen, G. Y. (2018). Flavonoids and Colorectal Cancer Prevention, 1–22. <https://doi.org/10.3390/antiox7120187>
- Liou, G.-Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Liu, J. F., Hou, C. H., Lin, F. L., Tsao, Y. T., & Hou, S. M. (2015). Nimbolide induces ROS-regulated apoptosis and inhibits cell migration in osteosarcoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23405–23424. <https://doi.org/10.3390/ijms161023405>
- Mahmoud, D.A;Hassanein, N.M.;Youssef, K.A.; Abou Zeid, M. A. (2011). ANTIFUNGAL ACTIVITY OF DIFFERENT NEEM LEAF EXTRACTS AND THE NIMONOL AGAINST SOME, 1007–1016.
- Mahmoud, N., Saeed, M. E. M., Sugimoto, Y., Klauck, S. M., Greten, H. J., & Efferth, T. (2018). Cytotoxicity of nimbolide towards multidrug-resistant tumor cells and hypersensitivity via cellular metabolic modulation. *Oncotarget*, 9(87), 35762–35779. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26299>
- Majid, M. Z., Zaini, Z. M., & Razak, F. A. (2014). Apoptosis-Inducing Effect of Three Medicinal Plants on Oral Cancer Cells KB and ORL-48, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/125353>
- Makary, R. F., & Gopinath, A. (2017). Margin Analysis Sarcoma of the Head and Neck Head and neck Sarcoma Histologic types Resection margin Prognosis. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of NA*, 29(3), 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2017.04.002>
- Manikandan, P., Letchoumy, P. V., Gopalakrishnan, M., & Nagini, S. (2008). Evaluation of Azadirachta indica leaf fractions for in vitro antioxidant potential and in vivo modulation of biomarkers of chemoprevention in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2332–2343. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.013>
- Manikandan, Palrasu, Ramalingam, S. M., Vinothini, G., Ramamurthi, V. P., Singh, I. P., Anandan, R., ... Nagini, S. (2012). Investigation of the chemopreventive potential of neem leaf subfractions in the hamster buccal pouch model and phytochemical characterization. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.08.008>

- Misuriya, A., Bhardwaj, A., Bhardwaj, A., Aggrawal, S., Kumar, P. P. awa., & Gajjarepu, S. (2014). A comparative antimicrobial analysis of various root canal irrigating solutions on endodontic pathogens: an in vitro study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, *15*(2), 153–160. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1506>
- Morse, E. M., Brahme, N. N., & Calderwood, D. A. (2014). Integrin Cytoplasmic Tail Interactions.
- Mustafa, M. (2016). Antibacterial Efficacy of Neem (*Azadirachta indica*) Extract against *Enterococcus faecalis* : An in vitro Study, *17*(October), 791–794.
- Nagini, S. (2014). *Neem Limonoids as Anticancer Agents: Modulation of Cancer Hallmarks and Oncogenic Signaling*. *Enzymes* (1st ed., Vol. 36). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802215-3.00007-0>
- Neill, J. P. O., Bilsky, M. H., & Kraus, D. (2013). Head and Neck Sarcomas Epidemiology , Pathology , and Management. *Neurosurgery Clinics of NA*, *24*(1), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2012.08.010>
- Ozsezer, E., & Onuk, E. E. (2017). Pyrosequencing Analysis of Cryogenically Ground Samples from Primary and Secondary / Persistent Endodontic Infections, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.03.019>
- Pandreka, A., Dandekar, D. S., Haldar, S., Uttara, V., Vijayshree, S. G., Mulani, F. A., ... Thulasiram, H. V. (2015). Triterpenoid profiling and functional characterization of the initial genes involved in isoprenoid biosynthesis in neem (*Azadirachta indica*). *BMC Plant Biology*, *15*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0593-3>
- Patel, S. M., Venkata, K. C. N., Bhattacharyya, P., Sethi, G., & Bishayee, A. (2016). Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.03.002>
- Paul, R., Prasad, M., & Sah, N. K. (2011). Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (neem): A mini review. *Cancer Biology and Therapy*, *12*(6), 467–476. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.6.16850>
- Paz, D. De, Kao, H., Huang, Y., & Chang, K. (2017). Prognostic Stratification of Patients With Advanced Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0624-3>
- Pintor, A. V. B., dos Santos, M. R. M., Ferreira, D. M., Barcelos, R., Primo, L. G., &

- Maia, L. C. (2016). Does Smear Layer Removal Influence Root Canal Therapy Outcome? A Systematic Review. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 40(1), 1–7. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2017.14.015>
- Polaquini, S. R. B., Svidzinski, T. I. E., Kimmelmeier, C., & Gasparetto, A. (2006). Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*, 51(6), 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2005.11.007>
- Ponnusamy, S., Haldar, S., Mulani, F., Zinjarde, S., Thulasiram, H., & RaviKumar, A. (2015). Gedunin and azadiradione: Human pancreatic alpha-amylase inhibiting limonoids from neem (*Azadirachta indica*) as anti-diabetic agents. *PLoS ONE*, 10(10), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140113>
- prashant 2007 The effect of mango and neem extract on four organisms causing dental caries. (n.d.).
- Priyadarsini, R. V., Manikandan, P., Kumar, G. H., & Nagini, S. (2009). The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit hamster cheek pouch carcinogenesis by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes, DNA damage, antioxidants, invasion and angiogenesis. *Free Radical Research*, 43(5), 492–504. <https://doi.org/10.1080/10715760902870637>
- Raja, P., Elayapillai, S., Priya, S., & Balakrishnan, S. (2016). Inhibition of cell survival and proliferation by nimbolide in human androgen-independent prostate cancer (PC-3) cells : involvement of the PI3K / Akt pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2898-4>
- Rao, D. S., Penmatsa, T., Kumar, A. K., Reddy, M. N., Gautam, N. S., & Gautam, N. R. (2014). Antibacterial activity of aqueous extracts of Indian chewing sticks on dental plaque : An in vitro study, 6(July), 140–146. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.137426>
- Rapidis, A. D. (2008). Sarcomas of the head and neck in adult patients : current concepts and future perspectives, 1271–1297.
- Regezi, J. A.; Sciubba, J.J.; Jordan, R. C. K. (2003). *Oral pathology clinical paphology correlations*. 4ª edição. St Louis, Missouri: Saunders
- Rickel, K., Fang, F., & Tao, J. (2017). Molecular genetics of osteosarcoma. *Bone*, 102, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.10.017>
- Romita et al.2019. (n.d.). Allergic contact dermatitis to neem oil: an underrated

- allergen?, 10–12. <https://doi.org/10.1111/cod.13256>
- Rout, K. K., & Mishra, S. K. (2014). Development of a sensitive HPTLC method for quantification of nimbolide in *Azadirachta indica* and its dosage form. *Journal of Chromatographic Science*, 52(9), 1089–1094. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt151>
- Saleem, S., Muhammad, G., Hussain, M. A., & Bukhari, S. N. A. (2018). A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. *Phytotherapy Research*, 32(7), 1241–1272. <https://doi.org/10.1002/ptr.6076>
- Sarkar, M., Ghosh, S., Bhuniya, A., Ghosh, T., Guha, I., Barik, S., ... Baral, R. (2017). Neem leaf glycoprotein prevents post-surgical sarcoma recurrence in Swiss mice by differentially regulating cytotoxic T and myeloid-derived suppressor cells. *PLoS ONE*, 12(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175540>
- Sarkar, P., Acharyya, S., Banerjee, A., Patra, A., Thankamani, K., Koley, H., & Bag, P. K. (2016). Intracellular, biofilm-inhibitory and membranedamaging activities of nimbolide isolated from *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) against meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 65(10), 1205–1214. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000343>
- Sastry, B. S., Suresh Babu, K., Hari Babu, T., Chandrasekhar, S., Srinivas, P. V., Saxena, A. K., & Madhusudana Rao, J. (2006). Synthesis and biological activity of amide derivatives of nimbolide. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(16), 4391–4394. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.05.105>
- Schneider, J. G., Amend, S. R., & Weilbaecher, K. N. (2011). Integrins and bone metastasis: Integrating tumor cell and stromal cell interactions. *Bone*, 48(1), 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.09.016>
- Šedý, J. R., Spear, P. G., & Ware, C. F. (2008). Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members. <https://doi.org/10.1038/nri2434>
- Sengupta, P., Ramasdn, S., Chowdhury, R., Lohitesh, K., Saini, H., Mukherjee, S., & Paul, A. (2017). Evaluation of Apoptosis and Autophagy Inducing Potential of *Berberis aristata*, *Azadirachta indica*, and Their Synergistic Combinations in Parental and Resistant Human Osteosarcoma Cells. *Frontiers in Oncology*, 7(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00296>
- Sharma, A., Sankhla, B., Parkar, S. M., Hongal, S., Thanveer, K., & Ajithkrishnan, C. G. (2014). Effect of traditionally used neem and babool chewing stick (datun) on

- Streptococcus mutans: An in-vitro study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(7), 15–17. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9817.4549>
- Sharma, R., Hebbal, M., Ankola, A. V., Murugaboopathy, V., & Shetty, S. J. (2014). Effect of Two Herbal Mouthwashes on Gingival Health of School Children. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(4), 272–278. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.131373>
- Silva, E. A. P., Carvalho, J. S., Guimarães, A. G., S, R. D. S., Santos, M. R. V, Barreto, A. S., ... Barreto, A. S. (2019). Expert Opinion on Therapeutic Patents The use of terpenes and derivatives as a new perspective for cardiovascular disease treatment : a patent review (2008 – 2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 00(00), 1–11. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1558211>
- Sinevici, N., & O'sullivan, J. (2016). Oral cancer: Deregulated molecular events and their use as biomarkers. *Oral Oncology*, 61, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.07.013>
- Singh, T., & Schenberg, M. (2013). Delayed diagnosis of oral squamous cell carcinoma following dental treatment, 369–373. <https://doi.org/10.1308/003588413X13629960045599>
- Sinha, D. J., Garg, P., Verma, A., Malik, V., Maccune, E. R., & Vasudeva, A. (2015). Dentinal tubule disinfection with propolis & two extracts of Azadirachta indica against Candida albicans biofilm formed on tooth substrate. *Open Dentistry Journal*, 9, 369–374. <https://doi.org/10.2174/1874210601509010369>
- Sophia, J., Kiran Kishore T., K., Kowshik, J., Mishra, R., & Nagini, S. (2016). Nimbolide, a neem limonoid inhibits Phosphatidyl Inositol-3 Kinase to activate Glycogen Synthase Kinase-3 β in a hamster model of oral oncogenesis. *Scientific Reports*, 6(September 2015), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep22192>
- Sophia, J., Kowshik, J., Dwivedi, A., Bhutia, S. K., & Manavathi, B. (2018). Nimbolide , a neem limonoid inhibits cytoprotective autophagy to activate apoptosis via modulation of the PI3K / Akt / GSK-3 β signalling pathway in oral cancer. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1126-4>
- Srivastava, P., Yadav, N., Lella, R., Schneider, A., Jones, A., Marlowe, T., ... Chandra, D. (2012). Neem oil limonoids induces p53-independent apoptosis and autophagy. *Carcinogenesis*, 33(11), 2199–2207. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs269>
- Tudor-green, B. (2017). Current update on the diagnosis and management of head and neck hard tissue sarcomas Authors. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>

- tyagi 2013 ORIGINAL ARTICL1. (n.d.).
- Uchio, E., Takeuchi, S., Itoh, N., Matsuura, N., & Ohno, S. (2000). Clinical and epidemiological features of acute follicular conjunctivitis with special reference to that caused by herpes simplex virus type 1, 968–972.
- Vaibhav Tiwari^{1,2}, Nissar A. Darmani¹, Beatrice Y. J. T. Yue³ and Deepak Shukla³, 4. (2009). In vitro Antiviral Activity of Neem (*Azadirachta indica* L.) Bark Extract against Herpes Simplex Virus Type-1 Infection. *Transformations in Business and Economics*, 16(1), 85–99. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Vassiliou, L., Lalabekyan, B., Jay, A., Liew, C., Whelan, J., Newman, L., & Kalavrezos, N. (2017). Head and neck sarcomas: A single institute series. *Oral Oncology*, 65, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.12.005>
- Wang, L., Dang, D., Phan, K., Zhang, J., Ong, P., & Lwin, W. (2016). Anticancer properties of nimbolide and pharmacokinetic considerations to accelerate its development. *Oncotarget, Advance Publications*, 7(April), 1–13. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8316>
- Wojcik, K. A., Kaminska, A., Blasiak, J., & Szaflik, J. (2013). Oxidative Stress in the Pathogenesis of Keratoconus and Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy, 19294–19308. <https://doi.org/10.3390/ijms140919294>
- Wolinsky, L. E., Mania, S., Nachnani, S., & Ling, S. (1996). The inhibiting effect of aqueous *Azadirachta indica* (Neem) extract upon bacterial properties influencing in vitro plaque formation. *Journal of Dental Research*, 75(2), 816–822. <https://doi.org/10.1177/00220345960750021301>
- Yeldag, G., Rice, A., & Hernández, A. del R. (2018). Chemoresistance and the self-maintaining tumor microenvironment. *Cancers*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/cancers10120471>
- Zhou, M., Zhang, R., Wang, M., Xu, G., & Liao, S. (2017). prodrugs of triterpenoids and their derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.005>
- Ziech, D., Anastopoulos, I., Hanafi, R., Persephoni, G., Franco, R., Georgakilas, A. G., ... Panayiotidis, M. I. (2012). Pleiotrophic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis: The role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention. *Cancer Letters*, 327(1–2), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.025>