

SCHIRLEY APARECIDA MAIA

**ESTUDO PILOTO *in vitro* DA AÇÃO DA NALTREXONA EM
CÉLULAS DE QUERATINÓCITOS, FIBROBLASTOS E MONÓCITOS
HUMANOS E MICRORGANISMOS AERÓBIOS: *Pseudomonas
aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans***

2023

SCHIRLEY APARECIDA MAIA

**ESTUDO PILOTO *in vitro* DA AÇÃO DA NALTREXONA EM
CÉLULAS DE QUERATINÓCITOS, FIBROBLASTOS E MONÓCITOS
HUMANOS E MICRORGANISMOS AERÓBIOS: *Pseudomonas
aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, para obtenção do título de MESTRE no Mestrado Profissional pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA E TECNOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA.

Área: Inovação tecnológica multidisciplinar com ênfase em odontologia. Linha de pesquisa: Inovação Tecnológica

Orientador: Prof. Dr. José Benedito Oliveira Amorim

Co-orientador: Dr. Lucas de Paula Ramos

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2025]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Maia, Schirley Aparecida

Estudo Piloto in vitro da ação da Naltrexona em células de queratinócitos, fibroblastos e monócitos humanos em microrganismos aeróbios: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* / Schirley Aparecida Maia. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.

55 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Aplicada à Odontologia - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientador: José Benedito de Oliveira Amorim

Coorientador: Lucas de Paula Ramos

1. Naltrexona. 2. LDN. 3. Microrganismos da cavidade oral. 4. Receptores Toll-Like. 5. Reparação tecidual. I. Amorim, José Benedito de Oliveira, orient. II. Ramos, Lucas de Paula, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. V. Universidade Estadual Paulista (UNESP). VI. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

As doenças periodontais envolvem inflamações nos tecidos bucais, levando à perda de inserção, óssea e dentária. Resultam da interação entre biofilme dental e tecidos, influenciada por fatores locais, sistêmicos e genéticos. Novas terapias, como agentes imunomoduladores, têm sido exploradas. A Naltrexona, em doses baixas, pode reduzir dor e melhorar tratamentos periodontais, sendo acessível e eficaz.

POTENCIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Periodontal diseases involve inflammation in the oral tissues, leading to loss of bone and tooth attachment. They result from the interaction between dental biofilm and tissues, influenced by local, systemic and genetic factors. New therapies, such as immunomodulatory agents, have been explored. Naltrexone, in low doses, can reduce pain and improve periodontal treatments, being affordable and effective.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Dr. José Benedito Oliveira Amorim (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Dra. Mônica Fernandes Gomes

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Lilian Chrystiane Giannasi

UniEvangélica –Universitário Evangélica de Goiás

Curso de Odontologia

Cidade Universitária – Anápolis – GO

São José dos Campos, 24 de agosto de 2023.

DEDICATÒRIA

Aos meus pais, em especial minha mãe Maria do Carmo de Siqueira, por todo carinho e dedicação, por me incentivar, encorajar, não me permitir desistir nunca, por estar sempre ao meu lado me apoiando mesmo nos desafios que surgiram. Obrigada pelo seu exemplo e por todo o seu amor. Sem seu apoio eu jamais conseguiria. Ao meu pai Luiz Carlos Maia que sempre me apoiou e me auxiliou em minha vida. Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por tudo de bom que ambos fizeram e ainda fazem por mim.

Aos meus irmãos Carlos Eduardo Maia por toda a presença, ajuda, incentivo, amizade e carinho. Sem você eu jamais conseguiria. Ao meu irmão Chrystian Jones Maia Campos pelo auxílio sempre necessário, por ser um exemplo de perseverança, dedicação e dinamismo.

Aos meus filhos, Guilherme Maia Giampietro e Rafael Maia Giampietro, que são o meu motivo de querer ser melhor a cada dia, por me ensinarem sobre o amor verdadeiro e pleno e me motivarem a estudar e buscar fazer a diferença.

A minha afilhada Julia Becker Maia, pelo carinho, atenção, amizade, cumplicidade, por me motivar na incansável busca de ser uma profissional humana, sensível, competente e eternamente aprendiz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me iluminar e me dar força e sabedoria, a minha família, minha mãe, meu pai, meus irmãos e meus filhos, que me apoiaram e me incentivaram para que eu realizasse esse meu grande sonho.

Ao meu professor e orientador Dr. José Benedito Oliveira Amorim por todos os seus ensinamentos, por toda a confiança, paciência e apoio, incentivando-me ao longo de todo o curso, sempre com otimismo e sabedoria.

Ao meu co-orientador Dr Lucas de Paula Ramos por ter me ensinado, realizado e orientado com tanta calma, presteza e técnica os testes laboratoriais deste trabalho, sem os quais não seria possível realizá-lo.

A professora Dra. Mônica Fernandes Gomes por tantos ensinamentos, por todo seu apoio, por me mostrar o quão encantador é universo acadêmico, por me auxiliar em tantos momentos para a realização de todo o curso de Mestrado e por toda a confiança em mim depositada, e por aceitar o convite de fazer parte da minha banca.

A minha amiga e Mestra Renata dos Santos Nudi por toda a ajuda durante o curso, sempre com tanta disposição e carinho, sem a qual eu não teria conseguido.

A professora Dra. Lilian Chrystiane Giannasi por ter aceitado o convite de fazer parte da minha Banca na defesa da minha dissertação com grande empolgação.

Aos professores do Mestrado Profissional.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação professora Dra. Paula Komori de Carvalho.

Aos meus colegas de turma que sempre se ajudaram mutuamente.

A todos os professores do programa por terem contribuído com minha aprendizagem neste momento tão importante em minha carreira e, com certeza, me trará novas experiências e oportunidades.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram e estiveram presentes nesta pesquisa.

Maia SA. Estudo Piloto *In Vitro*, da Ação da Naltrexona em Células De Queratinócitos, Fibroblastos e Monócitos Humanos e Microorganismos Aeróbios: *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus Aureus* e *Candida Albicans* [dissertação] São José Dos Campos (Sp): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023

RESUMO

É crescente o número de estudos que buscam novas abordagens terapêuticas no controle de microrganismos patogênicos que afetam a cavidade bucal. A naltrexona, um antagonista não seletivo dos receptores opioides, é usada principalmente como terapia de reabilitação para viciados em opiáceos com a finalidade de melhora da qualidade de vida destes indivíduos. Nos últimos anos, houve algumas descobertas novas e significativas sobre o uso *off-label* de naltrexona em doses substancialmente mais baixas do que a recomendada para este fim (LDN), modificando o curso de várias doenças, especialmente relacionados com inflamação ou desregulação imunológica. Desta forma, avaliamos a atividade antimicrobiana do agente farmacológico sobre culturas planctônicas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* bem como a verificação da atividade metabólica de culturas celulares de queratinócitos Humanos (HaCat), fibroblastos humanos (HFF-1) e monócitos humanos (THP-1) pós contato com o fármaco. A análise antimicrobiana foi performada pelo Teste de microdiluição em caldo, segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), protocolo M7-A9 (bactérias) e M27-A2 (Leveduras), determinando os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CMM). A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo teste de MTT, avaliando atividade metabólica das células HaCaT, HFF-1 e THP-1. Os resultados demonstraram que a concentração máxima de 2,5 mg/mL do fármaco não resultou em valores de CIM e CMM frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. A linhagem de queratinócitos (HaCat) obteve redução máxima de 7,19%, THP-1 reduziu 18,4%, enquanto fibroblastos (HFF-1) foram mais sensíveis ao fármaco, exibindo reduções de 86,8% a 5,07%. Em conclusão a Naltrexona não exibiu atividade antimicrobiana sobre culturas planctônicas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* com a concentração máxima de 2,5 mg/mL bem como exibiu ausência de citotoxicidade sobre queratinócitos (HaCat) e Monócitos Humanos (THP-1). As concentrações de 2,5 a 0,312 mg/mL exibiram toxicidade metabólica sobre fibroblastos humanos (HFF-1).

Palavras-chave: Naltrexona. LDN. Reparação tecidual. Anti-inflamatórios. Microbiota. Receptores Toll-Like. Microorganismos da cavidade oral.

Maia SA. *In Vitro Pilot Study of Naltrexone Action on Keratinocytes, Fibroblasts And Human Monocytes Cells And Aerobic Microorganisms: Pseudomonas Aeruginosa, Staphylococcus Aureus And Candida Albicans* [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Thechnology; 2023.

ABSTRACT

There is a growing number of studies that seek new therapeutic approaches in the control of pathogenic microorganisms that affect the oral cavity. Naltrexone at substantially lower doses than recommended for the treatment of alcoholism improves and modifies the course of several diseases. The use of this substance may be useful for studies involving chronic inflammation or immune dysregulation. As numerous systemic diseases or drug side effects are reflected in the periodontium, either by direct manifestation or by modified inflammatory reaction in relation to the plaque, we believe it is relevant to evaluate the effects of this agent on the antimicrobial action. Thus, we evaluated the antimicrobial activity of the pharmacological agent on planktonic cultures of Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans, as well as the verification of the metabolic activity of cell cultures of human keratinocytes (HaCat), human fibroblasts (HFF-1) and human monocytes (THP-1) after contact with the drug. The antimicrobial analysis was performed using the broth microdilution test, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), protocol M7-A9 (bacteria) and M27-A2 (Yeasts), determining the values of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MMC). Cytotoxicity assessment was performed using the MTT test, evaluating the metabolic activity of HaCaT, HFF-1 and THP-1 cells. The resistant results that the maximum concentration of 2.5 mg/mL of the drug did not result in MIC and MIC values against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. The keratinocyte lineage (HaCat) obtained a maximum reduction of 7.19%, interrupted THP-1 18.4%, while fibroblasts (HFF-1) were more sensitive to the drug, showing reductions from 86.8% to 5.07%. In conclusion, Naltrexone did not exhibit antimicrobial activity on planktonic cultures of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* with a maximum concentration of 2.5 mg/mL, as well as the absence of cytotoxicity on keratinocytes (HaCat) and Human Monocytes (THP-1). Concentrations of 2.5 to 0.312 mg/mL exhibit metabolic toxicity on human fibroblasts (HFF-1).

Keywords: Naltrexone. LDN Tissue repair Anti-inflammatories. microbiota. Tool-Like Receptors Oral cavity microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Streptococcus aureus expostas ao fármaco.....	37
Figura 2 - Pseudomonas aureaginosa expostas ao fármaco.....	37
Figura 3 - Candida albicans expostas ao fármaco.....	38
Figura 4 - Avaliação com microscópio para análise das células viáveis de HaCat.....	39
Figura 5 - Avaliação com microscópio para análise das células viáveis de HaCat após exposição à concentração de 5mg/ml de Naltrexona.....	40
Figura 6 - Avaliação com microscópio para análise de fibroblastos expostos às primeiras concentrações de Naltrexona.....	41
Figura 7 - Avaliação com microscópio para análise de fibroblastos expostos às 4 ^a , 5 ^a e 6 ^a concentrações de Naltrexona.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Taxas de viabilidade celular dos queratinócitos humanos (HaCat), na presença de diferentes concentrações de Naltrexona.....	39
Gráfico 2 - Taxas de viabilidade celular dos fibroblastos (TFF1), expostos às diferentes concentrações de Naltrexona.....	41
Gráfico 3 - Taxas de viabilidade celular monócitos (THP1), expostos às diferentes concentrações de Naltrexona.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Taxas de viabilidade células dos queratinócitos humanos (HaCat) expostos ao fármaco.....	36
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LDN- Baixa dose de Naltrexona (do inglês *Low Dose Naltrexone*)

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)

FDA – Administração de comidas e remédios (do inglês *food and Drugs Administration*)

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

TLR4 – Receptor Toll like 4 (do inglês Toll like receptor 4)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês tumor necrosis factor)

HaCat- Queratinócitos Humanos

TFF1- Fibroblastos humanos

THP1- Monócitos humanos

DEMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Mediu

EUCAST- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

BE- Beta- endorfina

ME- Metionina

DP- Doenças Periodontais

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

DOR- Receptor *delta*

MOR- Receptor *mu*

PRRs- Receptores de Reconhecimento de Padrões

PAMPs- Padrões Moleculares Associados à Patógenos

washout - refere-se a uma pausa no tratamento em curso

SNC- Sistema Nervoso Central

BHE- Barreira Hemato Encefálica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Receptores toll-like.....	21
2.2 Receptores toll-like e doença periodontal.....	22
2.3 Agentes farmacológicos com efeito antimicrobiano na cavidade oral	23
2.4 Antimicrobianos locais utilizados na cavidade oral.....	24
2.5 Naltrexona.....	26
3 PROPOSIÇÃO.....	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Fármaco Naltrexona	32
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do fármaco	32
4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbida Mínima (CMM) para os aeróbios	32
4.4 Testes em células.....	33
4.5 Avaliação da citotoxicidade do fármaco Naltrexona em queratinócitos humanos HaCat, fibroblastos humanos TFF-1 e monócitos humanos THP-1.....	34
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana da naltrexona sobre culturas planctônicas dos micro-organismos aeróbios.....	36
5.2 Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade in vitro) da Naltrexona sobre queratinócitos humanos HaCat.....	38
5.3 Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade in vitro) da Naltrexona sobre Fibroblastos humanos.....	40
5.4 Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade in vitro) da Naltrexona sobre monócitos humanos TFF-1.....	42
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÃO.....	49

8 REFERÊNCIAS.....	50
---------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

A utilização de agentes químicos para o tratamento da doença periodontal, seja por via sistêmica ou tópica, tem se mostrado, como um importante fator coadjuvante associado ao tratamento mecânico. A periodontite é uma doença imune-inflamatória que provoca a destruição dos tecidos de suporte dos dentes, levando ao desenvolvimento de bolsas periodontais, recessões gengivais e perda óssea, considerados danos irreversíveis (Zandbergen et al., 2013; Kopra et al. 2021, Perrela et al, 2016; Silva et al., 2022; Brandão et al., 2023).

Alguns pacientes podem não responder bem ao tratamento periodontal padrão. Nesses casos o uso de agentes biologicamente ativos pode trazer benefícios ao tratamento, pois a associação mecânica, sistêmica (antimicrobiano) e tópica (local), como solução irrigadora subgengival, durante tratamento efetivo, eou mesmo como colutorio, pode contribuir com a diminuição da atividade do biofilme microbiano, desenvolvendo um cenário onde a microbiota seja mais saudável, melhorando e controlando o processo inflamatório causado pela periodontite. No entanto, a correta posologia, escolha do agente terapêutico e conhecimento do momento exato de seu emprego ainda seguem sem definições específicas e muitos tratamentos com agentes químicos, sejam de forma sistêmica ou local (tópica) acabam sendo empíricos (Canas et al.2015; Feres et al.2015; Perrela & Amorim et al. 2016, Scorzoni & Amorim et al. 2020).

A Naltrexona é um antagonista de receptor opióide, inicialmente aprovada como tratamento da dependência aos opiáceos e, posteriormente, da dependência ao álcool. A dosagem preconizada para este fim foi aprovada pela FDA em 1984, na concentração de 50mg ao dia. Todavia, existem várias evidências na literatura que demonstram que a utilização deste agente farmacológico em baixas dosagens (<5mg) pode modificar o curso de vários processos inflamatórios, autoimunes e até oncogênicos, melhorando a qualidade de vida destes pacientes. (Brown, 2009; Zagon,1983; Smith et al 2011).

A Naltrexona em dose baixa (LDN) possivelmente aumenta a expressão de receptores opióides, bem como encefalinas e níveis de endorfinas por um mecanismo compensatório devido ao bloqueio temporário desses receptores (Brown, 2009; Zukin et al, 1982). Este agente biologicamente ativo é capaz de bloquear os receptores

opióides por período de 24 horas na dose de 50 mg / dia, sendo geralmente a dose inicial dose para prescrição para reduzir o consumo de álcool. No entanto, Naltrexona diária e dose reduzida (3 - 4,5 mg / dia) possivelmente implicam em um bloqueio temporário desses receptores no Sistema Nervoso Central (SNC) por um período de 4- 6 horas, promovendo assim uma regulação positiva dos receptores e seus ligantes endógenos. (Zagon,1984; Brown, 2009).

Os opióides alteram o desenvolvimento, diferenciação e as células imunes e os sistemas inato e adaptativo são afetados. Eles afetam células progenitoras da medula óssea, macrófagos, células NK, timócitos imaturos e células T e células B. A naltrexona é frequentemente classificada como antagonista dos opiáceos. No entanto, em doses baixas, a naltrexona age para inibir certas vias inflamatórias, que envolvem receptores do tipo Toll-Like (TLRs). Demonstrando um efeito distinto da modulação do processo nociceptivo ou de dependência química de abuso de drogas. (Toljan & Vrooman; 2018)

As doenças autoimunes resultam de uma imunodeficiência que perturba a habilidade do sistema imune distinguir o “self” do não “self” e assim permite a autoagressão do próprio tecido ou órgão. O entendimento das Doenças Periodontais (DP), enquanto doenças de caráter infeccioso vão além da elucidação das bactérias periodontopatogênicas associadas com o biofilme supra e subgengival. A participação do sistema imune frente às agressões que os microrganismos podem causar representa um fator importante, uma vez que muitos dos fatores imunológicos, promovidos em resposta às bactérias, podem causar uma alteração na homeostasia do osso alveolar afetado (Baker 2000).

O envolvimento do sistema imunológico vai depender da severidade e progressão da DP e pode ter a participação tanto da resposta imune inata ou natural quanto da adquirida ou adaptativa. A resposta imune inata corresponde à primeira linha de defesa do organismo, em que os mecanismos efetores são ativados de forma rápida. A imunidade adquirida, por sua vez, é uma resposta mais demorada, por isso mais específica, sendo dividida em celular e humoral. Essa imunidade confere uma memória imunológica às células do seu sistema (linfócitos T e B) e permite a adaptação do corpo a determinados microrganismos (Abbas et al, 2008).

Com relação à imunidade mediada por células nas DP, o sistema imune, além do papel de defender o hospedeiro contra os mecanismos de virulência das bactérias,

fornece meios de evitar uma progressão da injúria tecidual. A imunidade mediada por célula T CD4+ é um fator crucial para o controle da infecção. As pesquisas nessa área têm enfatizado os seguintes pontos: estudo da osteoimunologia das DP no desenvolvimento de técnicas para identificar os fatores de virulência dos microrganismos e antígenos associados com infecções por *A. Actinomicetemcomitans* e *P. gingivalis*.(Hajishengallis et al., 2008)

Com relação à resposta imune inata, atenção importante tem sido dada aos receptores denominados Toll-like receptors (TLRs). Esses TLRs podem ser expressos em dois locais distintos das diversas células do sistema imune: na superfície celular ou em compartimentos intracelulares (Medzhitov 2001).

Os TLRs representam uma importante família de receptores que constituem a primeira linha do sistema de defesa contra micróbios. Eles podem reconhecer patógenos invasores e moléculas endógenas liberados de células degeneradas e tecidos danificados e desempenham um papel fundamental na ligação da imunidade inata e adaptativa. Os TLRs são amplamente distribuídos nas células imunes e em outras células do corpo. As expressões e localizações dos TLRs são reguladas em resposta a moléculas específicas derivadas de patógenos ou células hospedeiras danificadas. A ligação de ligantes a TLR ativa cascatas de sinalização celular específicas que iniciam reações de defesa do hospedeiro. Essa ligação é dependente do ligante e dependente do tipo de célula e leva à produção de citocinas relacionadas com o processo inflamatório (Sameer & Nissar, 2021).

Tais receptores são proteínas de membrana (ou de organelas celulares) que atuam na identificação de moléculas estranhas ao organismo do hospedeiro e assim são descritas como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que uma vez ativadas promovem o desencadeamento da resposta imune. Essas proteínas são altamente conservadas do ponto de vista filogenético e foram identificadas em animais invertebrados quanto vertebrados. A primeira identificação de TLRs em 1988 em *Drosophila melanogaster* ou *D. melanogaster* e o subsequente reconhecimento de seu único homólogo chamado TLR4 em humanos em 1997. A identificação dos TLRs em mamíferos tem revolucionado o campo da Microbiologia e Imunologia, em que, com base no entendimento da indução dos TLRs e de suas sinalizações, novas terapias futuras poderão ser desenvolvidas (Janssens & Beyaert, 2003) Eles desempenham um papel crucial na regulação da imunidade inata, e vários estudos

demonstraram sua importância em infecções bacterianas, virais e fúngicas, doenças autoimunes e cânceres (Sameer & Nissar, 2021).

Atualmente, a visão de consenso de uma perspectiva imunológica é de que agentes químicos ou físicos que interagem nos receptores TLR, podem servir como um possível agente terapêutico ou como moduladores de doenças infecciosas. Essas noções são baseadas no fato de que substâncias biologicamente ativas nos receptores TLR podem modular a secreção de citocinas pró-inflamatórias e, em geral, o desenvolvimento de respostas pró-inflamatórias.

Portanto, os TLRs parecem ter o potencial de servir como um alvo perfeito na era das imunoterapias. A perspectiva sobre terapias baseadas em interações com TLR lança luz sobre sua utilidade de terapias combinadas, como a participação da Naltrexona, que podem atuar em diversos tecidos do organismo, como na modulação da atividade de células da glia no sistema nervoso central através de mecanismos envolvidos na atividade receptor TLR4 onde o seu bloqueio pela LDN inibe a liberação de citocinas e a sinalização macrófaga TLR4 da micróglia, com supressão da liberação de citocinas pró-inflamatórias, substância P, óxido nítrico, glutamato, e diminuição da expressão do receptor de quimiocina e da molécula de adesão (Brown, Panksepp, 2009; Argawal et al.,2017).

Estudos recentes feitos por Wang et al,(2019), sobre distúrbios de imunodeficiência humana primária e modelos animais levaram à descoberta dos principais componentes imunes inatos e adaptativos necessários para o controle de infecções fúngicas locais e disseminadas. Ao reconhecer os componentes da parede celular fúngica, os TLRs (receptores Toll-like) desempenham papéis importantes na iniciação da resposta imune inata para o controle imediato da propagação fúngica e na diferenciação de CD4 + T helper 1 e 17 (Th1 e Th17) células efetoras para o controle posterior e memória de longo prazo da infecção fúngica.

Já, em relação a cavidade oral, sabe-se que a microbiota é colonizada por cerca de 1000 a 100.000 microrganismos envolvendo 300 espécies diferentes, como os patógenos e saprófitos, que estabelecem uma relação harmônica com o sistema imunológico do ser humano (Oliveira,et al.2011).

Os patógenos associados com as DP interagem com os TLRs, estes, por sua vez, induzem citocinas, que irão causar o agravamento da doença (Schröder et al 2005). Um dos principais produtos microbianos capaz de estimular os TLRs das

células de defesa é o lipopolissacarídeo das bactérias Gram-Negativas (LPS). Grande parte das bactérias associadas com as DP estimula o receptor TLR4. No entanto, o patógeno *P. gingivalis* difere, pois o lipopolissacarídeo, que essa bactéria produz, estimula o receptor TLR2 (Hajishengallis et al 2008; Kobayashi et al 2016). O entendimento das vias de sinalização dos TLRs surge como uma área interessante no campo da Imunologia das DP. A continuação dos estudos com os TLRs e suas vias de sinalização pode surgir como uma nova forma de lidar com as DP.

Desta forma, considerando a importância de desenvolvimento de novos agentes químicos, adjuvantes, para tratamento de doenças bucais, que possam modular benéficamente o tratamento periodontal resistente ao tratamento mecânico padrão. Considerando a ação da Naltrexona em baixas dosagens que atuam na modulação da resposta imune, redução da dor e na reparação tecidual, e ainda seu possível papel em receptores TLR presentes na microbiota, mucosa oral ou tecido periodontal, bem como a existência de uma relação estreita de microrganismos periodontopatógenos na determinação e/ou intensidade da DP através destes mesmos receptores de membrana celular, acreditamos ser interessante perseguir este questionamento, avaliando se o papel deste agente em fenótipos patógenos prevalentes da cavidade oral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A cavidade oral contém vários nichos significativamente diferentes com comunidades microbianas distintas. Uma ampla gama de microrganismos habita a cavidade oral humana, incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários. Esses microrganismos formam uma comunidade ecológica complexa que influencia a saúde oral e sistêmica. As doenças bucais mais prevalentes, cárie dentária e doenças periodontais, são doenças associadas à microbiota. Além disso, evidências crescentes têm apoiado que muitas doenças sistêmicas estão associadas a distúrbios no ecossistema oral, como diabetes, doenças cardiovasculares e tumores. Doenças sistêmicas como diabetes, artrite reumatoide (AR) e lúpus eritematoso sistêmico (LES) aumentam a suscetibilidade a doenças periodontais destrutivas.

Em estudos humanos e em modelos animais, essas doenças mostraram aumentar a inflamação no periodonto e aumentar o risco ou a gravidade da periodontite. As relações entre o biofilme e a resposta imune do hospedeiro são dinâmicas, e as interações ecológicas entre eles determinam a homeostase local ou transição para um estado de doença. A inflamação ocorre quando as bactérias ou seus produtos encontram leucócitos no epitélio ou no tecido conjuntivo subjacente. O desafio bacteriano leva à migração de células dendríticas (DCs) para os linfonodos e epitélio gengival. Uma perda de DCs na periodontite experimental ou uma diminuição na função de DC por meio da deleção do gene específico da linhagem aumenta a inflamação periodontal, o ativador do receptor da expressão do ligante Kappa-B do fator nuclear (RANKL) e a perda óssea (Xiao et al. 2015). Curiosamente, a redução da atividade de DC diminui a ativação de linfócitos e a formação de anticorpos e está ligada ao aumento da suscetibilidade à doença periodontal (Xiao et al. 2015). Os níveis aumentados de mediadores inflamatórios nos tecidos periodontais de indivíduos com doenças sistêmicas podem alterar as condições locais e favorecer espécies bacterianas patogênicas. As doenças sistêmicas podem compartilhar fatores de risco comuns que levam a um aumento da resposta inflamatória quando há uma interrupção do equilíbrio. (Graves et al., 2018)

2.1 Receptores Toll-like

A proteína Toll foi originalmente descoberta na década de 1990, em insetos do gênero *Drosophila*, sendo essencial para a proteção das moscas contra as infecções fúngicas. Em 1997 foi identificado e caracterizado um homólogo da proteína Toll em humanos sendo denominado de receptor Toll-Like. Cabe destacar que os pesquisadores Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard e Eric F. Wieschaus foram agraciados pelo prêmio Nobel de Medicina em 1995.

A partir desta década, dez receptores Toll humanos foram identificados e classificados (TLR1-10) exercendo papel importante na detecção e reconhecimento de patógenos e na indução de atividade antimicrobiana pela ativação dos sistemas de imunidade inata e adquirida. Os receptores Toll-Like (TLR) são proteínas transmembrana altamente conservadas que desempenham papel importante na detecção e reconhecimento de patógenos microbianos (PRRs), bem como na geração de sinais para a produção de proteínas e citocinas pró-inflamatórias. (Kawai; Akira, 2010; Ferraz et al., 2011).

Tais receptores situados em membrana plasmática ou estruturas intracelulares, reconhecem os padrões moleculares em classes específicas de agentes patogênicos sinalizando uma série de eventos que levam à expressão de genes pró-inflamatórios. Após a identificação do papel do gene Toll da *Drosophila*, o TLR4, foi o primeiro homólogo em humanos dos Receptores Toll-Like reconhecidos, e desde então muitas pesquisas nesta área são desenvolvidas e diversos outros receptores de membrana da família Toll foram identificados. Dentre os diversos Receptores Toll-Like já conhecidos, os TLR2 e TLR4 são os mais bem estudados em razão da grande variedade de células que os expressam em suas superfícies e suas consequentes repercussões no organismo humano. O TLR4 é um importante agente receptor de patógenos que reconhece, além de estruturas fúngicas e de agentes micobacterianos patogênicos, lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas. (Ferraz et al., 2010)

Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) constituem um componente chave da imunidade inata devido à sua capacidade de detectar inicialmente a exposição à infecção e provocar uma cascata de sinalização intracelular para a eventual eliminação do patógeno e célula infectada do mesmo. Todos os PRRs são

proteínas codificadas pela linhagem germinativa que podem reconhecer ampla variedade de moléculas estranhas (por exemplo, lipídios, carboidratos, peptídeos e ácidos nucleicos) comumente encontradas em patógenos, mas distintas das moléculas hospedeiras e, portanto, são comumente referidas como padrões moleculares ativadas por patógenos (PAMPs) . A ativação de PRRs resulta na ativação transcricional a jusante e na expressão de numerosos mediadores inflamatórios. Além disso, a sinalização pela ativação de PRR também leva ao desencadeamento de vários processos envolvidos na autofagia, morte celular, processamento de citocinas e fagocitose (Sameer & Nissar, 2021).

2.2 Receptores Toll-like e doença periodontal

A Doença periodontal é um termo muito abrangente, uma vez que envolve enfermidades que atingem os tecidos gengivais, os tecidos conjuntivos periodontais e o osso alveolar. Trata-se de uma doença que abrange inúmeras causas e induz aos mais variados sintomas sendo, todavia, caracterizada por um grupo de lesões que afetam os tecidos de sustentação dos dentes nos seus alvéolos. (Ferraz, et al., 2011)

A placa bacteriana é considerada o principal agente etiológico da doença periodontal, a qual é constituída por micro-organismos predominantemente Gram-negativos anaeróbios, cujo acúmulo nos tecidos leva a uma resposta inflamatória crônica, promovida pelo contato das células do epitélio da mucosa com metabólitos, enzimas, toxinas e fatores de colonização das bactérias. (Kajita et al ., 2007)

Embora a placa bacteriana seja o principal fator etiológico da doença periodontal, a resposta imune do hospedeiro determina a susceptibilidade à doença, uma vez que existe um delicado equilíbrio entre os micro-organismos encontrados na placa e a resposta do hospedeiro. Em indivíduos saudáveis, a resposta imunológica proporciona uma defesa específica e bem regulada, impedindo, deste modo, o desenvolvimento da doença periodontal. Componentes bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS), encontrados na parede celular de bactérias Gram-negativas, representam importantes e potentes estimuladores de secreção celular de várias citocinas e fatores de crescimento via mediada por Receptores Toll-Like. A ligação do lipopolissacarídeo ao TLR4 induz produção de citocinas inflamatórias da resposta imune inata, que contribuem com a destruição tecidual. (Ferraz, et al, 2011)

Infindas pesquisas têm demonstrado relação entre o desenvolvimento da doença periodontal e a expressão de citocinas do tipo Th1 nos sítios de inflamação, como as IL-1, IL-2, IFN- γ e o TNF- α , sendo que a IL-1 β , IL-6, TNF- α e mediadores lipídicos de prostaglandina E2 (PGE2) que estimulam macrófagos e induzem alterações no tecido conjuntivo e matriz extracelular. Entretanto, outros estudos como o de Lappin et al. demonstraram o envolvimento também das citocinas da via humoral e da resposta imune Th2, sendo as células envolvidas nesta resposta muito mais abundantes nas lesões periodontais. Segundo Miasaki et al as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10, por exemplo, estão envolvidas na ativação e proliferação de linfócitos B e, em última análise, na produção de IgG e IgA específicas aos micro-organismos que causam a infecção. Dessa forma, é o fator nuclear κ B (NF- κ B), o fator de transcrição proteico responsável por iniciar a transcrição de várias citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão, como: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 entre outros, que pode ser regulado por numerosas espécies reativas de oxigênio, sendo essa regulação transcricional, importante no desenvolvimento da inflamação mediada por citocinas. (Miyasaki, 1991)

Citocinas e quimiocinas estão envolvidas na imunopatogênese da doença periodontal por induzir a migração seletiva de distintos tipos celulares e por promover a manutenção de subtipos de leucócitos específicos nos tecidos periodontais. (Southerland et al., 2006)

2.3 Agentes farmacológicos com efeito antimicrobiano na cavidade oral

Os antimicrobianos são drogas capazes de conter e reduzir a proliferação de microrganismos patogênicos, dentre eles, podemos destacar as bactérias e fungos. A sua prescrição é indispensável na prática odontológica e cabe, portanto, o conhecimento acerca das suas repercussões orais, posologias e contra indicações. (Prado, *et al.*, 2021)

Segundo Oliveira, *et al* (2011), o uso dos antibióticos pode ser realizado de duas formas distintas: específica, se o microrganismo é conhecido e sua sensibilidade já foi identificada, ou empírica, quando se sabe o provável microrganismo causador da patologia, tomando por base a prevalência em causar infecção em determinado local. Quanto à ação biológica, classificam-se em:

- Bactericidas: Penicilinas, Cefalosporinas, Amoniglicosídeos (gentamicina).
- Bacteriostáticos: Cloranfenicol, Eritromicina. Quanto ao espectro de ação, classificam-se em:
 - Pequeno espectro: Gram positivos: Penicilinas naturais, Penicilinas bio sintéticas e semissintéticas.
 - Ampla espectro: Cefalosporinas, Cloranfenicol, Tetraciclina.

A aplicação tópica de agentes antimicrobianos também é uma opção de tratamento, especialmente quando existem áreas localizadas de exsudação e bolsas profundas que não responderam adequadamente ao tratamento mecânico e sistêmico, além disso, essa é uma alternativa viável para os pacientes que tenham intolerância a administração sistêmica do antibiótico . Na aplicação local, os agentes farmacológicos podem ser biodegradáveis ou não, dependendo do material envolvido na sua concepção. (Almeida et al., 2014)

2.4 Naltrexona

Naltrexona é um fármaco análogo sintético da oximorfona cuja estrutura química consiste no 17-(cyclopropylmethyl)-4,5 α -epoxy- 3,14-dihydroxymorphinan-6-one. Este fármaco vem sendo comercializado sob uma variedade de nomes de marcas, incluindo Adepend, Antaxone, Celupan, Depade, Nalorex, Narcoral, Nemexin, Nodict, Revia/ReVia, Trexan, Vivitrex e Vivitrol. Também é comercializado em combinação com bupropiona (naltrexona/bupropiona) como Contrave, e ainda pode ser associado em sua formulação com morfina (morfina/naltrexona) denominada Embeda.

A naltrexona vem sendo amplamente utilizada como um potente e não seletivo antagonista do receptor de opióides e como tratamento para a dependência de opióide, que em dosagens típicas, bloqueia significativamente a atividade nos receptores opióides mu e delta, bem como (em menor extensão) nos receptores opióides kapa. Entretanto, exerce seus efeitos em humanos por meio de pelo menos dois mecanismos receptores distintos. Além do efeito antagonista sobre opióides mu e outros receptores opióides, a naltrexona simultaneamente tem um efeito antagonista

em receptores não opióides (receptor Toll-like 4 ou TLR4) que são encontrados em macrófagos como a microglia. É pela via do antagonista não opióide que se que o LDN exerce seus efeitos antiinflamatórios. A hipótese mais prevalente afirma que a indução de um bloqueio de opióide pequeno e transitório levará o corpo a compensar, regulando positivamente os opióides endógenos e os receptores de opióides. (Younger . et al,.2014)

O efeito da regulação positiva da naltrexona temporária pode ter múltiplos impactos na saúde e na qualidade de vida, incluindo analgesia endógena aumentada e repressão de fatores imunológicos críticos. Além do efeito antagonista sobre opióides mu e outros receptores opióides, a naltrexona simultaneamente tem um efeito antagonista em receptores não opióides (receptor Toll-like 4 ou TLR4) que são encontrados em macrófagos como a microglia. É pela via do antagonista não opióide que se pensa que o LDN exerce seus efeitos antiinflamatórios. Microglia são células imunes do sistema nervoso central que são ativadas por uma ampla gama de gatilhos . Uma vez ativada, a microglia produz fatores inflamatórios e excitatórios. (Younger et al., 2014).

Para facilitar o desenvolvimento de programas clínicos, seja uma nova molécula ou uma variação nas condições de comercialização de uma molécula conhecida (por exemplo, uma nova indicação ou uma nova formulação), existe um quadro comum para avaliação. De um antibacteriano, o «Guia para avaliação de medicamentos indicados no tratamento de infecções bacterianas».Visão geral dos antibacterianos - Doenças infecciosas - Manuais MSD edição para profissionais (msdmanuals.com) Estudos in vitro relevantes incluem, entre outros, a avaliação da atividade bactericida, a caracterização da possível sinergia ou antagonismo do efeito pós-antibacteriano e, para alguns antibacterianos, a determinação da taxa de seleção de mutantes resistentes. Durante os ensaios clínicos, é fundamental que seja realizada uma avaliação microbiológica. A caracterização microbiológica da infecção bacteriana deve ser feita com amostras obtidas antes (ou dentro de uma janela estritamente aceitável) da administração da primeira dose do antibacteriano. Sempre que possível, métodos de semeadura e identificação de microrganismos e isolamento, bem como testes de sensibilidade em laboratórios centrais, devem ser padronizados. (Navas et al., 2014)

2.5 Naltrexona em baixas dosagens-LDN

Atualmente, a naltrexona tem sido utilizada em baixa dose (até 5 mg/dia) no tratamento de dor crônica e doenças autoimunes, sendo essa terapia, conhecida como baixa dose de naltrexona (*LDN, do inglês, low dose naltrexone*), uma prática de uso *off-label*, que compreende a utilização de fármaco para condição diversa da que foi desenvolvido e aprovado. No entanto, essa prática começou na década de 1980 (1985), quando o médico Bernard Bihari utilizou LDN para tratar imunodepressão de pacientes com HIV. A partir desse evento, o uso *off-label* da LDN emergiu como uma farmacoterapia promissora para o tratamento de doenças autoimunes, tumores malignos, doenças inflamatórias intestinais e dermatológicas, quadros muitas vezes acompanhados de dor crônica. A LDN apresenta efeito paradoxal em relação a doses usuais, pois promove analgesia e efeito anti-inflamatório. É interessante ressaltar que o mecanismo farmacológico da naltrexona em baixa dose ainda não está totalmente elucidado. (Schmidt et al., 2022)

A via da beta-endorfina na regulação imune: Modulação de naltrexona da regulação imune e tratamento de doenças autoimunes. Estudos recentes mostraram que a concentração de BE nas células sanguíneas circulantes é dramaticamente baixa em doenças reumáticas como artrite, lúpus e gota, com correlações inversas significativas entre BE e fator reumatóide e taxa de sedimentação de eritrócitos e, portanto, a probabilidade de inflamação. Os níveis de BE foram tão baixos quanto 1/8 a 1/4 do normal em outras doenças autoimunes, incluindo fibromialgia, doença de Crohn, esclerose múltipla, enxaqueca crônica, cefaleias e endometriose. Um teste piloto preliminar de 4,5 mg de naltrexona para a doença de Crohn, concluído na Penn State em 2005, produziu resultados promissores. Em 3 meses 89% dos pacientes obtiveram redução significativa dos sintomas e melhora nas medidas de qualidade de vida, e 67% entraram em remissão. Esses resultados foram mantidos após 4 semanas sem naltrexona. (Brown, et al., 2008a, 2009b)

Recentemente, Oliveira et al., (2018), em um estudo realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, concluiu que a Naltrexona em baixas dosagens foi capaz de reverter parcialmente a hiperalgesia do nervo infraorbital, e eficácia no tratamento da neuralgia trigeminal em ratos, e o tratamento modulou os

níveis centrais de BDNF e da IL-10, confirmando o papel desses moduladores no processo de dor, demonstrando que a Naltrexona pode ser uma alternativa terapêutica para tratamento da neurragia trigeminal.

Kim et al, (2020), em sua revisão da literatura sobre a LDN evidenciou seu mecanismo de ação na modulação da neuroinflamação, especificamente as células gliais, e sugeriu, diante dos dados obtidos novos estudos práticos com o uso da LDN.

Em baixas doses (até 5 mg/dia) a naltrexona também atua como modulador glial, mais especificamente via antagonismo de receptor Toll like 4 (TLR4). Esse receptor está presente na micróglia, que compõe cerca de 70% do sistema nervoso central. Seu bloqueio pela LDN inibe a liberação de citocinas e a sinalização macrófaga Toll-like (TRL4) da micróglia, com supressão da liberação de citocinas pró-inflamatórias, substância P, óxido nítrico, glutamato, e diminuição da expressão do receptor de quimiocina e da molécula de adesão. (Schmidt et al., 2022)

Em suma, a naltrexona em baixas doses apresenta uma abordagem segura e promissora para a prevenção e/ou tratamento de muitas doenças autoimunes e variantes de câncer, bem como potencialmente várias doenças virais (por exemplo, AIDS) e neurológicas (esclerose múltipla) que são exacerbadas pela imunidade comprometida. O potencial do LDN para modular os sistemas opióides e imunológicos produz um campo muito amplo para experimentação clínica, bem como novas direções de pesquisa para fortalecer as evidências científicas de ligações entre opióides e sistemas imunológicos na regulação de vários processos de doenças. Existem razões sólidas para acreditar que o LDN também pode promover estados emocionais positivos através da amplificação opióide endógena de afeto e energia positivos. De uma perspectiva psiquiátrica, a facilitação de opióides endógenos deve aliviar a depressão, uma vez que, até certo ponto, esse problema multifacetado reflete a capacidade reduzida de sentir prazer. Evidências também existem para resiliência contra estresse cardiovascular e para aprimoramento específico do sistema de recompensa para exercícios sabores palatáveis risos , sexo , vínculo social e até mesmo o efeito placebo das expectativas positivas. (Brown, et al,2008a, 2009b)

Em um momento de reforma imperativa dos cuidados de saúde, a perspectiva de tantas novas contribuições para a supressão de doenças e qualidade de vida por um medicamento genérico apresenta desafios e

oportunidades significativos para o governo, a comunidade de pesquisa médica, a indústria farmacêutica e a gestão de saúde. (Brown, *et al*, 2008a, 2009b)

Devido ao mecanismo de ação da Naltrexona em baixas doses induzir o bloqueio transitório aumentando a síntese e liberação de opióides, a Naltrexona tem sido utilizada *off-label* para o tratamento da dor e inflamação em diversas doenças crônicas como fibromialgia, doença de Chron e esclerose múltipla. (Patten *et al*, 2018).

Younger & Mackey (2009) avaliaram, em pacientes com diagnóstico de fibromialgia a utilização da Naltrexona comparado a placebo. Este agente químico em baixa dose reduziu os sintomas da fibromialgia em com uma redução superior a 30% dos sintomas em relação ao placebo. Além disso, os estudos laboratoriais mostraram que os limiares de dor mecânica e de calor foram melhorados pela droga. Os efeitos colaterais (incluindo insônia e sonhos vívidos) foram raros e descritos como menores e transitórios. A taxa de hemossedimentação basal previu mais de 80% da variação na resposta à droga. Indivíduos com taxas de sedimentação mais altas (indicando processos inflamatórios gerais) tiveram a maior redução dos sintomas em resposta à naltrexona em baixa dose. Concluíram que a naltrexona em baixa dose pode ser uma alternativa de tratamento altamente tolerável e barato para a fibromialgia. De acordo com os dados obtidos no estudo:

1) O efeito supressor demonstrado da naltrexona na atividade de citocina pró inflamatória produzida centralmente; e 2) a sobreposição de sintomas entre fibromialgia e comportamentos de doença induzidos por citocinas, hipotetizamos que o LDN reduziu com sucesso os sintomas da fibromialgia. Resposta clínica (melhoria de 30%) na gravidade dos sintomas da fibromialgia autorrelatada em relação ao placebo. Também foi verificado que o LDN aliviou vários sintomas específicos (por exemplo, dor, fadiga e dificuldade para dormir) e diminuiu a sensibilidade à dor em testes sensoriais quantitativos de limiares de dor mecânica, térmica e fria. Para testar essas hipóteses, realizaram um ensaio clínico piloto de LDN para o tratamento da fibromialgia, usando um estudo cruzado, controlado por placebo, simples-cego. Cada participante do estudo seguiu o mesmo cronograma: linha de base (2 semanas), placebo (2 semanas), LDN (8 semanas) e washout (2 semanas). Na fase inicial, foram obtidos auto-relatos diários da gravidade dos sintomas, mas nenhuma cápsula foi administrada. Nas fases

placebo e LDN, as cápsulas foram consumidas por via oral diariamente e as medidas diárias dos sintomas foram coletadas. Na fase de eliminação, nenhuma cápsula foi administrada e os participantes continuaram a completar todas as medidas do estudo. O tempo total no estudo para cada participante foi de 14 semanas. Os participantes participaram de sessões de laboratório a cada 2 semanas, totalizando oito visitas.

Younger *et al.* (2013), em estudo subsequente, observaram uma redução significativamente maior da dor basal naqueles que tomaram naltrexona em baixa dose do que naqueles que tomaram placebo (redução de 28,8% versus redução de 18,0%; $P = 0,016$). A naltrexona em baixas doses também foi associada à melhora da satisfação geral com a vida ($P = 0,045$) e à melhora do humor ($P = 0,039$), mas não à melhora da fadiga ou do sono. Trinta e dois por cento dos participantes preencheram os critérios de resposta (definidos como uma redução significativa na dor mais uma redução significativa na fadiga ou problemas de sono) durante a terapia com naltrexona em baixa dose, em contraste com uma taxa de resposta de 11% durante a terapia com placebo ($P = 0,05$).

Hutchinson *et al.* (2008), iniciaram estudos baseados em abordagens genéticas, sugeriram que o receptor toll-like 4 (TLR4) pode ser um receptor chave para iniciar a ativação microglial. Em 2008, realizaram um estudo que estendeu essa ideia farmacologicamente, mostrando que o TLR4 é fundamental para a manutenção da dor neuropática após lesão por constrição crônica do nervo ciático (ICC). A dor neuropática estabelecida foi revertida por antagonistas do receptor TLR4 administrados por via intratecal derivados de lipopolissacarídeos. Além disso, concluíram que a sinalização neurônio-glia através de TLR4 é importante não apenas para iniciar a dor neuropática, como sugerido anteriormente, mas também para manter a dor neuropática estabelecida.

A naltrexona e a naloxona são antagonistas opióides clássicos. Toljan, K. *et al.*, (2018), em sua revisão sistemática, citaram como estes fármacos utilizados em doses substancialmente inferiores às padrão, exercem farmacodinâmica diferente. A naltrexona em baixa dose (LDN), considerada em uma dose diária de 1 a 5 mg, demonstrou reduzir a resposta inflamatória glial por meio da modulação da sinalização do receptor 4 do tipo Toll, além de regulação positiva sistêmica da sinalização opióide endógena por bloqueio transitório do receptor opióide. Relatos clínicos de LDN demonstraram possíveis benefícios em doenças como fibromialgia, doença de

Crohn, esclerose múltipla, síndrome da dor regional complexa, doença de Hailey Hailey. Tem sido útil no controle pós-operatório da analgesia, reduzindo a necessidade da quantidade total de opióides após a cirurgia, bem como melhorando certos efeitos colaterais do tratamento relacionado aos opióides. Os receptores Toll-like (TLRs) são receptores de reconhecimento de padrões transmembrana (PRRs) que iniciam sinais em resposta a diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs)

. As respostas das células a ligantes bem definidos para TLR não permitidos ou liberados de bactérias, vírus e outros invasores patógenos têm sido mais extensamente estudadas em células imunes, particularmente células de células imunes e macrófagos. No SNC, a microglia expressa vários TLRs diferentes que, quando ativados por PAMPs, induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e TNF α . A microglia pode ser ativada durante o sistema hematológico sem que a barreira seja permitida a atravessar a circunferência do BHE e/ou macroglia em órgãos. Alternativamente, macrófagos e/ou citocinas circulantes podem passar pela barreira e interceptar patógenos invasores no cérebro e/ou células microgliais ativadas. (Kobaiashi, 2016)

Tendo em vista o papel dos microrganismos orais na causa e na patogênese das doenças orais e sistêmicas, é fundamental melhorar a proteção oral contra os patógenos e manter o equilíbrio dinâmico da microecologia oral. Compreender as interações entre as comunidades microbianas é a chave para combater os patógenos orais. (Zhang Y et al., 2018)

Sendo assim, objetivando enriquecer o conhecimento do mecanismo de ação das baixas doses de naltrexona, com uma nova visão em uso na Odontologia, este estudo piloto proposto busca elucidar o mecanismo de ação das baixas doses de naltrexona, por meio da avaliação in vitro dos efeitos da Naltrexona em baixa dosagem (LDN) sobre micro-organismos da cavidade oral.

3 PROPOSIÇÃO

Esta pesquisa consiste em estudo piloto para averiguar o papel da Naltrexona em baixas dosagens (menores que 5 mg/ml) na atividade de patógenos orais (aeróbios), anaeróbios (em desenvolvimento) e de linhagens de células epiteliais (queratinócitos), do tecido conjuntivo (fibroblastos) e de defesa (macrófagos) por meio de análises bioquímicas de determinação de concentração inibitória mínima (CIM); concentração microbicida mínima (CMM), e citotoxicidade por meio do teste MTT.

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho será avaliar com testes *In vitro* a atividade antimicrobiana, sob micro-organismos aeróbios, bem como a citotoxicidade do fármaco naltrexona, verificando um possível reposicionamento farmacológico.

3.2 Objetivos específicos

a. Avaliar a atividade antimicrobiana da naltrexona sob culturas planctônicas dos micro-organismos aeróbios *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, recorrentes em infecções de interesse médico-odontológica.

b. Avaliar a citotoxicidade da naltrexona sobre queratinócitos humanos HaCat, fibroblastos humanos TFF-1 e monócitos humanos THP-1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fármaco Naltrexona

O fármaco foi obtido da empresa Ultrafarma na concentração de 50 mg/mL onde foi ressuspenso em água destilada estéril, produzindo a solução mãe da droga. A solução foi diluída em 10 concentrações, sendo elas: 2,5 μ M (1,1 μ g/mL), 4,8 μ M (2,2 μ g/mL), 9,7 μ M (4,4 μ g/mL), 19 μ M (8,9 μ g/mL), 39 μ M (17,8 μ g/mL), 78 μ M (35,5 μ g/mL), 156 μ M (71 μ g/mL), 312 μ M (142 μ g/mL), 625 μ M (284 μ g/mL), 1250 μ M (568 μ g/mL), (Corrigir as concentrações conforme os gráficos) aplicando sobre os testes antimicrobianos e citotoxicidade

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do fármaco

A avaliação antimicrobiana foi realizada sob espécies aeróbias.

A avaliação da atividade antimicrobiana do fármaco foi avaliada sobre cepas de referência (ATCC - American Type Culture Collection) de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). As cepas foram provenientes do Laboratório de Anaeróbios do ICT Unesp.

4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida Mínima (CMM) para os aeróbios

Para a determinação da CIM e CMM foi utilizado o protocolo M7-A9, segundo a CLSI, que discorre sobre o método de microdiluição em caldo em bactérias aeróbias. Para isso, inicialmente foram preparadas as suspensões bacterianas, a partir de culturas crescidas em ágar Brain Heart Infusion - BHI (Himedia, Mumbai, India) com 24 horas de incubação a 37°C. As colônias foram diluídas em solução salina estéril (0,9%) e após as suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro (Micronal B582, São Paulo, Brasil) na concentração de 10^6 UFC/mL.

A diluição da solução mãe do fármaco, foi realizada em microlacas de 96 poços de fundo chato. Para isso 100 µl/poço do caldo BHI (bactérias) ou RPMI (Levdura) foram dispensados em 10 poços de cada grupo experimental, em seguida 100 µl do fármaco foram adicionados apenas no primeiro poço de cada grupo, de onde foram realizadas 10 diluições seriadas. Os testes foram realizados em duplicata.

Após o preparo das diluições, os grupos experimentais receberam a adição de 100 µl/poço da suspensão padronizada dos micro-organismos, com posterior incubação da placa de microtitulação por 24 h/ 37°C. Passado o período de incubação foi realizada a verificação da turbidez dos poços, onde o primeiro poço que contivesse a menor concentração do extrato e não apresentasse turvação, indicativo da ausência de crescimento microbiano, seria selecionado como a CIM.

A CMM foi determinada a partir da semeadura de alíquotas retiradas da microplaca de 96 poços, onde a alíquota com menor concentração do extrato que não apresentasse crescimento de colônias em ágar BHI com 48 h de incubação a 37°C seria determinada como Concentração microbicida mínima.

4.4 Testes em células

Foram realizadas as análises da atividade citotóxica sob as células de linhagem de Queratinócitos humanos (HaCat), fibroblastos humanos TFF-1 e monócitos humanos THP-1, ambas provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ).

A metodologia utilizada foi a mesma para os três tipos de células, em testes feitos separadamente, em datas diferentes.

As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e mantidas em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica e 5% de CO₂.

Durante o processo de expansão celular o meio de cultivo foi substituído a cada 48 h e a partir do momento em que se for observado o estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, as mesmas foram repassadas para frascos de cultivo maiores ou utilizadas no teste.

Após expansão celular, as linhagens de Fibroblastos e queratinócitos foram desagregados do assoalho do frasco de cultura, com auxílio da tripsina. As células suspensas foram transferidas para um tubo de centrifugação (Sarstedt, Numbrecht, Alemanha) e submetidas a centrifugação por 5 min a 3000 rpm, promovendo assim a remoção do meio de cultivo consumido, seguido pela substituição por meio de cultivo fresco. Os monócitos por serem células não aderentes apenas foram removidos do frasco de cultivo e submetidos ao mesmo processo de centrifugação.

4.5 Avaliação da citotoxicidade do fármaco Naltrexona em queratinócitos humanos HaCat, fibroblastos humanos TFF-1 e monócitos humanos THP-1

A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio do teste colorimétrico de MTT, avaliando a atividade enzimática celular. Para tanto, as células foram transferidas para microplacas de 96 poços (TPP) na concentração de 2×10^4 células viáveis e cultivadas em 200 μ L de meio DMEM + 10% SFB. Após as placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO₂) por 24 horas para a aderência celular. Os monócitos humanos (THP-1) foram estimulados com Phorbol na concentração de 1 μ g/mL para promoção da transformação celular em macrófagos e consequentemente promoção da adesão celular.

Passado o período de incubação, o sobrenadante foi descartado, e as células foram expostas aos tratamentos com as concentrações do fármaco variando de 2,5 mg/ml a 4 μ g/mL. Como controle negativo foi utilizado apenas a aplicação do meio de cultivo. Após, os tratamentos foram descartados e os poços lavados por 3 vezes com PBS (Phosphate Buffer Saline) (Cultilab, Brasil) para retirar células afetadas pelos tratamentos. Em seguida, foi verificada a atividade metabólica da cultura celular, utilizando a solução de MTT, preparada a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma, Missouri, EUA) em 1 mL de DMEM + 10% SFB. A solução foi transferida para as microplacas de 96 poços no volume de 100 μ L/poço, seguido pela incubação ao abrigo da luz (37°C, com 5% de CO₂) por 4 h. Posteriormente a solução foi

descartada e 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) foram adicionados à placa para expor os cristais de formazina produzidos por células viáveis. Após incubação de 10 minutos e agitação em shaker, por igual período, a absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular empregando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Atividade metabólica} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

Onde:

DO Grupo Tratado = densidade óptica obtida das leituras dos poços que receberam tratamento com o fármaco;

DO Grupo Controle = densidade óptica obtida das leituras dos poços que não receberam tratamento com o fármaco, considerando estes valores como 100% de viabilidade celular.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana da naltrexona sobre culturas planctônicas dos micro-organismos aeróbios:

Os resultados expressos na tabela mostram que, perante a cultura pura de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* não houve presença de concentração inibitória mínima CIM bem como também não houve concentração microbicida mínima CMM, resultando em ausência de ação antimicrobiana do fármaco Naltrexona na concentração máxima testada de 2,5 mg/mL.

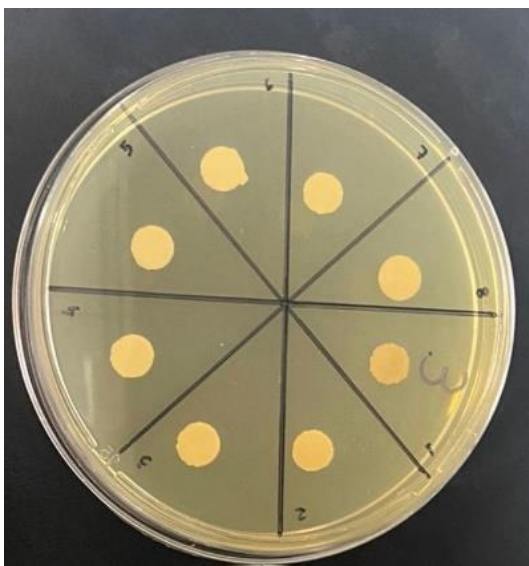
Tabela1- Concentração Inibitória mínima e concentração microbicida mínima para os microrganismos aeróbios testados

MICROORGANISMO	CIM	CMM
Staphylococcus aureus	Ausente	Ausente
Pseudomonas aureaginosa	Ausente	Ausente
Candida albicans	Ausente	Ausente

Legenda: Concentração Inibitória mínima e concentração microbicida mínima para os microrganismos aeróbios testados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

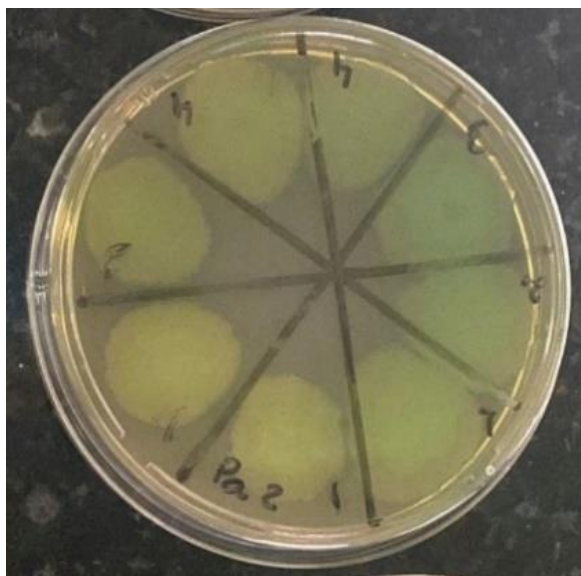
Figura 1- *Streptococcus aureus*



Legenda: *Streptococcus aureus* expostas ao fármaco.

Fonte: Elaborado pelo autor.

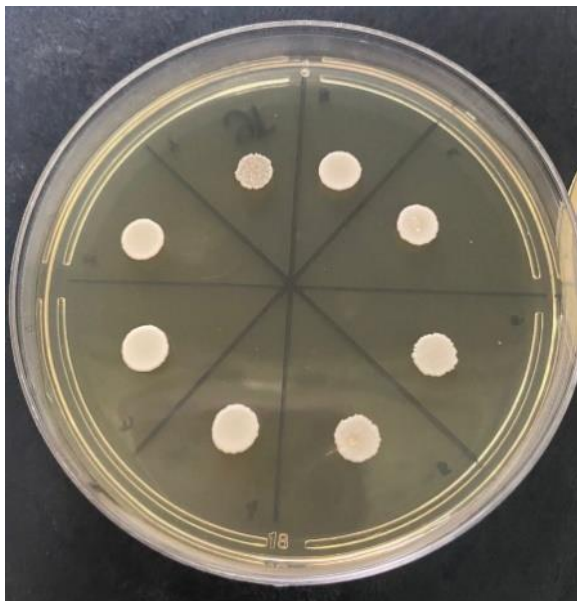
Figura 2 - *Pseudomonas aureaginosa* expostas ao fármaco



Legenda - *Pseudomonas aureaginosa* expostas ao fármaco

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 - *Candida albicans*

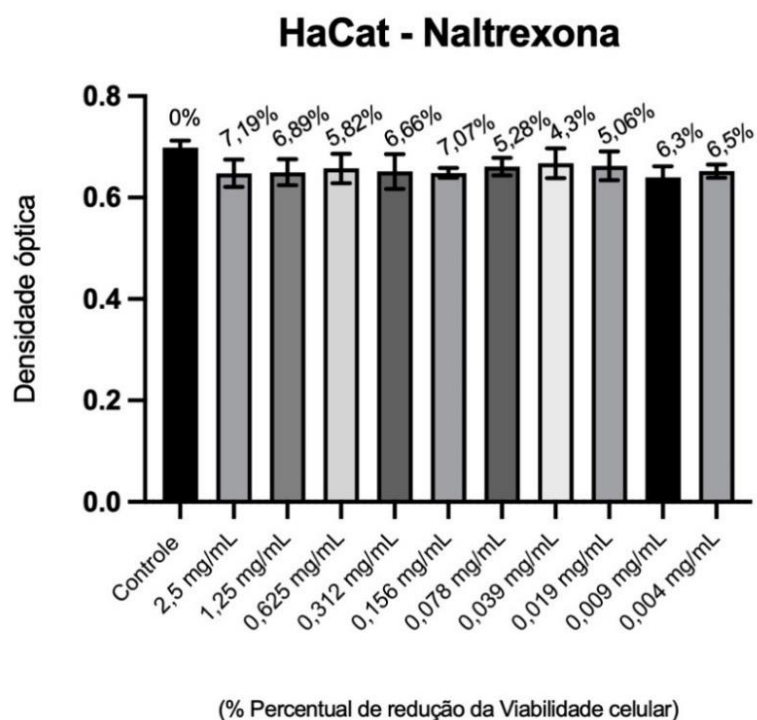


Legenda - *Candida albicans* expostas ao fármaco.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade *in vitro*) da Naltrexona sobre queratinócitos humanos HaCat.

A aplicação do fármaco Naltrexona, mesmo na concentração mais elevada de 2,5 mg/ml, demonstrou que não houve reação citotóxica frente a linhagem de queratinócitos humanos, conforme demonstrado no gráfico abaixo:

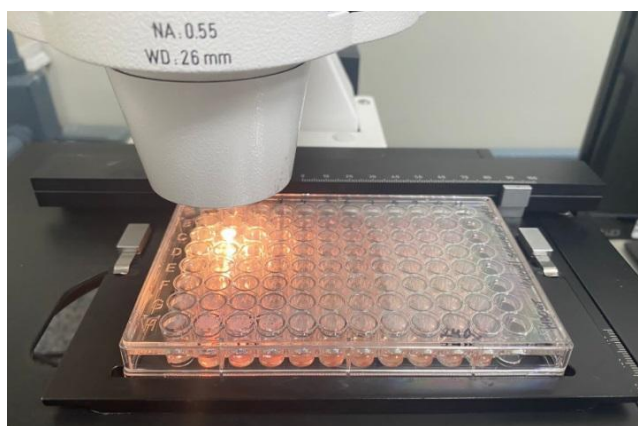
Gráfico 1 – Células HaCat na presença de diferentes concentrações de Naltrexona



Legenda- as células HaCat na presença de diferentes concentrações de Naltrexona

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura - 4. Avaliação com microscópio.



Legenda:.. Avaliação com microscópio para análise das células viáveis

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 - Foto da imagem microscópica das células HaCat no grupo controle onde as células não haviam sido expostas a Naltrexona, seguida da imagem microscópica após exposição à concentração de 5,0 mg do fármaco e foto da imagem microscópica das células HaCat após exposição à 2,5 mg de

Naltrexona, respectivamente. As células foram avaliadas em 5 minutos e em 24 horas, demonstrando viabilidade celular de mais de 90%.



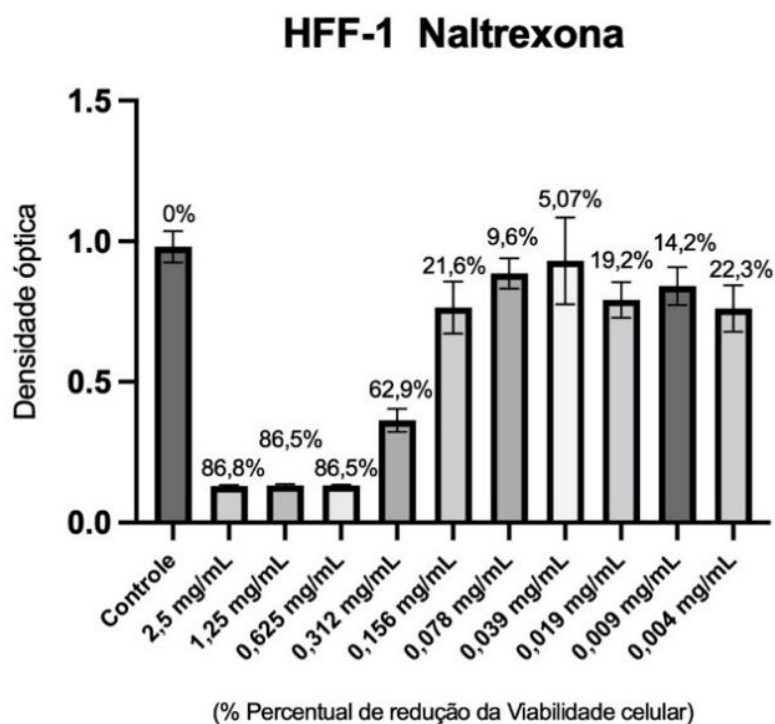
Legenda: Controle, concentração de 5 mg/ml, concentração de 2,5 mg/ml

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade *in vitro*) da Naltrexona sobre Fibroblastos humanos

A avaliação qualitativa da viabilidade celular do fármaco Naltrexona, para as concentrações mais elevadas (acima de 0,312 mg/ml), demonstrou uma redução na viabilidade celular, e abaixo da concentração de 0,156 mg/mL não houve redução da viabilidade celular. Resultando em reação citotóxica, apenas nas concentrações mais elevadas, conforme demonstrado no gráfico abaixo:

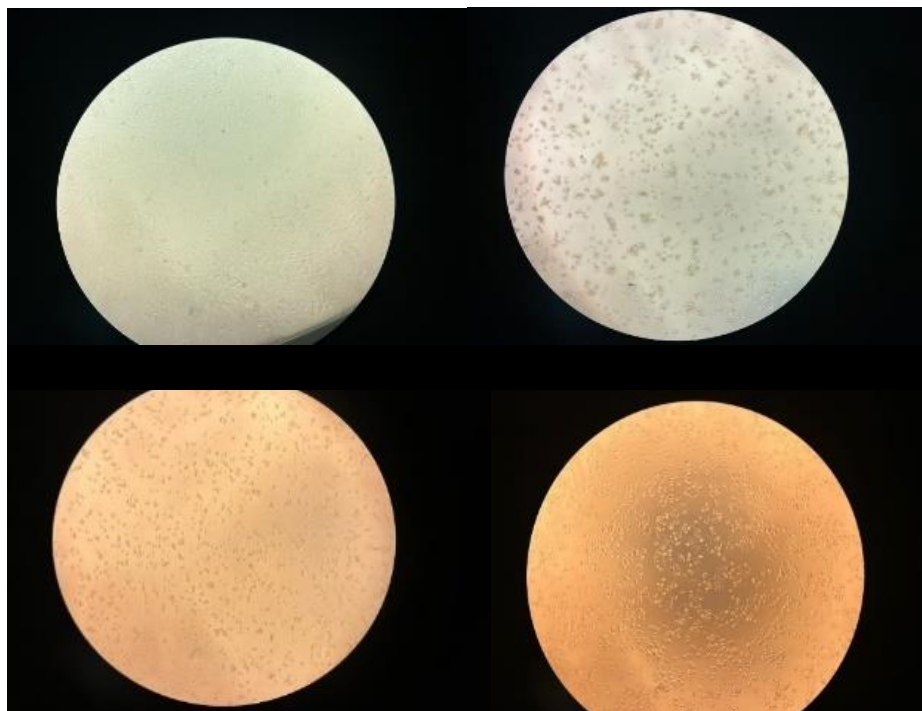
Gráfico 2 - Taxas de viabilidade celular do Fibroblastos expostos às diferentes concentrações de Naltrexona.



Legenda: Taxas de viabilidade celular do Fibroblastos expostos às diferentes concentrações de Naltrexona.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Fibroblastos expostos à diferentes concentrações de Naltrexona



Legenda: Fibroblastos expostos à diferentes concentrações de Naltrexona Imagem microscópica dos fibroblastos grupo controle. - Imagem microscópica dos fibroblastos expostos ao fármaco na 1ª concentração, e demonstrando mudança na morfologia das células e queda da viabilidade celular. – Fibroblastos expostos às 2ª e 3ª concentrações, demonstrando alterações morfológicas e desagregação celular.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figua 7 - 4ª concentração, 5ª concentração e 6ªconcentração



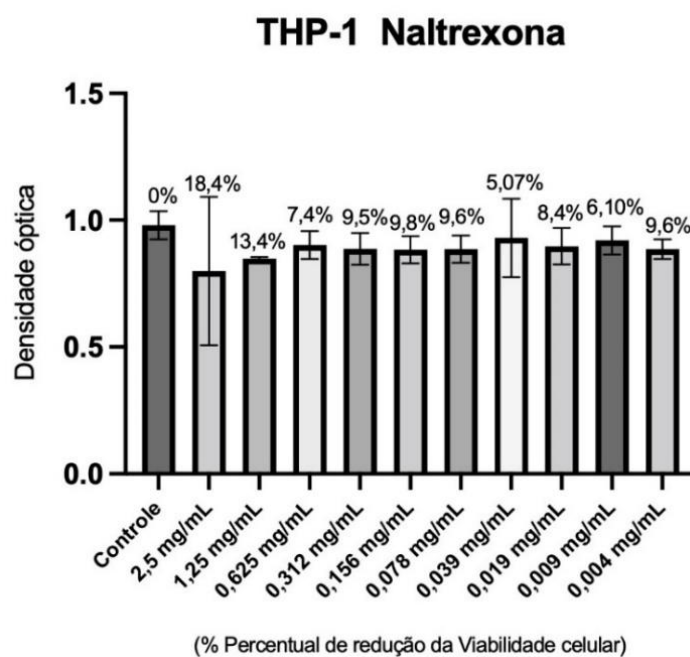
Legenda:-4ª concentração, 5ª concentração e 6ªconcentração.- – Fibroblastos expostos à concentrações mais baixas do fármaco, sem alterações morfológicas observáveis e com viabilidade celular acima de 80%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade in vitro) da Naltrexona sobre monócitos humanos THP-1:

A avaliação qualitativa da viabilidade celular do fármaco Naltrexona, para as concentrações mais elevadas (2,5 e 1,25 mg/ml), demonstrou que não houve reação citotóxica, não apresentando mudança na coloração, e crescimento celular com viabilidade acima de 90%, conforme demonstrado no gráfico abaixo:

Gráfico 3 - Taxas de viabilidade celular monócitos (THP1), expostos às diferentes concentrações de Naltrexona.



Legenda: Taxas de viabilidade celular monócitos (THP1), expostos às diferentes concentrações de Naltrexona.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A Naltrexona é um clássico antagonista opióide, prescrito na dose de 50mg por dia para tratamento de desordens de dependência química como álcool, hipnoanalgésicos, ou abuso de drogas, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1984 (Schumacher et al; 2015). Todavia em doses substancialmente mais baixas, entre 1 a 5mg por dia (LDN), apresentam efeitos distintos ou farmacodinâmica diversa de sua indicação clínica, mostrando efeitos potencialmente benéficos ao organismo no tocante a resposta inflamatória, modulação da dor, processo imunológico, reparação tecidual, proliferação celular (devido sua ação antineoplásica), ou na melhora da qualidade de vida como um todo. (Brown et al., 2009; Younger et al., 2014; Toljan et al, 2018, Lie et al., 2018)

Embora a utilização de LDN ainda seja considerada ações *off label*, bem como seus mecanismos celulares, ainda não serem totalmente esclarecidos, existem várias evidências de sua atividade sobre os receptores Toll-like (TLRs), que desencadeiam vias de sinalização específicas no organismo que resultam na modulação da resposta imune, inflamatória, ou mesmo de proliferação celular (Selfridge et al., 2015; Qu et al. 2021). Estes receptores são altamente conservados filogeneticamente (invertebrados e vertebrados) (Hughes & Piontkivska, 2008; Coscia et al. 2011) e expressos em diversos tecidos no organismo como sistema imune, vascular, fígado, osso, medula óssea, sistema nervoso, inclusive gânglio trigeminal, estando envolvido no processo de dor em infecções odontológicas (Wadachi & Hargreaves, 2006).

Devido a presença de vários fenótipos celulares na cavidade bucal, envolvidos nos processos inflamatórios e infecciosos que acometem o periodonto e estruturas adjacentes, especialmente de patógenos orais, avaliamos a ação da LDN em cepas patogênicas prevalentes na microbiota oral: *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa* e *Candida albicans* e também em algumas linhagens celulares que atuam na modulação e do desenvolvimento processos degenerativos locais; e ao mesmo tempo, favorecer o processo de reparo destes tecidos, reduzindo a inflamação e dor que se submete o paciente a tratamentos odontológicos mais invasivos. Desta forma, avaliar se a utilização da LDN pode representar um possível agente adjuvante no tratamento periodontal como solução irrigadora ou como colutorio bucal.

Como não se observa na literatura, nenhum trabalho voltado para este fim, portanto este trabalho é inédito, buscou-se inicialmente avaliar a toxicidade em células humanas e viabilidade celular das cepas aeróbias *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aureaginosa* e *Candida albicans* na presença de baixas concentrações de Naltrexona, a fim de observar se este agente químico interfere diretamente na atividade e viabilidade nestes espécimes comensais, e verificar um possível efeito modulatório sobre as mesmas. Entretanto não observamos nenhum efeito inibitório (tóxico) em todos os microrganismos testados do presente estudo e, portanto sem efeito direto deste agente químico sobre tais cepas aeróbias, estando em andamento à avaliação de cepas anaeróbias, que serão adicionadas no futuro.

O fato de não induzir efeito antimicrobiano, nas doses testadas, não exclui a possibilidade de modulação de produtos bacterianos que interferem no desenvolvimento e na agressividade do dano aos tecidos, e que são alvos dos receptores Toll-Like presentes em fibroblastos, células epiteliais (revestimento) e de macrófagos (defesa do tecido do hospedeiro).

Assim verificamos o efeito da Naltrexona em células epiteliais, queratinócitos, nas mesmas concentrações de Naltrexona utilizadas nos microrganismos em cultura celular do presente estudo, constatando que não há inviabilidade ou toxicidade celular, nem alteração de proliferação celular conforme relatado por Lee & Elston (2019). Baker et al. (2003) observaram que os queratinócitos epidérmicos na pele normal expressam constitutivamente TLR1, TLR2 e TLR5, enquanto TLR3 e TLR4 foram, na maioria dos casos, pouco detectáveis. Porém Song et al (2002) relataram o aumento da expressão do receptor toll-like 4 em queratinócitos durante infecção bacteriana induzido por LPS. Devido ao nosso modelo experimental não avaliar a expressão genica desta proteína plasmática desta linhagem celular, não podemos inferir que ocorreu variação significativa na atividade celular deste fenótipo na presença de Naltrexona.

Tendo em vista que os receptores Toll-like (TLRs) são receptores de reconhecimento de padrões transmembrana (PRRs) que iniciam sinais em resposta a diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). As respostas das células a ligantes bem definidos para TLR ou liberados de bactérias, vírus e outros invasores patógenos têm sido mais extensamente estudadas em células imunes, particularmente células de células imunes e macrófagos, (Ferraz et al., 2011). Não

endereço a questão de alvos ou componentes estruturais de microrganismos que são alvos da interação de diferentes proteínas receptoras TLRs, a qual exerce afinidade pela Naltrexona. Todavia nossos achados não mostraram citotoxicidade ou alteração celular em aplicação direta na Naltrexona, nas doses estudadas do presente estudo.

Por outro lado, também não se evidenciou redução significativa destas células (proliferativa) ue pudessem sinalizar um possível efeito negativo no processo de reparo tecidual, na presença de Naltrexona. Em células com *turn over* muito acentuado, como no caso de célula neoplásica, foi observado que baixa doses de Naltrexona promovem redução da síntese de DNA, diminuição da viabilidade e outras funções em diversos tipos de neoplasias malignas, estando também envolvida na remodelação do sistema imune, invasão tumoral e toxicidade química. (Couto et al, 2021; Qu et al. 2021). Assim, levando se em conta nossos achados, a possível utilização de Naltrexona na cavidade oral, nas concentrações utilizadas neste estudo, não apresentou efeito deletério significativo que possa contraindicar sua utilização tópica no epitélio dos tecidos da cavidade bucal.

Posteriormente, afim de se a avaliar, a ação da Naltrexona em possível ferramenta terapêutica odontológica, particularmente no processo de reparo e de defesa, verificou-se a presença deste agente biologicamente ativo (nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente) em linhagens de células de fibroblastos humanos e macrófagos, respectivamente.

Em relação aos fibroblastos, observou-se um comportamento bifásico e variável, na presença de LDN, doses mais altas foram mais tóxicas, enquanto doses mais baixas reduziram o efeito citotóxico (vide gráfico 2).

Segundo Immonnen et al (2013) O reparo de feridas envolve uma série de fases sobrepostas que incluem inflamação, proliferação e remodelação tecidual, sendo que a última fase requer meses para uma cicatrização adequada. Atrasos em qualquer um desses processos podem resultar em infecção, ulceração crônica. Segundo os autores, a utilização de Naltrexona tópica acelera o processo de reparo, acelera a taxa de cicatrização e estimula a expressão de fatores antigênicos no tecido de granulação de ratos diabéticos, em relação aos animais controle que receberam solução salina. Outros estudos também demonstraram efeitos positivos no processo de reparo sinalizando que a Naltrexona tópica pode ser uma alternativa segura e

eficaz no tratamento de feridas, especialmente relacionadas com diabetes, que apresentam conhecido retardo neste processo celular e ainda tais efeitos estão relacionados com aumento da expressão de fatores de crescimento tecidual (Zagon et al. 2002; McLaughlin et al. 2013a, 2017b; Immonen et al. 2013a, 2014b; Dunn et al 2021).

Apesar de várias evidências favoráveis a sua utilização clínica no tratamento periodontal, nossos achados não mostraram efeitos positivos na atividade de fibroblastos da presente pesquisa, ao contrário, nas doses de 2,5mg até 0.312mg/ml a Naltrexona foi tóxica para esta linhagem celular, não se mostrando benéfica em utilização tópica como tratamento adjuvante periodontal. Contudo no fracionamento das doses, com a progressiva redução de sua concentração, reduziu-se o efeito citotóxico, e que, portanto doses mais baixas são mais indicadas na utilização deste fármaco no tratamento periodontal.

Toljan & Vrooman (2018) relataram que doses ainda mais baixas de Naltrexona; denominadas *very low doses* (VLDN) e *ultra low doses* (ULDN), podem estar relacionadas ao mecanismo bimodal apresentado por este fármaco na modulação tecidual de diversas condições patológicas. Para tal, são consideradas concentrações abaixo de 1µg, o que corresponderia a concentrações muito mais baixas do que foram utilizadas na presente pesquisa (<10⁻⁶mM). Portanto se faz necessário avaliar o efeito da Naltrexona em linhagem de fibroblastos de origem periodontal em concentrações mais baixas do que avaliadas no presente estudo a fim de observar um possível estímulo proliferação celular ou ainda dosar a síntese proteica concomitante para se comprovar um aumento da atividade deste fenótipo relacionado com o processo de reparo tecidual (síntese de colágeno).

Já em relação aos macrófagos utilizados neste estudo, não apresentaram alterações significativas em relação à citotoxicidade ou inviabilidade celular. Diaz & Amaru (2022) relataram que a administração de naltrexona em alta dose (50mg/Kg/dia) apresenta efeito cicatrizante e anti-inflamatório em úlceras traumáticas orais na mucosa jugal de ratos wistar. Essa dose também reduziu o número de polimorfonucleares no primeiro dia ($p<0,05$), mononucleares no terceiro dia ($p<0,05$), aumentou o número fibroblastos ($p<0,001$) e o percentual de colágeno total ($p<0,05$) no dia sete e quatorze. Ainda, o limiar nociceptivo foi significativamente menor nos animais tratados com Naltrexona 50mg/kg/dia, ($p<0,01$) ao longo dos quatorze dias. Não se observaram efeitos

adversos significativos com as doses avaliadas. A Naltrexona em dose alta (50mg/kg/dia), segundo os autores, melhorou o curso temporal cicatricial de úlceras traumáticas orais através de redução da resposta inflamatória e promoção da colagênese, além de diminuir o limiar nociceptivo.

Não foi explorada, neste trabalho, a modulação da dor, o qual consiste um potencial adicional significativo para a utilização da Naltrexona como adjuvante no tratamento periodontal, entretanto no modelo utilizado deste estudo, em todas as doses utilizadas ocorreu uma tendência negativa de viabilidade celular, comparado ao controle. Segundo Yi et al. (2016) o macrófago constitui uma importante célula imune inata desempenha um papel vital na manutenção de um ambiente interno estável e na defesa imunológica. Dentre as principais funções do macrófago incluem: quimiotaxia, fagocitose e endocitose, secreção de fatores que modulam as respostas inflamatórias e a morte microbiana; todos os quais são essenciais para a homeostase, defesa imunológica e reparo tecidual. Os pesquisadores relataram que em doses adequadas a Naltrexona poderia estimular funções de macrófagos e aumentar a atividade de fagocitose, estimular a produção de citocinas IL-12 e TNF- α . Pretendemos no futuro mensurar algumas citocinas relacionadas com a atividade de macrófagos para estabelecer uma relação causal da presença de Naltrexona e resposta inflamatória.

Finalmente, acreditamos que somados nossos resultados, no presente estudo, a Naltrexona não apresentou toxicidade para os microrganismos avaliados, em todas as doses utilizadas, não apresentou toxicidade para linhagem de queratinócitos e macrófagos em cultura celular, entretanto constatamos que há possibilidade de uma dose ideal a ser utilizada em fibroblastos. São necessários mais estudos para averiguar sua ação em microrganismos anaeróbicos, dosagens de citocinas e síntese proteica na presença deste agente biológico ativo, estudos em modelos de animais induzidos com doença periodontal, previamente a sua utilização em doença periodontal em humanos, embora existam fortes evidências de seu benefício em diversos tecidos no organismo.

7 CONCLUSÕES

Reportando-se aos resultados da presente pesquisa, apesar de seu uso já preconizado via sistêmica, a Naltrexona em todas as concentrações de LDN – Naltrexona em baixa dosagem, estudadas *in vitro* não mostrou efeito antimicrobiano. Concentrações mais elevadas, a ação direta nas células de fibroblastos apresentou citotoxicidade considerável e foi significativamente reduzida na presença de concentrações abaixo de 0,312 mg/ml, demonstrando assim a importância e a ação de doses baixas para a modulação e ação em células. Nas células de queratinócitos humanos e monócitos/macrófagos, não houve citotoxicidade em todas as concentrações utilizadas no presente estudo.

Embora forte indicação de seu uso terapêutico em diversas condições patológicas, como foi revisto na literatura, inclusive para modulação da doença periodontal, não constatado a ação nos microrganismos testados, porém, não se exclui a possibilidade de uma modulação desses fenótipos *in vivo*, devido a modulação imune que a LDN causa no indivíduo, sendo assim, necessários mais estudos para conclusão do estudo.

8 REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro; Elsevier; 8. ed; 2015. 536p LILACS ID: lil-766648

Agarwal D, Toljan K, Qureshi H, Vrooman B. Therapeutic value of naltrexone as a glial modulator. *GLIA* 2017; 65(51):E103-E578.

Baker BS, and others, Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis, *British Journal of Dermatology*, Volume 148, Issue 4, 1 April 2003, Pages 670–679, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05287.x>

Brandão J & Garcia, Stefanny & Zago, Patrícia & Tognetti, Valdineia. (2023). O uso de antibióticos como adjuvante no tratamento da periodontite: the use of antibiotics as an adjunct in the treatment of periodontitis. *Revista Ensaios Pioneiros*. 6. 10.24933/rep.v6i2.259.

Brown N, Panksepp J. Low-dose naltrexone for disease prevention and quality of life. *Med Hypotheses*. 2009 Mar;72(3):333-7.doi: 10.1016/j.mehy.2008.06.048. Epub 2008 Nov 28. PMID: 1904118. doi:10.1016/j.mehy.2008.06.048

Canas PG, Khouly I, Sanz J, et al. Effectiveness of systemic antimicrobial therapy in combination with scaling and root planing in the treatment of periodontitis: a systematic review. *J Am Dent Assoc*.v.146, n.3, p.150-63, 2015

Coscia MR , Giacomelli S, Oreste U. Toll-like receptors: an overview from invertebrates to vertebrates *ISJ* 8: 210-226, 2011

Couto DR, Fernandes J, Dumê. Low Doses Naltrexone: The Potential Benefit Effects for its Use in Patients with Cancer, *Current Drug Research Reviews* 2021; 13(2) . <https://dx.doi.org/10.2174/2589977513666210127094222>

DÍAZ. LC. Administração de naltrexona em alta dose apresenta efeito cicatrizante e anti-inflamatório em úlceras traumáticas orais na mucosa jugal de ratos wistar. 2022. 65 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/68920>. Acesso em: 19 out. 2022.

DT Graves, JD Corrêa, TA Silva. A microbiota oral é modificada por doenças sistêmicas - *J Dent Res*. Fevereiro de 2019; 98 (2): 148-156. Publicado online em 25 de outubro de 2018. doi: 10.1177 / 0022034518805739

Dunn J, Yi L, Banov F, Sebastian D, Banov D. A topical naltrexone formulation for surgical wound healing: A case report. *Journal of cosmetic dermatology*, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 838–841, 2021. DOI: 10.1111/JOCD.13604. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32652808/>

El-Zayat, SR, Sibaii, H. & Mannaa, FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent* 43 , 187 (2019). doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2

Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995; 6 (2):85-90

Estrela C, Sydney G.B, Bammann L.L., Felipe Jr. O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, v. 2, n.4,p. 29-36, 1994.

Feres M, Figueiredo LC, Soares GM et al. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontol* 2000. v.67, n.1, p.131-86, 2015.

Ferraz EG; Silveira BBB, Sarmiento VA, Santos JN. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. *RGO, Rev. gaúch. odontol.* (Online) [online]. 2011, vol.59, n.3, pp. 483-490. ISSN 1981-8637

Hajishengallis G, Wang M, Bagby GJ, Nelson S. Importance of TLR2 in early innate response to acute pulmonary infection with porphyromonas gingivalis in mice. *J Immunol.* 2008;181:4141-49

Hutchinson,M.R et al. Reversão não estereosseletiva da dor neuropática por naloxona e naltrexona: envolvimento do receptor toll-like 4 (TLR4).*European Journal of Neuroscience-FENS-* doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06321.x

Hughes, A.L., Piontkivska, H. Functional diversification of the toll-like receptor gene family. *Immunogenetics* 60, 249–256 (2008). doi.org/10.1007/s00251-008-0283-5

Immonen JA, Zagon IS, Lewis GS, McLaughlin PJ. O tratamento tópico com o antagonista opioide naltrexona acelera a fase de remodelação da cicatrização de feridas de espessura total em ratos diabéticos tipo 1. *Biologia Experimental e Medicina* . 2013;238(10):1127-1135. doi: 10.1177/1535370213502632

Immonen, JA., Zagon IS, McLaughlin PJ. Selective blockade of the OGF-OGFr pathway by naltrexone accelerates fibroblast proliferation and wound healing. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), [S. l.], v. 239, n. 10, p. 1300–1309, 2014. DOI: 10.1177/1535370214543061 pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25030485/.

Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:637-646

Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standart? *Periodontol* 200. 1997;15:55-62

Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, et al. Expressão quantitativa de RNA mensageiro de receptores Toll-like e interferon- α 1 na gengivite e periodontite. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:398-402.

Kawai T1, Akira S. O papel dos receptores de reconhecimento padrão na imunidade inata: atualização sobre receptores Toll-like. *Nat Immunol*. 2010 Maio;11(5):373-84. DOI: 10.1038/ni.1863. Epub 2010 Abr 20. PMID: 20404851 DOI: 10.1038/ni.1863

Kim,P.S.; Fishman,M.A.. Baixa dose de naltrexona para dor crônica: atualização e revisão sistêmica. *Rev. Técnicas Anestésicas no Tratamento da Dor* .26 de agosto de 2020

Kobayashi ,N. Suzuki, H. Sato NAH.; Akimoto,S.; Wakayama,K.; Kumagai,H.; Ikeda,Y.; AkazawaH.; Komuro, I.; Izumi, Isobe, M. Toll-like receptor 4 signaling has a critical role in Porphyromonas gingivalis-accelerated neointimal formation after arterial injury in mice Hypertension Research (2016) 39, 717–722

Kopra E, Lahdentausta. L., Pietiäinen M, et al.. Systemic Antibiotics Influence Periodontal Parameters and Oral Microbiota, But Not Serological Markers. *Front Cell Infect Microbiol*. v.24, n.11, p.774, 2021.

Lie, M.R.K.L., van der Giessen J., Fuhler, G.M. et al. Low dose Naltrexone for induction of remission in inflammatory bowel disease patients. *J Transl Med* 16, 55 (2018). doi.org/10.1186/s12967-018-1427-5

McLaughlin, PJ.; Immonen JA.; Zagon IS. Topical naltrexone accelerates full-thickness wound closure in type 1 diabetic rats by stimulating angiogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, [S. l.], v. 238, n. 7, p. 733–743, 2013. a. DOI: 10.1177/1535370213492688. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23788174/>.

McLaughlin PJ, Cain JD, Titunick MB, Sassan JW, Zagon I. Topical Naltrexone Is a Safe and Effective Alternative to Standard Treatment of Diabetic Wounds. *Advances in Wound Care*. Volume: 6 Issue 9: September 1, 2017; p..279-288.<http://doi.org/10.1089/wound.2016.0725>

Navas, A.L., García,N, ERA., Gea, JMLS. Procedimento para a autorização de introdução no mercado de um agente antibacteriano. *Doenças infecciosas e microbiologia clínica*. Vol 32,edição 8, 2014. Pág 529-532. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X14000159>

Nawarat Wara-aswapati, Anek Chayasadam, Rudee Surarit, Waranuch Pitiphat, Jason A. Boch, Toshiyuki Nagasawa, Isao Ishikawa, Yuichi Izumi Induction of Toll-Like Receptor Expression by Porphyromonas gingivalis *Journal of Periodontology* Volume84, Issue7 July 2013 Pages 1010-1018

Oliveira ILM. Ferreiral ACA, Mangueirall DFB. Antibiotics of odontological use: information to correct practice. *Odontol. Clín.-Cient. (Online)* vol.10 no.3 Recife Jul./Set. 2011. ISSN 1677-3888

Perrella FA, Rovai ES, De Marco AC, Santamaria MP, Feres MG, Figueiredo LC, Kerbauy WD, Amorim JBO. Clinical and Microbiological Evaluation of Povidone-Iodine 10% as an Adjunct to Nonsurgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. *Journal of the International Academy of Periodontology*, v. 18, p. 109, 2016.

Prado,V.F.F., Gomes JTP, Souza KVC. Agentes antimicrobianos mais utilizados na Odontologia: uma revisão de literatura.DOI:10.33448/rsd-v10i14.21668 *Research, Society and Development*, v. 10, n. 14, e95101421668, 2021 (CC BY 4.0) ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i14.21668>

Qu NA, Meng Y, Handley MK, Wang C, Shan F. Preclinical and clinical studies into the bioactivity of low-dose naltrexone (LDN) for oncotherapy, *International Immunopharmacology*, Volume 96, 2021, 107714, ISSN 1567-5769, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107714>.

Rigette Lee, Dirk M. Elston, The uses of naltrexone in dermatologic conditions,*Journal of the American Academy of Dermatology*, Volume 80, Issue 6, 2019, Pages 1746-1752, ISSN 0190-9622, <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.12.031>.

Schröder NWJ, Meister D, Wolff V, Christan C, Kaner D, Haban V, Purucker P, Hermann C, Moter A, Göbel UB, Schumann RR. Chronic periodontal disease is associated with single-nucleotide polymorphisms of the human TLR-4 gene. *Genes Immun*. 2005;6:448-51

Schmidt MG, Torres ILS, Stahnke DN, Paniz VMV. Low-dose naltrexone (LDN): consumption trend in Brazilian capitals and the Federal District, 2014-2020. *TEMAS LIVRES • Ciênc. saúde coletiva* 28 (03) • Mar 2023 • <https://doi.org/10.1590/1413-81232023283.10392022>

Scorzoni L, Menezes R, Pereira TC, Oliveira OS, Ribeiro FC, Santos ELS, Fugisaki LRO, OLIVEIRA LD; Amorim JBO. Antifungal and anti-biofilm effect of the calcium channel blocker verapamil on non-albicans *Candida* species. *Anais da academia brasileira de ciências (online)*, v. 92, p. 1032, 2020.

Silva RCS, Nidia, Feres M. (2022). ÔMEGA-3 E ASPIRINA COMO ADJUVANTES NO TRATAMENTO PERIODONTAL: REVISÃO DE LITERATURA. *RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar* - ISSN 2675-6218. 3. e351295. 10.47820/recima21.v3i5.1295.

Smith JP, Bingaman SI, Ruggiero F,. Therapy with the opioid antagonist naltrexone promotes mucosal healing in active Crohn's disease: A randomized placebo-controlled trial. *Dig Dis Sci*. 2011;56:2088-2097. doi:10.1007/s10620-011-1653-7.

Song, Peter I., et al. "Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4." *Journal of investigative dermatology* 119.2 (2002): 424-432.

Schumacher, MA., Basbaum A, K. Naidu. "Opioid agonists & antagonists." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 13th ed.; Katzung, B., Trevor, A., Eds (2015): 531.

Selfridge, Brandon R., et al. "Structure–activity relationships of (+)-naltrexone-inspired toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists." *Journal of medicinal chemistry* 58.12 (2015): 5038-5052.

Stolze K. Elimination of Elizol 25% dental gel matrix from periodontal pockets. *Jornal Clin Periodontal*.1995; 22: 185-187

Toljan, K.; Vrooman, B. Low-Dose Naltrexone (LDN)—Review of Therapeutic Utilization. *Med. Sci.* **2018**, 6, 82. doi.org/10.3390/medsci60400

Wadachi, R., and K. M. Hargreaves. "Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection." *Journal of dental research* 85.1 (2006): 49-53.

Toljan, K.; Vrooman, B. Low-Dose Naltrexone (LDN)—Review of Therapeutic Utilization. *Med. Sci.* 2018, 6, 82. doi.org/10.3390/medsci60400

Wang, W., Deng, Z., Wu, H. et al. Uma pequena proteína secretada desencadeia uma resposta inflamatória dependente de TLR2/4 durante a infecção invasiva por *Candida albicans*. *Nat Commun* 10 , 1015 (2019). doi.org/10.1038/s41467-019-08950-

Yi Z, Guo S, Hu X, Wang X, Zhang X, Griffin N, Shan F. Functional modulation on macrophage by low dose naltrexone (LDN), *International Immunopharmacology*, Volume 39, 2016, Pages 397-402, ISSN 1567-5769, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.08.015>.

Younger, J.; Mackey, S., Os sintomas da fibromialgia são reduzidos pela naltrexona de baixa dose: um estudo piloto. *Pain Med.* 2009 May–Jun; 10(4): 663–672. Publicado online em 22 de abril de 2009. doi: 10.1111/j.526-4637.2009.00613.x

Younger, J.; Noor, N.; McCue, R.; Mackey, S., Baixa dose de naltrexona para o tratamento da fibromialgia: achados de um estudo cruzado pequeno, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, contrabalançado, avaliando os níveis diários de dor. *Pubmed. American College of Rheumatology*, 2013 fev;65(2):529-38. doi: 10.1002/art.37734.

Younger, J.; Parkitny, L., McLain, D., O uso de naltrexona em baixa dosagem (LDN) como um novo tratamento antiinflamatório para dor crônica -*Clin Rheumatol.* 2014; 33 (4): 451–459. Publicado online em 15 de fevereiro de 2014. doi: 10.1007 / s10067-014-2517-2

Zagon IS, McLaughlin PJ. Naltrexone modulates tumor response in mice with neuroblastoma. *Science.* 1983;221:671-673. doi:10.1126/science.6867737.

Zagon, IS, Jenkins, JB, Sassani, JW, Wylie, JD, Ruth, TB, Fry, JL & McLaughlin, PJ (2002). A naltrexona, um antagonista opioide, facilita a reepitelização da córnea em ratos diabéticos. *Diabetes* , 51 (10), 3055-3062.

Zandbergen D, Slot DE, Cobb CM, et al. The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *J Periodontol*.v.84, n.3, p.332-51, 2013.

Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Microbiota oral humana e sua modulação para saúde bucal - 2018 Mar;99:883-893. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.146. Epub 2018 Feb 20.

Zukin, R.S., Sugarman, J.R., Fitz-Syage, M.L., Gardner, E.L., Zukin, S.R., Gintzler, A.R. Naltrexone induced opiate receptor supersensitivity. *Brain research*, 245(2), 1982, 285-292.