

# RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 24/08/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**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, Sthaphylococcus 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 <sup>a</sup> ,5 <sup>a</sup> e 6 <sup>a</sup> 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- $\alpha$  – 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

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
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
<b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>31</b>
3.1 Objetivo Geral .....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Fármaco Naltrexona .....	32
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do fármaco .....	32
4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida 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
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
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
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>

<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
---------------------------	-----------

## 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

opioides 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 opioides 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, tímocitos 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.

## 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, Dumêt. 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, Sarmento 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- $\alpha$ 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.2016.08.015.3>

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.