



Universidade
Christus

**UNIVERSIDADE CHRISTUS
CURSO DE ODONTOLOGIA**

GABRIEL SANTOS SOUSA

**INFLUÊNCIA DA AMINOGUANIDINA NO PROCESSO CICATRICAL
DO SÍTIO DOADOR PARA ENXERTO GENGIVAL LIVRE EM RATAS**

FORTALEZA

2026

GABRIEL SANTOS SOUSA

INFLUÊNCIA DA AMINOGUANIDINA NO PROCESSO CICATRICAL DO SÍTIO
DOADOR PARA ENXERTO GENGIVAL LIVRE EM RATAS

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao curso de Odontologia da
Universidade Christus, como requisito
parcial para obtenção do título de bacharel
em Odontologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Dayrine Silveira
de Paula

FORTALEZA

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Centro Universitário Christus - Unichristus
Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha Catalográfica do
Centro Universitário Christus - Unichristus, com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S725i Sousa, Gabriel Santos.
 INFLUÊNCIA DA AMINOGUANIDINA NO PROCESSO
 CICATRICIAL DO SÍTIO DOADOR PARA ENXERTO
 GENGIVAL LIVRE EM RATAS / Gabriel Santos Sousa. - 2026.
 29 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro
Universitário Christus - Unichristus, Curso de Odontologia,
Fortaleza, 2026.

Orientação: Profa. Dra. Dayrine Silveira de Paula.
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.

1. Cicatrização. 2. Sítio doador. 3. Colágeno. I. Título.

CDD 617.6

GABRIEL SANTOS SOUSA

INFLUÊNCIA DA AMINOGUANIDINA NO PROCESSO CICATRICIAL DO SÍTIO
DOADOR PARA ENXERTO GENGIVAL LIVRES RATAS

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao curso de Odontologia da
universidade christus, como requisito
parcial para obtenção do título de bacharel
em Odontologia.

Orientador(a): Profa. Dra.
Dayrine Silveira de Paula

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dayrine Silveira de Paula (Orientador)
Universidade Christus (UNICHRISTUS)

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva
Universidade Christus (UNICHRISTUS)

Profa. Me. Joyce Ohana de Lima Martins
Universidade Christus (UNICHRISTUS)

Dedico este trabalho a Deus e a minha família
onde esteve presente em todos os momentos da minha
graduação

RESUMO

A aminoguanidina atua como um inibidor eficaz da NOS, especificamente da isoforma induzível da NO sintase (iNOS). Dessa forma, o objetivo desse estudo é avaliar a influência da aminoguanidina no processo cicatricial do sítio doador para o enxerto gengival livre em ratas. Para que seja possível realizar esse estudo, foi necessário um total de 80 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*). As ratas Wistar foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: um grupo controle submetido a remoção do tecido gengival do sítio doador e tratado diariamente com solução salina 0,1ml/kg por via subcutânea; e um grupo teste, submetido a remoção do tecido gengival do sítio doador e bloqueio farmacológico da iNOS com aminoguanidina 50mg/kg por via subcutânea diariamente e os subgrupos experimentais foram distribuídos por dias de eutanásia. Os animais foram eutanasiados, por sobredose de anestésica. As maxilas foram excisadas, descalcificadas e submetidas ao processamento no histotécnico para posterior, confecção de lâminas histológicas. Os resultados foram expressos como os valores médios \pm SE (erro padrão) e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no software GraphPad Prism 5.0. Acerca da contagem total de células sanguíneas, nos dias 7 e 14 foi possível observar uma redução significativa no grupo aminoguanidina em relação ao grupo controle. Semelhantemente, foi verificado no que se refere aos fibroblastos e miofibroblastos, nos dias 7, 14 e 27 houve um declínio significativo quando comparado ao grupo controle. Diferentemente, os mononucleares mostraram um aumento significativo nos dias 7, 14 e 28 no grupo aminoguanidina em relação ao grupo controle. Já os polimorfonucleares tiveram uma redução significativa nos dias 14 e 28 no grupo aminoguanidina quando comparado ao grupo controle. A imunexpressão do TNF- α , demonstrou um aumento significativo em todos os dias de avaliação, quando comparado ao grupo controle. Com isso, iNOS representa a principal fonte de NO nos tecidos durante o processo de reparo. A iNOS promove redução significativa da expressão proteica, transcricional e da atividade enzimática do iNOS, resultando em diminuição dos níveis locais de NO. Dessa forma, a aminoguanidina promoveu um processo inflamatório mais prolongado no sítio cirúrgico, resultando em menor deposição de fibroblastos e redução da formação de vasos sanguíneos.

Palavras-chave: cicatrização; sítio doador; colágeno

ABSTRACT

Aminoguanidine acts as an effective inhibitor of NOS, specifically the inducible isoform of NO synthase (iNOS). Therefore, the aim of this study is to evaluate the influence of aminoguanidine on the healing process of the donor site for free gingival grafts in rats. To carry out this study, a total of 80 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were required. The Wistar rats were randomly divided into two experimental groups: a control group subjected to removal of gingival tissue from the donor site and treated daily with 0.1 ml/kg saline solution subcutaneously; and a test group, subjected to removal of gingival tissue from the donor site and pharmacological blockade of iNOS with 50 mg/kg aminoguanidine subcutaneously daily. The experimental subgroups were distributed by euthanasia days. The animals were euthanized by anesthetic overdose. The maxillae were excised, decalcified, and processed using a histotechnician for subsequent preparation of histological slides. Results were expressed as mean values \pm SE (standard error) and subjected to the Shapiro-Wilk normality test. All analyses were performed adopting a 95% confidence level using GraphPad Prism 5.0 software. Regarding the total blood cell count, a significant reduction was observed in the aminoguanidine group on days 7 and 14 compared to the control group. Similarly, a significant decline in fibroblasts and myofibroblasts was observed on days 7, 14, and 27 when compared to the control group. Conversely, mononuclear cells showed a significant increase on days 7, 14, and 28 in the aminoguanidine group compared to the control group. Polymorphonuclear cells showed a significant reduction on days 14 and 28 in the aminoguanidine group when compared to the control group. TNF- α immunoexpression showed a significant increase on all evaluation days when compared to the control group. Therefore, iNOS represents the main source of NO in tissues during the repair process. iNOS significantly reduces protein expression, transcription, and enzymatic activity of iNOS, resulting in decreased local NO levels. Thus, it is concluded that aminoguanidine promoted a more prolonged inflammatory process at the surgical site, resulting in less fibroblast deposition and reduced blood vessel formation.

Keywords: wound healing; donor site; collagen

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Cirurgia de enxerto gengival livre	11
2.2 Cicatrização	11
2.3 Aminoguanidina	12
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo Geral	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Animais e desenho de estudo	14
4.2 Cálculo amostral	14
4.3 Grupos experimentais	14
4.4 Análise do peso corporal	15
4.5 Técnica cirúrgica	15
4.6 Eutanásia	15
4.7 Análise Sanguínea	15
4.8 Confecção de lâminas e análise histomorfométrica	16
4.9 Técnica de micro array de tecidos e ensaio imuno-histoquímico	16
4.9.1 Análise Estatística	17
5 RESULTADOS	18
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXO	29

1 INTRODUÇÃO

O enxerto gengival livre (EGL) constitui a técnica mais difundida para a indução de nova mucosa queratinizada. O enxerto autógeno é obtido mediante a exérese completa de um retalho da mucosa mastigatória, sendo subsequentemente transferido para um leito receptor no mesmo indivíduo. A região de coleta do tecido é denominada área doadora (Shibayama; Fugii 2000).

A estratégia clínica frequentemente adotada na área doadora para viabilizar um recobrimento radicular eficaz, em técnicas de enxertos não submersos, consiste no incremento da espessura do enxerto, visando preservar sua viabilidade sob condições avasculares iniciais. Todavia, o EGL apresenta desvantagens estéticas significativas, como a formação de tecido cicatricial volumoso e a discrepância cromática (combinação de cores desfavorável) em relação aos tecidos adjacentes (Sidhaethan, *et al.* 2022).

Diversas modalidades de cirurgias mucogengivais são descritas na literatura para o tratamento de recessões teciduais e da faixa insuficiente de gengiva queratinizada. Nesse contexto, a utilização do enxerto gengival livre demonstra potencial para substituir, de forma vantajosa, diversos outros procedimentos cirúrgicos da mesma natureza (Shibayama; Fugii 2000).

Ademais, a intervenção mucogengival voltada ao recobrimento radicular torna-se imperativa quando fatores como o comprometimento estético, a hipersensibilidade dentinária e a presença de lesões cervicais cariosas ou não cariosas representam queixas clínicas relevantes para o paciente (Deo, *et al.*, 2019).

A cicatrização de feridas constitui um processo fisiológico fundamental para a manutenção da integridade cutânea após a ocorrência de traumas (Wang, 2018). Trata-se de um mecanismo complexo e dinâmico, sustentado por uma miríade de eventos celulares que demandam coordenação precisa para a reparação eficiente do tecido lesionado. Eventuais desarranjos no comportamento celular durante esse processo comuns em quadros de diabetes ou no envelhecimento podem comprometer a reparação tecidual, culminando na formação de feridas crônicas de difícil resolução (Wilkson; Hardman, 2020).

A cicatrização fisiológica compreende três fases sucessivas e sobrepostas: inflamatória/hemostasia, proliferativa e remodelação. Imediatamente após a injúria tecidual, a exposição do subendotélio, do colágeno e do fator tecidual desencadeia a agregação plaquetária. Este evento resulta na degranulação e liberação de fatores quimiotáticos (quimiocinas) e fatores de crescimento (GFs), culminando na formação do coágulo (Wang, *et al.*, 2018).

A resposta inflamatória inata atua como a defesa primária contra a invasão patogênica no sítio da lesão. Tal resposta imune é deflagrada por sinais induzidos pelo trauma, tais como os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) liberados por células necróticas e padrões

moleculares associados a patógenos (PAMPs), provenientes de componentes bacterianos. Estes mediadores ativam células imunes residentes, incluindo mastócitos, células de Langerhans, células T e macrófagos, por meio da ligação a receptores de reconhecimento de padrão, induzindo as vias inflamatórias subsequentes (Wilkson; Hardman, 2020).

A fase proliferativa caracteriza-se pela intensa ativação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, que orquestram o fechamento da ferida, a deposição de matriz extracelular (MEC) e a angiogênese (Wilkson; Hardman, 2020). Nesse estágio, o tecido de granulação composto por proteoglicanos, ácido hialurônico, colágeno e elastina substitui o coágulo inicial. Diversas citocinas e fatores de crescimento participam ativamente desta fase, com destaque para a família do fator de crescimento transformador β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), a família das interleucinas (IL) e mediadores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (Wang, *et al.*, 2018).

Por fim, a etapa de remodelação exige um equilíbrio rigoroso entre a apoptose celular e a síntese de novos componentes teciduais. Nesta fase, são críticas a degradação gradual da MEC excedente e a substituição do colágeno tipo III (imaturo) pelo colágeno tipo I (maduro), conferindo maior resistência tensil ao tecido cicatricial (Wang, *et al.*, 2018).

A aminoguanidina, reconhecida como um inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Sua estrutura molecular é composta por dois grupos químicos distintos: o nitrogênio guanidino e a hidrazina. Atribui-se a este último a provável responsabilidade pela inibição seletiva da iNOS mediada pelo cloridrato de aminoguanidina (AG) (Farhad, *et al.*, 2021).

Investigações *in vitro* demonstraram que a expressão da iNOS em células inflamatórias é regulada por citocinas pró-inflamatórias, como o interferon-gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Em contrapartida, o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1) atua como o mais potente regulador desta enzima sob condições fisiológicas. O óxido nítrico (NO) desempenha um papel fundamental na cicatrização tecidual, exercendo funções críticas na síntese de colágeno e nos processos fibróticos. Nesse cenário, postula-se que a iNOS atue no leito da ferida sinalizando via TGF- β 1, o qual promove a ativação de fibroblastos para a produção exacerbada de colágeno (Abd el-aleem, *et al.*, 2020).

Contudo, sob condições inflamatórias e durante o reparo tecidual, a iNOS sintetiza elevados níveis de NO em macrófagos e outros tipos celulares. Esse processo ocorre de forma independente do cálcio e é desencadeado pela estimulação por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e citocinas inflamatórias, tais como a interleucina 1 beta (IL-1 β), o TNF- α e o IFN- γ (Farhad, *et al.*, 2021).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cirurgia de enxerto gengival livre

O enxerto gengival livre é o procedimento mais utilizado para indução de nova mucosa queratinizada. O enxerto gengival livre autógeno é obtido por meio da remoção completa de um retalho de mucosa mastigatória e transferido para outra região do indivíduo, essa região onde obtivemos o retalho é conhecida como área doadora (Shibayama; Fugii 2000).

A alteração da área doadora mais utilizada para obter um recobrimento radicular eficaz com enxertos não submersos é expandir a espessura do enxerto, tentando manter sua viabilidade em condição avascular. No entanto, uma desvantagem significativa do Enxerto Gengival Livre (FGG) é o tecido cicatricial formado devido ao volume do tecido, combinação de cores desfavoráveis (Sidhaethan, *et al.* 2022).

Várias cirurgias mucogengivais são descritas para a dimensão insuficiente da recessão dos tecidos moles e gengiva queratinizada (Deo, 2019). A utilização dos enxertos gengivais livres apresenta potencialidade para substituir, com vantagens, muitos procedimentos cirúrgicos mucogengivais (Shibayama; Fugii 2000).

A cirurgia mucogengival realizada para cobertura de recessão torna-se uma necessidade quando a estética, a sensibilidade dentinária e as lesões cervicais cariosas e não cariosas representam um problema. (Deo, *et al.*, 2019).

2.2 Cicatrização

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico importante para manter a integridade da pele após trauma (Wang, *et al.*, 2018). É um processo complexo e dinâmico apoiado por uma miríade de eventos celulares que devem ser coordenados para reparar eficientemente o tecido danificado. O desarranjo nos comportamentos celulares ligados à ferida, como ocorre com o diabetes e o envelhecimento, pode levar ao comprometimento da cicatrização e à formação de feridas crônicas que não cicatrizam (Wilkson; Hardman, 2020).

A cicatrização normal de feridas envolve três fases sucessivas, mas sobrepostas, incluindo hemostasia/fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação. Após uma lesão na pele, o subendotélio exposto, o colágeno e o fator tecidual ativarão a agregação plaquetária, que resulta na degranulação e liberação de fatores quimiotáticos (quimiocinas) e fatores de crescimento (GFs) para formar o coágulo (Wang, *et al.*, 2018).

A inflamação inata evoluiu como a defesa primária contra a invasão patogênica da ferida. Essa resposta imune é iniciada por sinais induzidos por lesão; padrões moleculares associados a danos (DAMPs) liberados por células necróticas e tecidos danificados e padrões

moleculares associados a patógenos (PAMPs) de componentes bacterianos. Esses PAMPs e DAMPs ativam células imunes residentes, como mastócitos, células de Langerhans, células T e macrófagos, ligando-se a receptores de reconhecimento de padrão para induzir vias inflamatórias a jusante (Wilkson; Hardman, 2020).

A fase proliferativa da cicatrização é caracterizada por extensa ativação de queratinócitos, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais para orquestrar o fechamento da ferida, deposição de matriz e angiogênese (Wilkson; Hardman, 2020). A ferida engloba fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. A matriz extracelular (MEC), incluindo proteoglicanos, ácido hialurônico, colágeno e elastina forma um tecido de granulação para substituir a formação original do coágulo. Muitos tipos de citocinas e GFs participam dessa fase, como a família do fator de crescimento transformador β (TGF- β , incluindo TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), família da interleucina (IL) e fatores de angiogênese (ou seja, fator de crescimento epidérmico vascular) (Wang, *et al.*, 2018).

A etapa de remodelação, que precisa de um equilíbrio preciso entre a apoptose das células existentes e a produção de novas células. A degradação gradual da MEC profusa e do colágeno tipo III imaturo e a formação do colágeno tipo I maduro são críticas nessa fase (Wang, *et al.*, 2018).

2.3 Aminoguanidina

A aminoguanidina, como um inibidor seletivo da enzima iNOS, foi avaliada em vários estudos desde 1992. Possui dois grupos químicos, a saber, nitrogênio guanidino e hidrazina. Este último é provavelmente responsável pela inibição seletiva de iNOS por cloridrato de aminoguanidina (AG) (Farhad, *et al.*, 2021).

Estudos *in vitro* mostraram que a expressão de iNOS em células inflamatórias é regulada pelas citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , e o TGF- β 1 que é a citocina mais potente reguladora de iNOS sob condições fisiológicas. O NO é crucial para a cicatrização de feridas e desempenha um papel importante na síntese de colágeno e fibrose. A iNOS pode estar exercendo sua ação na ferida, sinalizando através do TGF- β 1 que ativa os fibroblastos da ferida para produzir colágeno em excesso (Abd el-aleem, *et al.*, 2020).

No entanto, em condições inflamatórias e de cicatrização de feridas, a iNOS gera altos níveis de NO em macrófagos e algumas outras células após estimulação por lipopolissacarídeos bacterianos e citocinas inflamatórias, como interleucina (IL) 1 β , fator de necrose tumoral alfa e interferon-gama, independente do cálcio (Farhad, *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da aminoguanidina no processo cicatricial do sítio doador para o enxerto gengival livre em ratas.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar clinicamente e histologicamente a influência do tratamento com aminoguanidina no processo cicatricial do sítio doador para o enxerto gengival livre em ratas.

Analisar a contagem de células sanguíneas no tratamento da aminoguanidina no processo cicatricial do sítio doador para o enxerto gengival livre em ratas.

Investigar a imunexpressão da proteína do eixo TNF- α no tratamento da aminoguanidina no processo cicatricial do sítio doador para o enxerto gengival livre em ratas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e desenho de estudo

Trata-se de um estudo experimental laboratorial de caráter quantitativo, visando realizar análise macroscópica e histopatológica acerca da influência da aminoguanidina no processo cicatricial do sítio doador para enxerto gengival livre em ratas. Para isso, este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais da universidade christus com o parecer 005/23 e após aprovação todas as condutas para diminuição de dor, estresse, bem como sofrimento desnecessário foram conduzidas.

Todos os procedimentos foram realizados por um operador devidamente preparado e calibrado de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, conforme o guia de Princípios Internacionais de Pesquisas Biomédicas Envolvendo Animais.

4.2 Cálculo amostral

A fim de estimar a amostra necessária nos baseamos no estudo de Amaliya et al. (2019) que observou o processo de cicatrização do sítio doador de enxerto gengival livre em ratos. Após aplicação de extrato de ervas, quando comparado ao grupo controle não tratado (Média±DP = 20±2 versus 24±3), uma vez que o modelo experimental proposto apresenta perda possível perda de animais, acrescer-se-á 20% sobre esta amostra totalizando Dez animais por grupo de estudo (teste t de Student).

4.3 Grupos experimentais

Assim, um total de 80 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), com 3 a 5 semanas de vida, pesando ± 200 g, foram provenientes do biotério da Unichristus, foram mantidos em gaiolas, na hospedaria para animais do biotério. Durante o procedimento experimental, os animais permaneceram em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura 25 ± 2°C e umidade 55±10%) com fornecimento de água e ração específica à vontade.

Assim, ratas Wistar foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: um grupo controle submetido a remoção do tecido gengival do sítio doador e tratado diariamente com solução salina 0,1ml/kg por via subcutânea; e um grupo teste, submetido a remoção do tecido gengival do sítio doador e bloqueio farmacológico da iNOS com aminoguanidina 50mg/kg por via subcutânea diariamente e os subgrupos experimentais serão distribuídos por dias de eutanásia, perfazendo um total de 80 animais:

4.4 Análise do peso corporal

Os animais foram pesados diariamente, de acordo com os dias de eutanásia, para avaliação da variação da massa corpórea em balança de 10g de precisão.

4.5 Técnica cirúrgica

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina a 10% e xilazina 8%. A remoção do tecido gengival no palato duro foi realizada em uma dimensão de 10mmX4mm até a profundidade do periósteo usando uma lâmina 15c de aço inoxidável projetada para enxerto gengival e cirurgias periodontias. A gengiva foi separada por elevador periosteal (Amaliya, et al.,2019)

4.6 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados, por sobredose de anestésica. As maxilas foram excisadas cirurgicamente, armazenadas em formol neutro a 10% durante 24h para posterior confecção das lâminas histológicas (hematoxilina-eosina). O sangue dos animais foi coletado, para posterior contagem total e diferenciada de leucócitos.

4.7 Análise Sanguínea

Após anestesia com xilazina (10mg/kg) e quetamina (90mg/kg), foi coletado 2mL de sangue pelo plexo retro-orbital para análise hematológica e imediatamente armazenado em eppendorfs, contendo 0,2mL de solução 1% de ácido etileno-dimanino tetra-acético (EDTA) dissolvido em solução salina estéril 0,9%. Posteriormente, sobredose de xilazina (30mg/kg) e quetamina (240mg/kg) foi adicionalmente administrada para eutanásia. Uma gota de sangue foi disposta sobre uma lâmina de vidro para coloração por panótico rápido e análise hematológica. A leitura se deu em movimento de zigue-zague transversal ao tamanho da lâmina em direção da parte mais espessa para a parte menos espessa. Foram contados os números de cada um dos elementos sanguíneos celulares (neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos) até um total de 100 células contadas, obtendo-se, assim, a contagem diferencial de leucócitos sanguíneos.

Para contagem total de leucócitos foi manipulado individualmente de cada animal, 20µl de sangue juntamente com 380µl da solução de Turk, colocados em eppendorfs e submetidos ao vórtex. Posteriormente, o resultante foi colocado em uma câmara de Neubauer

e contabilizado os leucócitos totais presentes nos quadrantes das extremidades da câmara (Goes *et al.*, 2014).

4.8 Confeção de lâminas e análise histomorfométrica

As amostras colhidas foram fixadas em formol a 10% por 24 horas e posteriormente armazenadas em EDTA 10% para descalcificação por 60 dias. Após esse processo, foram desidratadas em banhos de etanol graduados (100 e 70%), limpos em xileno, embebidos em parafina e seccionados em série a 5 µm. Duas secções de cada ferida foram selecionadas aleatoriamente e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação em microscopia de luz. As lâminas foram analisadas no microscópio Olympus BX43 com aumento de 400×, e cinco fotomicrografias foram obtidas para contagem no software imageJ. Os parâmetros analisados foram: aumento mononuclear e polimorfonuclear, aumento de fibroblastos e vascularização (Firat *et al.*, 2014).

4.9 Técnica de micro array de tecidos e ensaio imuno-histoquímico

Todas as lâminas microscópicas foram analisadas e uma área circunferencial representativa de 2 mm de diâmetro cada (3,14 mm²) de cada amostra e será demarcada para a técnica Tissue Micro Array. Os blocos de parafina foram perfurados na área demarcada utilizando um Tissue Microarrayer (Quick-Ray UNITMA®) e foram transferidos para um bloco receptor de parafina contendo 70 cavidades circulares do mesmo diâmetro (2mm). Assim, os blocos de receptores de parafina contendo as áreas de interesse das hemimaxilas (região interdental) foram cortados em secções de 3 µm de espessura para serem colocadas em lâminas silanizadas.

As amostras foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas a recuperação de antígeno usando um tampão de citrato (pH 6,0). Para inativar a peroxidase endógena, as amostras foram incubadas (30 min) com H₂O₂ a 3% em solução tampão de fosfato (PBS), lavadas em PBS e incubadas durante a noite com anticorpos primários direcionados contra TNF-α.

Após lavagens em PBS, as amostras foram incubadas em Envision Plus HRP anti-IgG-coelho / camundongo por 45 min (pronto para uso; monoclonal; Dako® K4065), lavadas novamente em PBS e aplicado o cromogênio diaminobenzidina (Dako® K3469) por 5 min. A hematoxilina de Harris foi usada como contra-coloração (10 s), e as amostras foram desidratadas (usando etanol e xilol) e montadas usando um meio de montagem permanente

(Enthelam®). Secções paralelas de controle negativo serão tratadas com diluente de anticorpo em vez de um Ab primário.

As lâminas foram scaneadas por meio de um scanner de lâminas Motic DSAssistant(Motic VM V1 Viewer 2.0®) e as fotomicrografias foram exportadas para o software QuPath® para contagem do número de células imuno positivas.

4.9.1 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como os valores médios \pm SE (erro padrão) e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para comparações de dados paramétricos será realizado o teste 1-way-ANOVA/Bonferroni e para comparação dos dados não paramétricos será realizado o teste de Kruskal-Wallis/Dunn. Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no software GraphPad Prism5.0.

5 RESULTADOS

A contagem total de vasos sanguíneos, nos dias 7 e 14 foi possível observar uma redução significativa no grupo aminoguanidina em relação ao grupo controle. Semelhantemente, foi verificado no que se refere aos fibroblastos e miofibroblastos, nos dias 7, 14 e 27 houve um declínio significativo quando comparado ao grupo controle (Figura 1 e 2).

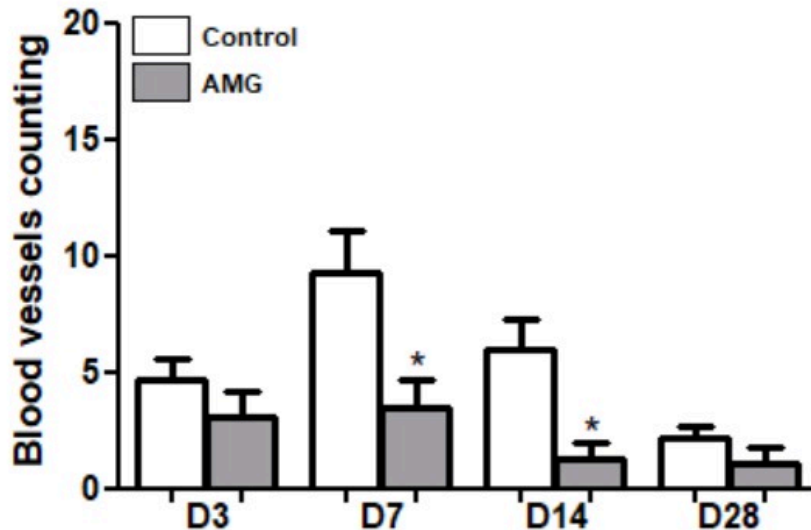


Figura 1: Avaliação contagem total de células sanguíneas nos dias 3, 7, 14 e 28 nos grupos aminoguanidina e controle ($P = 0,001$).

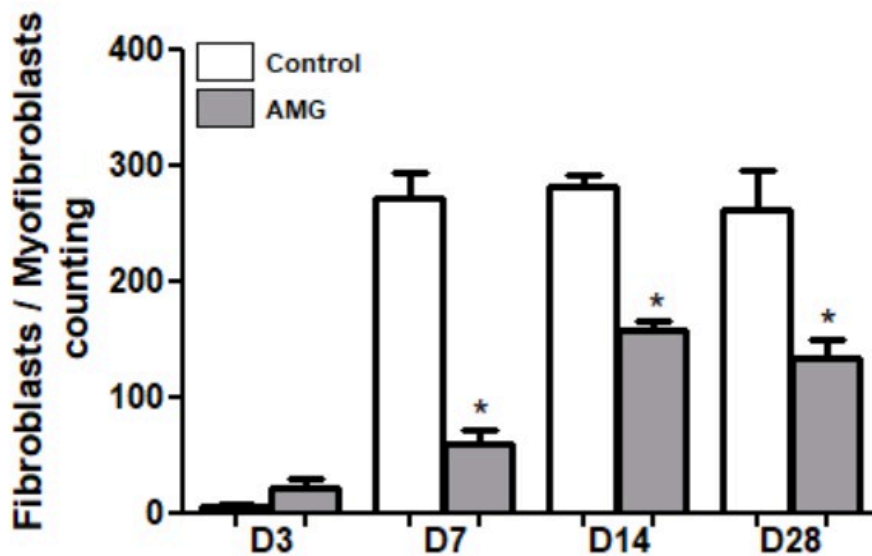


Figura 2: Avaliação de fibroblastos e miofibroblastos nos dias 3, 7, 14 e 28 nos grupos aminoguanidina e controle ($P < 0,001$).

Diferentemente, os mononucleares mostraram um aumento significativo nos dias 7, 14 e 28 no grupo aminoguanidina em relação ao grupo controle. Já os polimorfonucleares tiveram uma redução significativa nos dias 14 e 28 no grupo aminoguanidina quando comparado ao grupo controle (Figura 3 e 4).

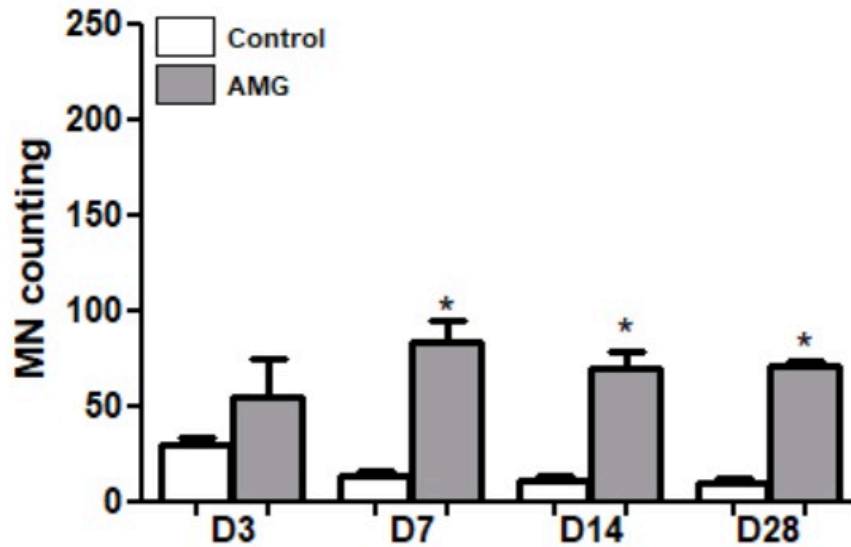


Figura 3: Avaliação de mononucleares nos dias 3, 7, 14 e 28 nos grupos aminoguanidina e controle ($P < 0,001$).

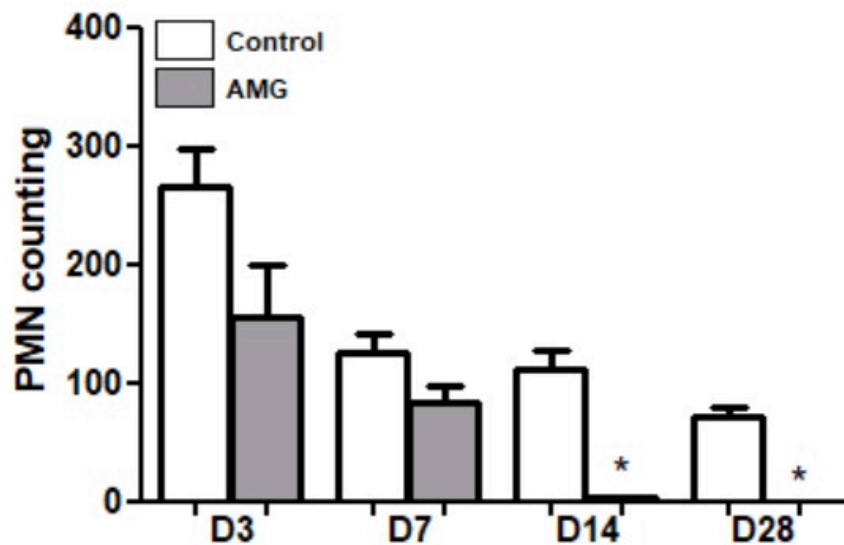


Figura 4: Avaliação de polimorfonucleares nos dias 3, 7, 14 e 28 nos grupos aminoguanidina e controle ($P < 0,001$).

A contagem total de leucócitos, no dia 28, foi possível observar um aumento significativo no grupo aminoguanidina em relação ao grupo controle. Semelhantemente, foi verificado no que se refere as contagens de linfócitos, no dia 28 houve um aumento significativo quando comparado ao grupo controle (Figura 5 e 6).

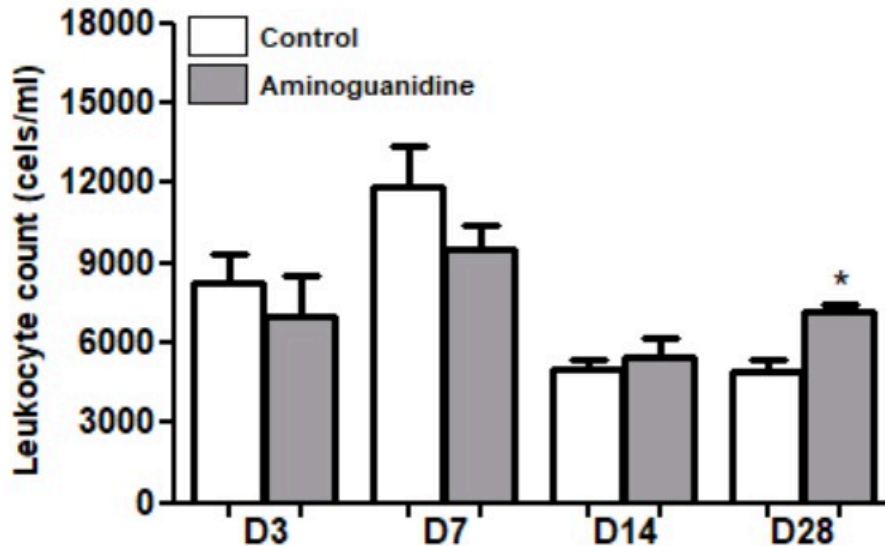


Figura 5: Avaliação de Leucócitos nos dias 3, 7, 14 e 28 nos grupos aminoguanidina e controle ($P < 0,001$).

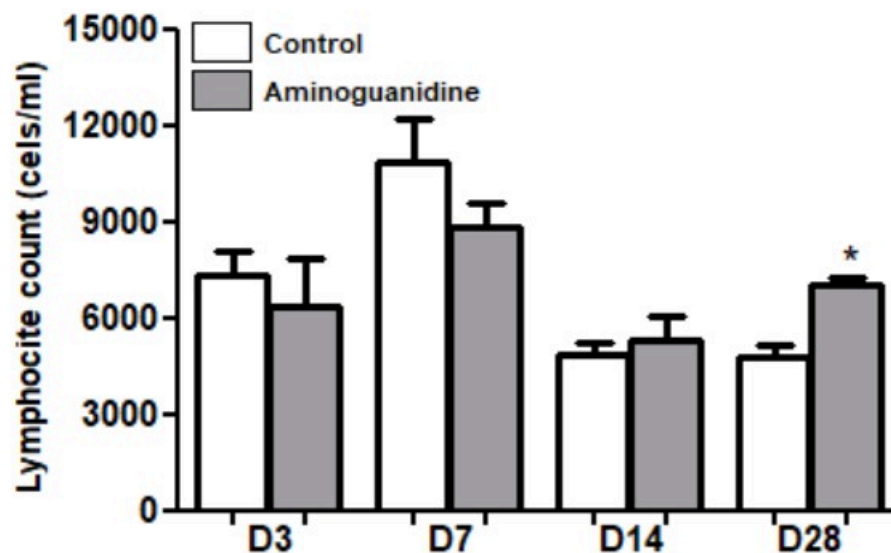


Figura 6: Avaliação de Linfócitos nos dias 3, 7, 14 e 28 nos grupos aminoguanidina e controle ($P < 0,001$).

Diferentemente da contagem dos não linfócitos, onde não foi possível observar nenhuma diferença significativa comparando-se os grupos controle e aminoguanidina nos dias 3, 7, 14 e 28 (Figura 7).

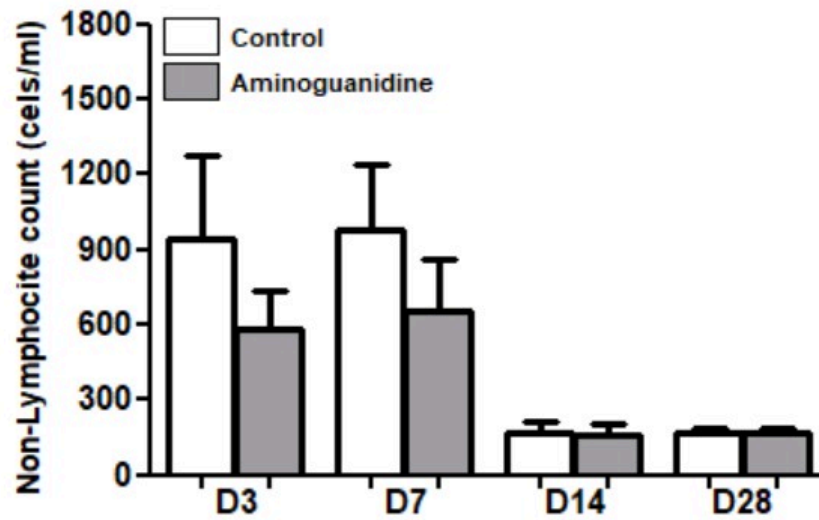


Figura 7: Avaliação de não Linfócitos nos dias 3, 7, 14 e 28 nos grupos aminoguanidina e controle ($p=0,006$).

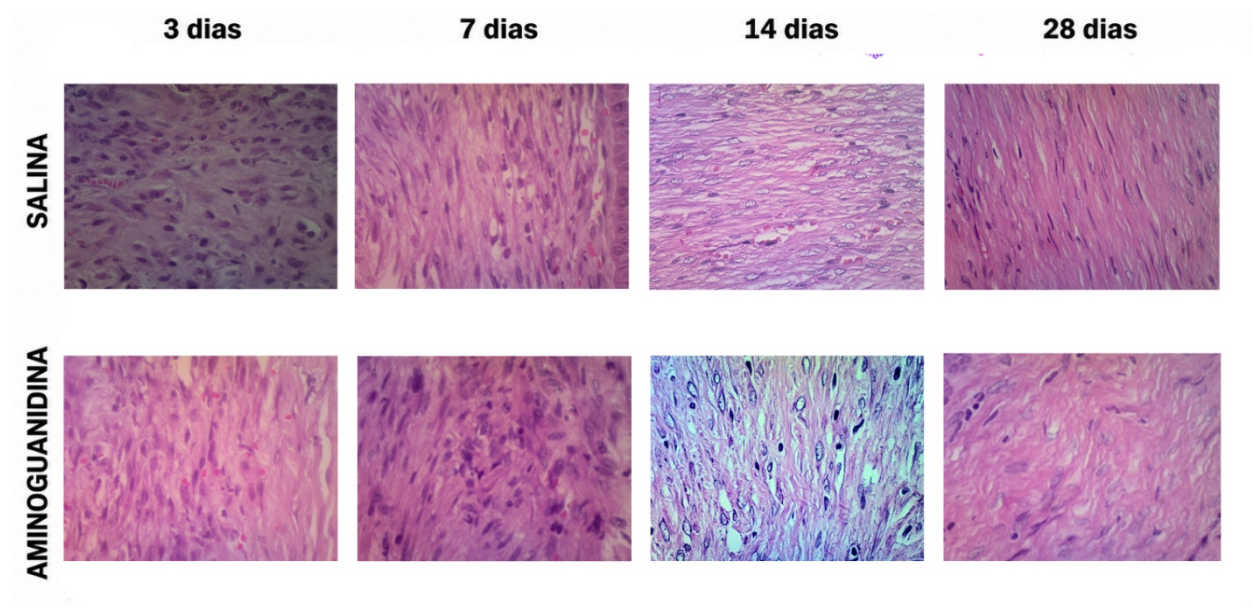


Figura 8: Fotomicrografias do perfil do sítio doador para enxerto gengival livre em ratas em diferentes tempos de avaliação.

Com relação ao ensaio imunohistoquímico, a contagem de TNF- α , foi possível observar um aumento significativo no grupo aminoguanidina nos dias 3, 7, 14 e 28 comparando-se com o grupo controle (Figura 8).

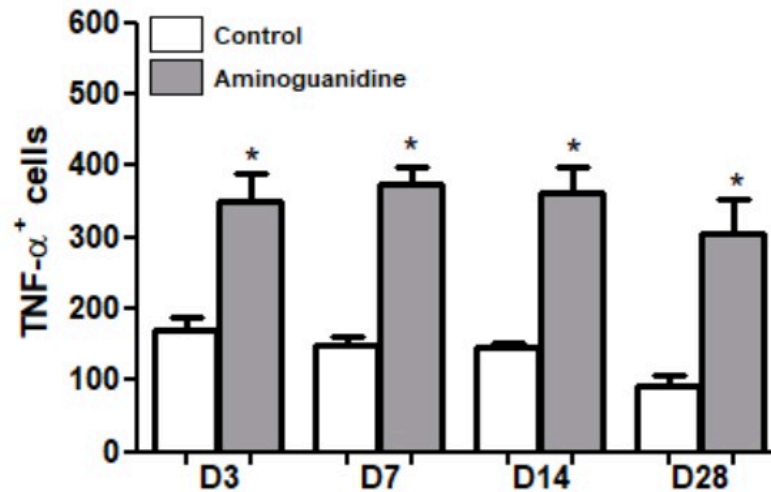


Figura 9: Avaliação de TNF- α nos dias 3, 7, 14 e 28 nos grupos aminoguanidina e controle ($p=0,003$).

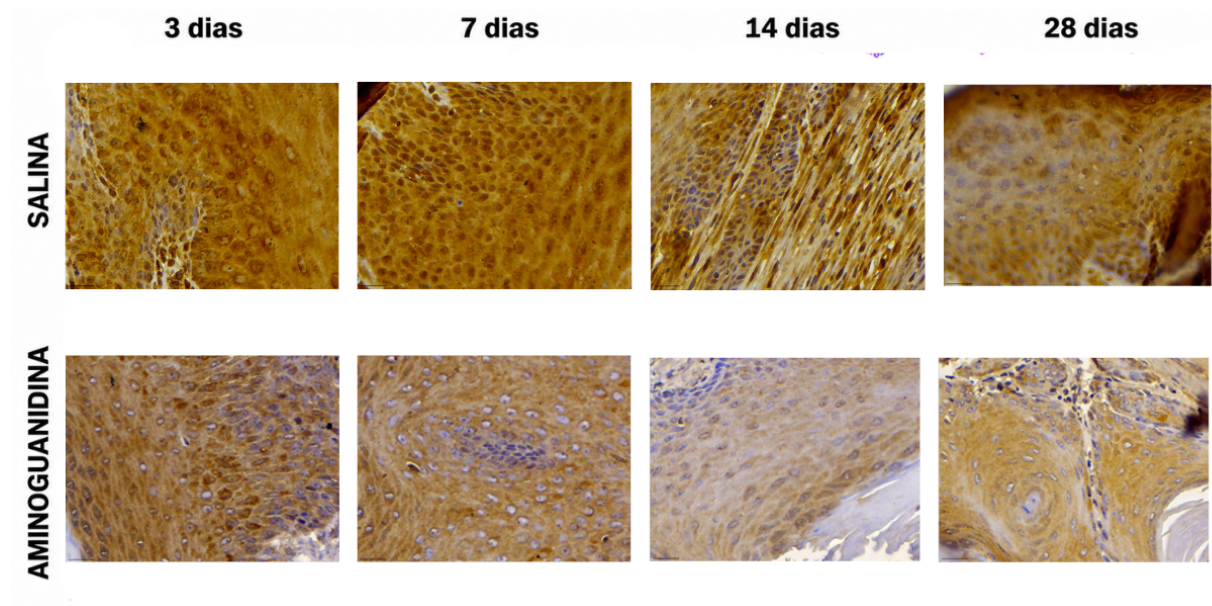


Figura 10: Fotomicrografias da imunopressão de TNF- α do sítio doador para enxerto gengival livre em ratas em diferentes tempos de avaliação.

No que se refere aos pesos dos animais, não foi observado nenhuma diferença significativa nos dias 3, 7, 14 e 28 do grupo salina e aminoguanidina. (Figura 9)

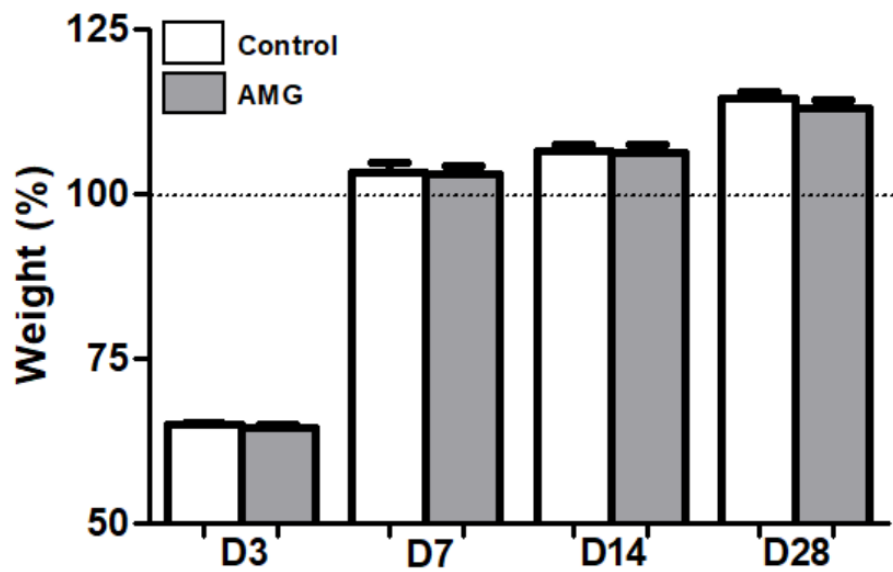


Figura 11: Avaliação dos pesos nos dias 3, 7, 14 e 28 nos grupos aminoguanidina e controle.

6 DISCUSSÃO

A óxido nítrico sintase induzível (iNOS) representa a principal fonte de óxido nítrico (NO) nos tecidos durante o processo de reparo. A iNOS promove redução significativa da expressão proteica, transcricional e da atividade enzimática do iNOS, resultando em diminuição dos níveis locais de NO, essa modulação impacta diretamente a dinâmica cicatricial, segundo os estudos de Abd el-aleem, *et al.* 2020. Corroborando assim com os achados experimentais do presente estudo, nos quais observou-se uma redução significativa na contagem de fibroblastos no grupo tratado com o fármaco.

De acordo com os estudos de Abd el-aleem, *et al.* 2020, em termos fisiopatológicos, a produção adequada de NO via iNOS parece ser indispensável para uma resposta inflamatória controlada e uma cicatrização fisiológica, atuando no equilíbrio entre o atraso reparativo e a fibrose excessiva. A disfunção dessa via no estágio inflamatório inicial predispõe a complicações, como queloides e cicatrizes hipertróficas, uma vez que o NO é necessário para a regulação celular e molecular durante a fase inflamatória. A cicatrização tecidual é um processo dinâmico que depende de eventos celulares e moleculares organizados em fases sobrepostas, nas quais a resposta inflamatória inicial é determinante para o sucesso do reparo.

Os polimorfonucleares, representados principalmente pelos neutrófilos, constituem as primeiras células a migrar para o sítio da lesão, recrutadas em resposta a mediadores inflamatórios liberados pelo tecido danificado. Diante disso, em nosso estudo, foi visto uma redução significativa dos polimorfonucleares, nos grupos D14 e D28 tratados com a aminoguanidina corroborando com o que foi visto nos estudos de Abd el-aleem, *et al.* 2020.

De acordo com os estudos de Knoedler, *et al.* 2023, os macrófagos assumem um papel central, transitando entre o fenótipo pró-inflamatório (M1) e o reparador (M2). O perfil M2 é fundamental para a regressão da inflamação, pois promove a angiogênese, a síntese de matriz extracelular e a epitelização, enquanto suprime processos fibróticos.

Recentemente, os linfócitos T reguladores (Tregs) emergiram como mediadores essenciais na transição da fase inflamatória para a fase de reparo, de acordo com Knoedler, *et al.* 2023, essas células exercem funções que transcendem a imunossupressão clássica, participando ativamente da proliferação de queratinócitos e da modulação do nicho de células-tronco, fatores vitais para o sucesso da cicatrização.

Os Tregs são fundamentais para limitar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α . O estudo de Knoedler, *et al.* 2023, ressalta que a ausência ou disfunção dos Tregs resulta em uma inflamação prolongada e atraso no fechamento da ferida. Embora o TNF- α

atue como um sinalizador de alerta, o excesso de NO derivado da iNOS pode induzir a apoptose de linfócitos infiltrantes.

A compreensão da via nitrérgica no reparo tecidual requer uma análise cuidadosa, uma vez que o óxido nítrico (NO) exerce funções ambivalentes nesse processo. Em concentrações fisiológicas, o NO desempenha papel essencial na sinalização celular, na vasodilatação e na modulação da angiogênese. Entretanto, diante de estímulos inflamatórios mediados por citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , ocorre aumento exacerbado da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando à produção excessiva de NO em níveis citotóxicos, o que pode comprometer a viabilidade celular e prejudicar o processo de cicatrização, Koohfar *et al.* 2022.

Conforme os estudos de Koohfar *et al.* 2022, existe uma correlação intrínseca entre o TNF- α e a ativação da iNOS. Observaram uma diminuição dos níveis de iNOS concomitante ao aumento de TNF- α , isso sugere uma dissociação mediada pela intervenção farmacológica. A utilização da aminoguanidina permitiu a modulação seletiva da via nitrérgica, agindo especificamente sobre a enzima iNOS e demonstrando sua eficácia como inibidor enzimático. Semelhante ao observado no presente estudo, onde animais tratados com inibidor de iNOS, revelaram aumento significativo da imunoexpressão de TNF- α .

A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa no peso corporal dos animais entre os grupos controle e experimental ao longo do período do estudo. A manutenção do peso nos grupos tratados com aminoguanidina sugere que o fármaco, na dosagem administrada, não induziu toxicidade sistêmica aguda ou distúrbios metabólicos severos.

A literatura indica que inibidores seletivos da iNOS, quando utilizados em janelas terapêuticas adequadas, tendem a apresentar um perfil de segurança favorável, preservando as funções fisiológicas básicas enquanto modulam a resposta inflamatória local, segundo os estudos de Farhad, 2021.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, a administração de aminoguanidina promoveu uma modulação no sítio cirúrgico caracterizada por um processo inflamatório mais persistente. Além disso, ocasionou em menor densidade de fibroblastos, na redução da neoangiogênese e aumento na expressão de TNF- α .

REFERÊNCIAS

ABD EL-ALEEM, S. A. *et al.* Mutual inter-regulation between iNOS and TGF- β 1: Possible molecular and cellular mechanisms of iNOS in wound healing. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165850, out. 2020. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.165850. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497615/>. Acesso em: 12 abr. 2025

AMALIYA, A. *et al.* Histological Assessment of Palatal Donor Site Wound Healing after Application of Moringa oleifera Lamarck Leaf Extract in Rats. **European Journal of Dentistry**, v. 13, n. 02, p. 248–254, maio 2019. DOI:10.1055/s-0039-1695065. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497615/>. Acesso em: 20 Mar. 2025

DEO, S. D. *et al.* Efficacy of free gingival graft in the treatment of Miller Class I and Class II localized gingival recessions: A systematic review. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 23, n. 2, p. 93–99, 2019. DOI: 10.4103/jisp.jisp_102_18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497615/>. Acesso em: 20 Mar. 2025

FARHAD, A. R. *et al.* Histological assessment of the local effect of different concentrations of aminoguanidine hydrochloride on bone healing in rats. **Dental Research Journal**, v. 18, n. 1, p. 63, jan. 2021. DOI:10.4103/1735-3327.324573. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497615/>. Acesso em: 12 abr. 2025

FIRAT, E. T. *et al.* The effect of low-level laser therapy on the healing of hard palate mucosa and the oxidative stress status of rats. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 43, n. 2, p. 103–110, 19ago.2013. DOI:10.1111/jop.12106. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497615/>. Acesso em: 22 abr. 2025

KNOEDLER, S. *et al.* Regulatory T cells in skin regeneration and wound healing. **Military Medical Research**, v. 10, n. 1, 23 out. 2023. DOI: 10.1186/s40779-023-00494-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497615/>. Acesso em: 12 abr. 2026

KOOHFAR, A. *et al.* Dapsone Protects Against Lithium-Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Rats through Targeting Tumor Necrosis Factor- α and Nitrergic Pathway. **Journal of Epilepsy Research**, v. 12, n. 2, p. 39–47, 31 dez. 2022. DOI: 10.14581/jer.22008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497615/>. Acesso em: 12 abr. 2026



SHIBAYAMA, Ricardo; FUGII, Walter Massayoshi. Free gingival graft. **Journal of Health Sciences**, v. 2, n. 1, 2000. DOI.org/10.17921/2447-8938.2000v2n1p%25p. Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsskroton.com.br/article/view/1743>. Acesso em: 5 mar. 2024

SIDHARTHAN, Sangamithra *et al.* Comparison of the effectiveness of gingival unit transfer and free gingival graft in the treatment of localized gingival recession: a systematic review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 12, n. 4, p. 460-467, 2022. DOI: 10.1016/j.jobcr.2022.06.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497615/>. Acesso em: 12 abr. 2026

WANG, P.-H. *et al.* Wound healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 2, p. 94–101, fev. 2018. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.11.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497615/>. Acesso em: 12 abr. 2026

WILKINSON, Holly N.; HARDMAN, Matthew J. Wound healing: cellular mechanisms and pathologic outcomes. **Open Biology**, v. 10, n. 9, p. 200223, 2020. DOI: 10.1098/rsob.200223. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497615/>. Acesso em: 17 abr. 2026

ANEXO

CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS			
			
Of. No. 005/23			
Protocolo da CEUA: 005/23			
Pesquisador Responsável: DAYRINE SILVEIRA DE PAULA			
<p>Título do Projeto: INFLUÊNCIA DA AMINOGLUANODINA NO PROCESSO CICATRICIAL DO SÍTIO DOADOR PARA ENXERTO GENIVAL LIVRE EM RATAS.</p> <p>Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou APROVADO o projeto supracitado na reunião do dia 28 (vinte e oito) de março de 2023.</p>			
Descrição do animal utilizado:			
Espécie:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">Wistar</td> <td style="width: 40%;">Número Amostral: 80</td> </tr> </table>	Wistar	Número Amostral: 80
Wistar	Número Amostral: 80		
<p>Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 28/03/2024.</p>			
Fortaleza, 28 de março de 2023.			
 <hr style="width: 20%; margin: auto;"/> <p>Olga Vale Oliveira Machado Coordenadora CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE</p>			
Campus Benfica Rua Princesa Isabel, 1920 60015-061 - Fortaleza-CE Fone: 85.3214.8770 3214.8771	Campus Dionísio Torres Rua Israel Bezerra, 630 60135-460 - Fortaleza-CE Fone: 85.3257.2020 Fax: 85.3277.1762	Campus D. Luís Av. Dom Luís, 911 60160-230 - Fortaleza-CE Fone: 85.3457.5300 Fax: 85.3457.5374	Campus Parque Ecológico Rua João Adolfo Gorgel, 133 60192-345 - Fortaleza-CE Fone: 85.3265.8100 Fax: 85.3265.8110