EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE | INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

A IMPORTÂNCIA DOS VASOS DO TIPO H NAS CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS DA GENGIVA E SUA CARACTERIZAÇÃO

Trabalho submetido por
Catarina Alexandra Santos Freire
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2023

EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE | INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

A IMPORTÂNCIA DOS VASOS DO TIPO H NAS CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS DA GENGIVA E SUA CARACTERIZAÇÃO

Trabalho submetido por
Catarina Alexandra Santos Freire
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Profª. Doutora Maria Alzira Cavacas

e coorientado por
Prof. Doutor António Pedro Alves de Matos e Mestre Carolina Doroteia

outubro de 2023

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Ricardo Reis, in “Odes”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª. Doutora Maria Alzira Cavacas, por todo o apoio, dedicação e comprometimento ao longo da realização deste trabalho. Além disso, gostaria também de agradecer por todos os desafios que me foi propondo e por me ter apresentado este mundo que é a investigação.

Ao Prof. António Alves de Matos, meu coorientador, pela sua disponibilidade e simpatia. A sua experiência e conhecimento foram fundamentais para o sucesso desta tese.

À Mestre Carolina Doroteia, minha coorientadora, pela dedicação, paciência e por ter estado sempre disposta a partilhar o seu conhecimento.

Ao Prof. Doutor Gil Alcoforado, que gentilmente cedeu as amostras que nos permitiram avançar com a investigação.

Ao Pedro Henriques, por me ter passado os seus conhecimentos sempre com a sua boa disposição, tornando assim toda esta tarefa mais fácil.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz que me acolheu durante estes 5 anos e por me ter proporcionado todas estas aprendizagens, desafios e amizades.

Aos meus pais por me terem sempre incentivado a ir mais longe e todo o esforço que fizeram para me proporcionar tudo aquilo que tenho hoje.

À minha irmã Daniela, por ter sido uma referência constante, quer a nível académico quer pessoal.

Aos meus avós Aurinha e António pelas constantes palavras de apoio e carinho e por serem como uns segundos pais.

Ao Pavel, o meu namorado, pelo amor, companheirismo, e por me ter secado as lágrimas sempre que necessário, dando-me força para continuar, sem nunca desistir.

À minha amiga e parceira de box, Ana Clara, por todas as aventuras e desaventuras que vivemos, por todos os obstáculos que ultrapassámos juntas. Sem ti este percurso não seria o mesmo.

À Luana, Filipa e Jéssica que mesmo longe sempre estiveram perto. Obrigada por toda a amizade e apoio.

Às minhas amigas e futuras colegas de profissão, Marta, Flávia, Filipa, Joana, Maria Inês, Laura e Beatriz pela partilhas e interajudas. E tal como se diz "Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado com certeza vai mais longe".

RESUMO

Introdução: Em patologias gengivais, como a periodontite e a peri-implantite, existem alterações ao nível do tecido ósseo. Estudos recentes referiram um novo tipo de neovasos, os vasos H, estes têm sido associados a fenómenos de regeneração óssea.

Objetivo primário: Observar histologica e ultraestruturalmente amostras gengivais de peri-implantite e periodontite.
Objetivo secundário: Observar células endoteliais para posterior identificação dos vasos H.

Materiais e Métodos: Foram colhidas amostras gengivais de peri-implantite (n=10) e de periodontite (n=3), esta colheita foi realizada para fins terapêuticos. Algumas das amostras foram preparadas para microscopia ótica (MO), e as restantes para microscopia eletrónica de transmissão (MET). Para microscopia ótica, as amostras foram fixadas em formol a 10%, desidratadas em álcool com concentrações ascendentes, incluídas em parafina, cortadas com um micrótomo e coradas por hematoxilina – eosina. Os cortes foram observados em microscópio ótico Olympus® CX41, com ampliações de 10x, 20x e de 40x. As amostras foram fotografadas com a câmera DFK 33UX262 acoplada ao adaptador Olympus® U-CMAD3, utilizando o *software IC Capture 2.5*. As restantes amostras foram preparadas para serem observadas em MET de acordo com os protocolos *standard*. Os cortes semi-finos foram realizados com faca de vidro e os ultrafinos com faca de diamante. As observações foram realizadas no MET JEOL 1200EX.

Resultados: Tanto na periodontite, como na peri-implantite, foram observadas áreas de infiltrado inflamatório. Em MO observaram-se pequenos vasos com algum infiltrado inflamatório em redor dos mesmos e através de MET observaram-se células endoteliais com espessamentos/duplicações da membrana basal e evidenciaram-se fibroblastos, macrófagos e outras células inflamatórias, tais como linfócitos e plasmócitos.

Conclusões: As amostras de peri-implantite evidenciaram maior infiltrado inflamatório comparativamente às amostras de periodontite. As células endoteliais apresentaram alterações ultraestruturais em ambas as patologias.

Palavras-chave: gengivite; periodontite; peri-implantite; vasos do tipo H.

ABSTRACT

Introduction: In gingival pathologies such as periodontitis and peri-implantitis, there are changes in bone tissue. Recent studies have reported a new type of neovessel, the H-vessel, which has been associated with bone regeneration phenomena.

Main aim: Histological and ultrastructural observation of gingival samples of peri-implantitis and periodontitis.
Secondary aim: Observe endothelial cells for later identification of H vessels.

Materials and Methods: Gingival samples from peri-implantitis (n=10) and periodontitis (n=3) were collected for therapeutic purposes. Some of the samples were prepared for optical microscopy (OM) and the rest for transmission electron microscopy (TEM). For optical microscopy, the samples were fixed in 10% formaldehyde, dehydrated in alcohol with ascending concentrations, embedded in paraffin, cut with a microtome and stained with haematoxylin-eosin. The sections were observed under an Olympus® CX41 optical microscope at 10x, 20x and 40x magnification. The samples were photographed with the DFK 33UX262 camera coupled to the Olympus® U-CMAD3 adapter, using IC Capture 2.5 software. The remaining samples were prepared for observation in TEM according to standard protocols. Semi-thin sections were cut with a glass knife and ultra-thin sections with a diamond knife. The observations were made on the JEOL 1200EX TEM.

Results: Both periodontitis and peri-implantitis showed areas of inflammatory infiltrate. In OM, small vessels were observed with some inflammatory infiltrate around them and TEM showed endothelial cells with thickening/doubling of the basement membrane and evidence of fibroblasts, macrophages and other inflammatory cells such as lymphocytes and plasma cells.

Conclusions: The peri-implantitis samples showed a greater inflammatory infiltrate than the periodontitis samples. The endothelial cells showed ultrastructural alterations in both pathologies.

Keywords: gingivitis; periodontitis; peri-implantitis; type H vessels.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO 15

1.1. Periodonto e área peri-implantar 15
1.2. Caracterização do tecido gengival 16
1.2.1. Componentes celulares e especificidades dos principais organelos celulares 19
1.3. Doença periodontal 20
1.3.1. Gengivite 21
1.3.2. Periodontite 21
1.4. Doença peri-implantar 22
1.4.1. Mucosite peri-implantar 22
1.4.2. Peri-implantite 23
1.5. Inflamação 24
1.6. Vasos sanguíneos 25
1.6.1. Angiogénese 27
1.7. Morte celular 29
1.8. Objetivos 30

II. MATERIAIS E MÉTODOS 31

2.1. Ética 31
2.2. Local de realização do estudo 31
2.3. Critérios de inclusão 31
2.4. Critérios de exclusão 31
2.5. Grupos de estudo 32
2.6. Material 32
2.6.1. Amostras 32
2.6.2. Consumíveis 32
2.6.3. Equipamento 32
2.7. Protocolo Experimental 33
2.7.1. Preparação das amostras para MO 33
2.7.1.1. Processamento 33
2.7.1.2. Inclusão 33
2.7.1.3. Cortes 34
2.7.1.4. Coloração 34
2.7.1.5. Colocação de lamela 35

2.7.2. Observação ao MO 36
2.7.3. Preparação das amostras para MET 36
2.7.3.1. Fixação 36
2.7.3.2. Processamento 37
2.7.3.3. Execução dos cortes semifinos 38
2.7.3.4. Coloração dos cortes semifinos 38
2.7.3.5. Execução dos cortes ultrafinos 39
2.7.3.6. Contrastação das grelhas 39
2.7.4. Observação ao MET 40
III. RESULTADOS 41
3.1. Resultados de MO 41
3.1.1. Grupo A - periodontite 41
3.1.2. Grupo B – peri-implantite 42
3.2. Resultados de MET 43
3.2.1. Grupo A – periodontite 43
3.2.2. Grupo B – peri-implantite 47
IV. DISCUSSÃO 49
4.1. Limitações e perspetivas futuras 51
V. CONCLUSÃO 53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura do dente, implante e estruturas adjacentes (Adaptado de Ebenezer et al., 2021)..... 16
Figura 2 - Disbiose microbiota nas doenças periodontais (Hajishengallis, 2015). 22
Figura 3 - Relação bidirecional entre peri-implantite e doenças metabólicas (Gasmi Benahmed et al., 2022). 24
Figura 4 - Túnicas (Adaptado de Pan et al., 2022). 26
Figura 5 - Angiogénese: A - vaso sanguíneo em repouso; B - Degradação da membrana basal e descolamento celular; C - Proliferação e migração celular; D - Fusão e maturação dos vasos (Adaptado de Krüger-Genge et al., 2019). 28
Figura 6 - Processador de tecidos SAKURA Tissue-Tek® II. 33
Figura 7 - Aparelho de inclusão Leica® EG11H. 33
Figura 8 - Placa fria Leica® EG1130. 34
Figura 9 - Amostras incluídas em parafina. 34
Figura 10 - Micrótomo Micron HM 355S. 36
Figura 11 - Cuba de coloração preparada para coloração HE. 36
Figura 12 - Lâminas finalizadas para microscopia ótica. 36
Figura 13 - Ultramicrótomo Reichert-Jung Ultracut E. 39
Figura 14 - Cortes semifinos. 39
Figura 15 - Ultramicrótomo com faca de diamante. 40
Figura 16 - Cortes ultrafinos. 40
Figura 17 – Contrastação das grelhas. 40
Figura 18 - Imagem de MO de periodontite: epitélio de revestimento (*) sobre o tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo (**). Ampliação de 4x. 41
Figura 19 - Imagem de MO de periodontite: epitélio estratificado (*) e infiltrado inflamatório com plasmócitos, macrófagos e linfócitos (**). Ampliação de 40x. 41
Figura 20 - Imagem de MO de peri-implantite: epitélio estratificado (*) e intenso infiltrado inflamatório com plasmócitos, macrófagos e linfócitos com aparentes alterações morfológicas (**). Ampliação de 40x. 42
Figura 21 - Imagem de MO de peri-implantite: macrófagos em paliçada (seta). Ampliação de 40x. 42

Figura 22 - Imagem de MO de Peri-implantite: Vaso sanguíneo com endotélio alto (*) rodeado de células polimorfonucleares, algumas das quais em aparente degradação (**). Ampliação de 40x. 42
Figura 23 - Imagem de MO de peri-implantite: vaso sanguíneo (*) com tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório (**). Ampliação de 4x. 42
Figura 24 - Imagem de MO de peri-implantite: agregado de material basófilo (*) e alterações celulares estruturais (**). Ampliação de 40x. 43
Figura 25 - Imagem de MET de periodontite: fibroblasto no tecido conjuntivo. Observa-se o complexo de Golgi perinuclear (seta). 43
Figura 26 - Imagem de MET de periodontite: fibroblasto (*) rodeado de colagénio e tecido conjuntivo denso (**). 43
Figura 27 - Imagem de MET de periodontite: fibras de colagénio. 44
Figura 28 - Imagem de MET de periodontite: filamentos de vimentina presente num fibroblasto (seta). 44
Figura 29 - Imagem de MET de periodontite: fibroblastos com alterações (seta). 44
Figura 30 - Imagem de MET de periodontite: macrófago (seta). 44
Figura 31 - Imagem de MET de periodontite: macrófago com nucléolo visível (*), corpos nucleares (**), grânulos intercromatínicos (***) e vacúolos (****). 44
Figura 32 - Imagem de MET de periodontite: macrófago em aparente estado de necrose (seta). 44
Figura 33 - Imagem de MET de periodontite: macrófago em estado de apoptose (seta). 45
Figura 34 - Imagem de MET de periodontite: linfócito (*) e macrófago (**) no tecido conjuntivo. 45
Figura 35 - Imagem de MET de periodontite: linfócito (*) e eritrócito (**). 45
Figura 36 - Imagem de MET de periodontite: plasmócito com retículo endoplasmático dilatado (seta). 45
Figura 37 - Imagem de MET de periodontite: plasmócito e granulócito (*) no tecido conjuntivo. Observa-se o contacto próximo entre as células e o retículo endoplasmático dilatado (**). 45
Figura 38 - Imagem de MET de periodontite: vaso sanguíneo com células endoteliais (seta). 45

Figura 39 - Imagem de MET de periodontite: endotélio dilatado preenchido de eritrócitos (seta). 46
Figura 40 - Imagem de MET de periodontite: pequeno capilar (*) rodeado por pericitos (**) e membrana basal espessada. 46
Figura 41 - Imagem de MET de periodontite: endotélio (*), macrófagos (**) e pericito (***). 46
Figura 42 - Imagem de MET de periodontite: núcleo característico de célula epitelial (seta). 46
Figura 43 - Imagem de MET de periodontite: núcleo de célula epitelial (seta). 46
Figura 44 - Imagem de MET de periodontite: tonofilamentos de célula epitelial (seta). 46
Figura 45 - Imagem de MET de periodontite: desmossomas nas células epiteliais (seta). 46
Figura 46 - Imagem de MET de peri-implantite: fibroblasto (*) e fibras de colagénio (**). 47
Figura 47 - Imagem de MET de peri-implantite: macrófago (seta) em zona necrosada (cromatina condensada). 47
Figura 48 - Imagem de MET de peri-implantite: linfócito em degradação (seta). 47
Figura 49 - Imagem de MET de peri-implantite: RER (*) e mitocôndrias (**) de plasmócito. 47
Figura 50 - Imagem de MET de peri-implantite: mitocôndrias turgidas (*) e corpos multivesiculados (**). 48
Figura 51 - Imagem de MET de peri-implantite: células endoteliais (seta). 48
Figura 52 - Imagem de MET de peri-implantite: membrana basal da célula endotelial com desdobramento (seta). 48
Figura 53 - Imagem de MET de peri-implantite: pericito em necrose (seta). 48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Etapas da coloração HE. 35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAP – *American Academy of Periodontology*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ATP – Adenosina Trifosfato

CE – Células Endoteliais

CEM – Células Estaminais Mesenquimatosas

CiiEM – Centro de Investigação Interdisciplinar da Egas Moniz

Cmicros – Laboratório de Microscopia Eletrónica e Histopatologia

EFP – *European Federation of Periodontology*

HE – Hematoxila-Eosina

ITMP – Inibidor Tecidular das Metaloproteinases de Matriz

LPD – Ligamento Periodontal

MB – Membrana basal

MEC – Matriz extracelular

MET – Microscópio Eletrónico de Transmissão

mL – Mililitro

mm – Milímetros

MMP – Metaloproteinase de Matriz

MO – Microscópio ótico

nm – Nanómetro

Osx – Osterix

REL – Retículo Endoplasmático Liso

RER – Retículo Endoplasmático Rugoso

Runx2 – Fator de transcrição relacionado à Runt-2

TC – Tecido Conjuntivo

TCR – *T-cell receptors*

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

µm – Micrómetro

I. INTRODUÇÃO

1.1. Periodonto e área peri-implantar

O periodonto é composto pela gengiva, ligamento periodontal (LPD), cemento e osso alveolar. As suas principais funções são a fixação e suporte do dente, bem como a proteção das estruturas adjacentes da microflora oral (Tribble & Lamont, 2010).

Segundo a *European Federation of Periodontology* (EFP) e a *American Academy of Periodontology* (AAP), a saúde periodontal deve ser definida como um estado livre de doença periodontal inflamatória, baseada na ausência de doença, como gengivite, periodontite ou outras condições periodontais (Chapple et al., 2018)**.**

Em condições normais, não há diferenças visuais entre os tecidos peri-implantares e os periodontais. No entanto, a profundidade de sondagem nos locais de implante é, geralmente, maior quando comparada à sondagem dos dentes. As papilas nos locais interproximais de um implante podem ser mais curtas que as dos locais interproximais dos dentes (Berglundh et al., 2018).

A mucosa peri-implantar saudável é composta por um substrato de tecido conjuntivo (TC), revestido por um epitélio queratinizado (mucosa mastigatória) ou não queratinizado (mucosa de revestimento). Nesta, há ausência de sinais clínicos de inflamação, como edema ou eritema, ausência de sangramento e/ou supuração à sondagem, nenhum aumento na profundidade de sondagem e ausência de perda óssea excluindo a remodelação óssea inicial. A componente da parte intraóssea do implante está em contacto com o osso mineralizado, enquanto a porção restante está voltada para estruturas vasculares ou tecido fibroso, sendo que a porção coronal é revestida por um epitélio sulcular e um fino epitélio juncional; no segmento mais apical o TC está em contacto direto com a superfície do implante (Araujo & Lindhe, 2018; Berglundh et al., 2018).

A saúde do tecido peri-implantar pode existir em torno dos implantes com suporte ósseo reduzido (Berglundh et al., 2018).

Em comparação com o periodonto, os tecidos peri-implantares não possuem cemento nem ligamento periodontal (Figura 1). O epitélio peri-implantar é, geralmente, mais largo e no TC não há inserção de fibras na superfície do implante. Os tecidos peri-implantares são menos vascularizados na região entre a crista óssea e o epitélio juncional quando comparados com a zona de TC do periodonto (Berglundh et al., 2018).

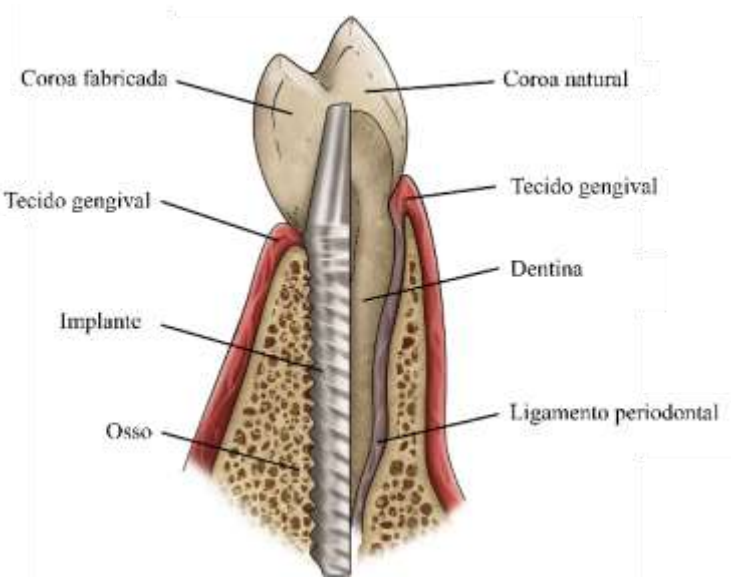


Figura 1 - Representação da estrutura do dente, implante e estruturas adjacentes (Adaptado de Ebenezer et al., 2021).

1.2. Caracterização do tecido gengival

O tecido gengival é constituído por tecido epitelial e TC (Lindle & Lang, 2015).

O tecido epitelial é estratificado pavimentoso queratinizado em regiões de gengiva aderida e não queratinizado na gengiva livre. As células que formam este tecido denominam-se queratinócitos (Katchburian & Arana, 2004; Lindle & Lang, 2015), que possuem numerosas junções celulares, os desmossomas. Os desmossomas são discóides e estão ancorados através de filamentos intracelulares, as tonofibrilas, que surgem na célula e projetam-se para a superfície, onde se fixam e participam na junção celular (Avery & Chiego, 2006; Katchburian & Arana, 2004).

No epitélio oral, para além dos queratinócitos também existem as células chamadas de não-queratinócitos, sendo que fazem parte de 10% das células do epitélio. São estas as células de Langerhans, as células de Merckel e os melanócitos (Berkovitz et al., 2004; Katchburian & Arana, 2004).

No TC as principais células presentes são os fibroblastos e algumas células de defesa como macrófagos, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos (Junqueira & Carneiro, 2013; Nanci & Bosshardt, 2006).

As **células de Langerhans** são células dentríticas que têm como função serem apresentadoras de antigénios (Berkovitz et al., 2004; Katchburian & Arana, 2004), estas têm a capacidade de captar antigénios, processá-los e posteriormente apresentá-los aos linfócitos T (Berkovitz et al., 2004; Junqueira & Carneiro, 2013). Em relação à sua

morfologia, possuem grânulos em forma de bastão que lhes são característicos, chamados de grânulos de Birbeck (Berkovitz et al., 2004).

As **células de Merckel** possuem uma função recetora nervosa, estando por isso frequentemente adjacentes a terminações nervosas. Em termos morfológicos, o núcleo é invaginado e o citoplasma contém múltiplas mitocôndrias, ribossomas e numerosas vesículas (Berkovitz et al., 2004; Katchburian & Arana, 2004).

Os **melanócitos** são células responsáveis por produzir pigmento, sendo deste modo responsáveis pela cor escura de certas áreas do epitélio que reveste a cavidade oral, principalmente a gengiva aderida. Estas células possuem prolongamentos citoplasmáticos com numerosos grãos de melanina que acabam por ser fagocitados pelos queratinócitos, chegando assim ao citoplasma dos mesmos (Berkovitz et al., 2004; Junqueira & Carneiro, 2013; Katchburian & Arana, 2004).

Os **fibroblastos** são as células mesenquimais mais comuns no TC; estas sintetizam colagénio, elastina e outras macromoléculas da matriz para suporte estrutural do TC, tais como, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas de adesão (Freundlich et al., 1986; Junqueira & Carneiro, 2013). Além disso, também produzem fatores de crescimento que controlam a proliferação e a diferenciação celular. Apresentam uma forma alongada, fusiforme, com finos e abundantes prolongamentos citoplasmáticos; já o núcleo possui uma forma ovoide, grande e fracamente corado, com cromatina fina e nucléolo proeminente (Junqueira & Carneiro, 2013; Katchburian & Arana, 2004).

O seu citoplasma é basófilo e possui um proeminente retículo endoplasmático rugoso e um aparelho de Golgi muito desenvolvido, o seu citoplasma contém vesículas, vacúolos e mitocôndrias com poucos microfilamentos ou filamentos intermediários e raros contactos intercelulares (Drake et al., 2003; Junqueira & Carneiro, 2013; Katchburian & Arana, 2004).

Quando os fibroblastos terminam a síntese da maioria do material extracelular, tornam-se relativamente inativos, sendo denominados fibrócitos, que são, portanto, fibroblastos metabolicamente quiescentes, em repouso. Estes são menores e mais alongados e possuem um núcleo também mais alongado, menor e denso, uma vez que a cromatina se encontra mais condensada. O seu citoplasma tem menor quantidade de retículo endoplasmático rugoso. Contudo, os fibrócitos podem voltar à sua fase ativa de fibroblastos (Junqueira & Carneiro, 2013; Katchburian & Arana, 2004).

Os **macrófagos** são células fagocíticas que atuam como elementos de defesa; estas células têm origem em monócitos, que por sua vez derivam da medula óssea, além disso,

participam nas reações imunológicas como células apresentadoras de antigénios (Berkovitz et al., 2004; Katchburian & Arana, 2004).

As características morfológicas dos macrófagos são muito variáveis e dependem da sua atividade funcional e do tecido onde se encontram, caracterizando-se por terem uma superfície irregular com protrusões e reentrâncias (Junqueira & Carneiro, 2013). Estas células contêm apenas um núcleo geralmente em forma de rim, que é delimitado por uma membrana dupla (Katchburian & Arana, 2004). O seu citoplasma pode formar extensões finas e alongadas e contém diversas estruturas como mitocôndrias, apesar de pouco numerosas, um complexo de Golgi bem desenvolvido, um retículo endoplasmático proeminente, lisossomas, que contêm uma variedade de hidrólases e enzimas digestivas para degradar substâncias, fagossomas e vacúolos endocíticos (Avery & Chiego, 2006; Junqueira & Carneiro, 2013; Katchburian & Arana, 2004). A sua superfície celular é bastante pregueada, constituindo assim uma grande área de membrana plasmática, que apresenta dobras e projeções plasmáticas (Katchburian & Arana, 2004).

Os macrófagos podem ter denominações diferentes, dependendo da sua localização, tais como: células de Kupffer no fígado, células de Langerhans na pele, microglia no sistema nervoso central e osteoclastos no tecido ósseo (Junqueira & Carneiro, 2013). No seu estado inativo denominam-se histiócitos (Berkovitz et al., 2004).

Os **neutrófilos** são um tipo de leucócito e caracterizam-se pela sua capacidade de cercar e fagocitar corpos estranhos, este processo faz parte da resposta imunitária inata do corpo a patógenos bacterianos ou fúngicos (Malech et al., 2014). Estes são células arredondadas polimorfonucleares, com núcleos formados por dois a cinco lóbulos, o seu citoplasma apresenta grânulos específicos (constituídos por enzimas) e lisossomas (que contêm proteínas e péptidos) (Junqueira & Carneiro, 2013).

No seu estado final de diferenciação, os neutrófilos apresentam um retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi pouco desenvolvidos, e também possuem poucas mitocôndrias (Junqueira & Carneiro, 2013).

Os **linfócitos** são responsáveis pela defesa imunológica do organismo. Estas células reconhecem moléculas estranhas existentes em diferentes agentes infeciosos, combatendo-os por meio de resposta humoral (produção de imunoglobulinas) e resposta citotóxica mediada por células. Estes circulam nos vasos linfáticos e também na corrente sanguínea (Avery & Chiego, 2006; Junqueira & Carneiro, 2013).

Os linfócitos são caracterizados por núcleos esféricos extensos, com pouco citoplasma eosinófilo, pobre em organelos (Junqueira & Carneiro, 2013; Orakpoghenor et al., 2019).

Existem dois tipos principais, os linfócitos B e T, de acordo com os recetores que possuem na sua membrana. Os linfócitos B têm imunoglobulinas, já os recetores dos linfócitos T são moléculas proteicas chamadas *T-cell receptors* (TCR) (Junqueira & Carneiro, 2013).

Quando os linfócitos B são ativados por antigénios, diferenciam-se em plasmócitos (Junqueira & Carneiro, 2013).

Os **plasmócitos** são escassos no tecido conjuntivo normal, no entanto são abundantes em inflamações crónicas tal como os linfócitos e macrófagos (Junqueira & Carneiro, 2013).

Estas são células grandes que apresentam um citoplasma basófilo com um retículo endoplasmático bem desenvolvido, uma vez que produzem anticorpos. O núcleo é esférico e possui grânulos cromatínicos (Junqueira & Carneiro, 2013).

1.2.1. Componentes celulares e especificidades dos principais organelos celulares

O **núcleo** é a estrutura que tem o controlo de toda a atividade celular. Existem dois tipos de cromatina, a heterocromatina e a eucromatina. A heterocromatina é mais escura, uma vez que as cadeias de ácido desoxirribonucleico (ADN) estão muito compactadas e desta maneira a cromatina é mais inativa. Ao contrário da eucromatina, que é uma região mais clara, as cadeias de ADN estão menos compactadas e por isso é possível existir a transcrição dos genes, sendo deste modo uma região mais ativa (Junqueira & Carneiro, 2013).

Os corpos nucleares são estruturas que se encontram no núcleo, mas não se encontram ligadas à membrana nuclear e concentram fatores nucleares específicos, como por exemplo proteínas e RNA (Staněk & Fox, 2017).

A **membrana plasmática** é formada essencialmente por duas camadas fosfolipídicas e tem como principal função a manutenção do meio intracelular (Junqueira & Carneiro, 2013).

O **citoesqueleto** é formado por uma rede de filamentos que tem como função possibilitar o movimento da célula, dos seus organelos, bem como a contração celular. Os filamentos podem apresentar um tamanho variado, sendo os microfilamentos

compostos por actina e miosina, e os filamentos intermediários por queratinas, vimentina e desmina (Junqueira & Carneiro, 2013).

As **mitocôndrias** são organelos alongadas compostas por dois espaços celulares, a matriz e espaço intermembranar, os quais são delimitados pelas duas membranas fosfolipídicas, a membrana externa e a membrana interna. A membrana interna mitocondrial é estruturalmente organizada em invaginações, denominadas de cristas mitocondriais, as quais podem ser reorganizadas quando estimuladas. Esta reorganização pode ser desencadeada, por exemplo, por sinais apoptóticos (Protasoni & Zeviani, 2021).

As mitocôndrias distribuem-se por diversos locais, mas tendem a acumular-se nas regiões do citoplasma onde existe maior gasto de energia. Estas transformam energia química em energia acessível à célula, sendo que metade dessa energia é armazenada em ligações fosfato da adenosina trifosfato (ATP), a outra metade é libertada sob a forma de calor, mantendo desta maneira a temperatura corporal (Junqueira & Carneiro, 2013).

O **reticulo endoplasmático** é constituído por uma membrana contínua que forma uma rede de canais. Existe o retículo endoplasmático rugoso (RER) que possui polirribossomas responsáveis pela síntese de proteínas, sendo abundante em células com elevada síntese proteica, tais como os fibroblastos e os plasmócitos. Já o reticulo endoplasmático liso (REL) não possui ribossomas, apenas uma membrana continua com o RER, este participa em vários processos tais como a síntese de fosfolípidos (Junqueira & Carneiro, 2013).

O **complexo de Golgi** é um grupo de vesiculas que completam as alterações pós-tradução, e posteriormente encaminha as moléculas para vesiculas de secreção ou lisossomas (Junqueira & Carneiro, 2013).

1.3. Doença periodontal

A doença periodontal consiste numa condição inflamatória crónica, não transmissível, de causa multifatorial que resulta da interação do biofilme bacteriano específico e da resposta imunoinflamatória do hospedeiro. A doença periodontal engloba a gengivite e a periodontite (Holde et al., 2017).

1.3.1. Gengivite

As bactérias comensais desempenham um papel ativo na manutenção do tecido gengival. A perda da homeostase bacteriana do hospedeiro leva ao aumento da carga bacteriana que, por sua vez, aumenta a inflamação gengival (Irie et al., 2014).

Clinicamente, a gengivite é indolor e é caracterizada por edema, hemorragia e sem perda de inserção. Além disso, é uma condição reversível se o biofilme for removido; contudo, se não for tratada, a gengivite pode evoluir para periodontite (Baskaradoss, 2018).

1.3.2. Periodontite

A periodontite é uma doença inflamatória crónica complexa caracterizada por uma inflamação microbiana mediada pelo hospedeiro que resulta na perda de suporte tecidual periodontal; manifesta-se através de perda de inserção clínica e perda óssea alveolar avaliada radiograficamente, presença de bolsas periodontais e hemorragia gengival (Figura 2) (Papapanou et al., 2018).

Esta doença é causada por vários fatores que interagem entre si (Loos & Van Dyke, 2020; Tonetti et al., 2018). Estes fatores incluem: fatores genéticos e epigenéticos, estilo de vida, comorbilidades, fatores locais ou dentários e patobiontes num biofilme subgengival disbiótico (Loos & Van Dyke, 2020). A *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* estão entre os agentes microbianos etiológicos da periodontite (Haffajee & Socransky, 2006).

Existem alguns fatores que têm influência na periodontite tais como: idade, escolaridade, tabagismo e diabetes *mellitus* (Botelho et al., 2019; Nazir et al., 2020; Relvas et al., 2022).

Em 2019, a prevalência de periodontite na população adulta da região sul da Área Metropolitana de Lisboa, foi de 59,9% (Botelho et al., 2019). Em 2022, na população adulta do Norte de Portugal, a prevalência de saúde periodontal foi de 24,5%, de gengivite foi de 26,9% e de periodontite foi de 48,6% (Relvas et al., 2022).

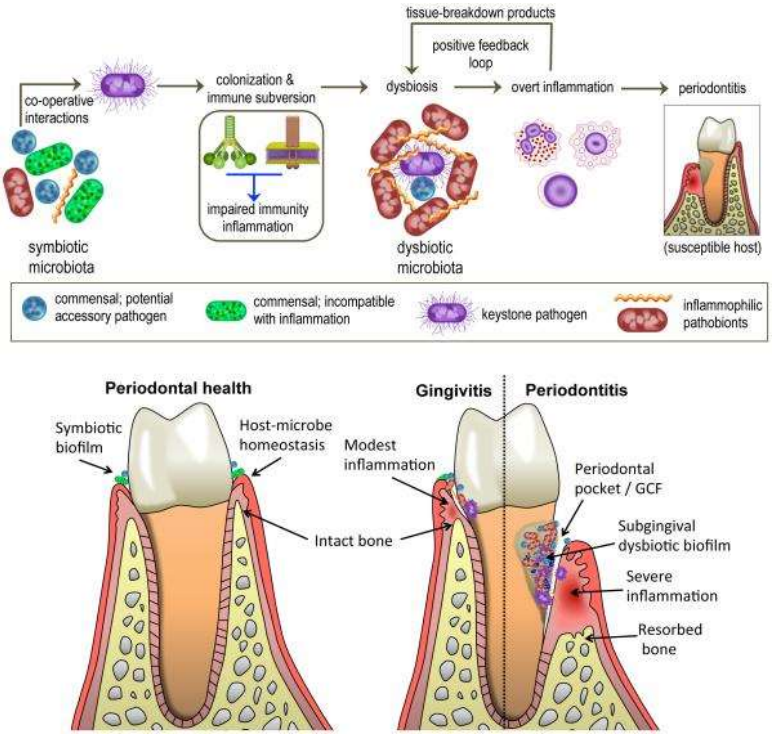


Figura 2 - Disbiose microbiota nas doenças periodontais (Hajishengallis, 2015).

1.4. Doença peri-implantar

As lesões inflamatórias que por vezes se desenvolvem nos tecidos que estão em redor dos implantes são denominadas doenças peri-implantares. As doenças peri-implantares incluem a mucosite peri-implantar e a peri-implantite. A gengivite e a periodontite afetam o periodonto dos dentes naturais, enquanto a mucosite peri-implantar e a peri-implantite afetam os tecidos moles e duros que rodeiam os implantes dentários (Caton et al., 2018).

1.4.1. Mucosite peri-implantar

A mucosite peri-implantar é uma lesão inflamatória dos tecidos moles ao redor de um implante dentário sem perda de osso de suporte (Lindhe & Meyle, 2008). A lesão é caracterizada por um infiltrado de células inflamatórias presente no TC adjacente ao epitélio de barreira (Gualini & Berglundh, 2003).

A principal característica clínica da mucosite é a hemorragia à sondagem, no entanto, o eritema, edema e supuração também podem estar presentes (Berglundh et al., 2018; Lindhe & Meyle, 2008). Existe ausência de perda óssea, além da resultante remodelação óssea inicial, contudo, observa-se um aumento da profundidade de

sondagem devido ao edema ou diminuição da resistência à sondagem (Berglundh et al., 2018).

O principal fator de risco identificado como indicador de risco para a mucosite peri-implantar é a acumulação de biofilme, sendo que esta interrompe a homeostase na interface implante-mucosa; no entanto, é uma condição reversível (Berglundh et al., 2018; Heitz-Mayfield & Salvi, 2018). O tabagismo e a radioterapia são considerados também fatores de risco (Heitz-Mayfield & Salvi, 2018).

Sabe-se que 80% dos indivíduos reabilitados com implantes e 50% dos locais de implante exibiram mucosite peri-implantar (Lindhe & Meyle, 2008).

Se a mucosite não for revertida poderá ser considerada um precursor para a peri-implantite (Heitz-Mayfield & Salvi, 2018).

1.4.2. Peri-implantite

A peri-implantite é uma condição patológica que ocorre nos tecidos ao redor dos implantes dentários, caracterizada por inflamação no TC peri-implantar e perda progressiva do osso de suporte (Lindhe & Meyle, 2008; Schwarz et al., 2018). Esta pode progredir de forma não linear e rápida (Schwarz et al., 2018).

Para diagnosticar a peri-implantite devem ser considerados parâmetros clínicos e radiográficos, tais como a profundidade de sondagem, hemorragia à sondagem e perda óssea peri-implantar. A alteração do nível ósseo é o parâmetro mais fidedigno para definir a peri-implantite (Giraldo et al., 2018; Lee et al., 2017).

As evidências sugerem que a perda progressiva da crista óssea ao redor dos implantes, na ausência de sinais clínicos de inflamação dos tecidos moles, é um evento raro (Schwarz et al., 2018). Já a hemorragia à sondagem é um sinal de inflamação cuja presença contínua pode causar perda de osso de suporte (Lindhe & Meyle, 2008).

Existem algumas evidências limitadas que ligam a peri-implantite a outros fatores, como: presença de cimento submucoso, ausência de mucosa queratinizada peri-implantar e posicionamento dos implantes que dificultam a higiene oral e manutenção (Schwarz et al., 2018).

Existe um risco aumentado de desenvolver peri-implantite em pacientes com histórico de periodontite (Berglundh et al., 2018; Lindhe & Meyle, 2008; Schwarz et al., 2018), pouco cuidado na manutenção após a colocação de implantes (Berglundh et al., 2018; Schwarz et al., 2018), hábitos tabágicos (Renvert & Quirynen, 2015) e pacientes com distúrbios metabólicos sistémicos (Figura 3), como é o caso da obesidade,

dislipidemia, diabetes *mellitus* ou artrite reumatoide (Gasmi Benahmed et al., 2022; Renvert & Quirynen, 2015).

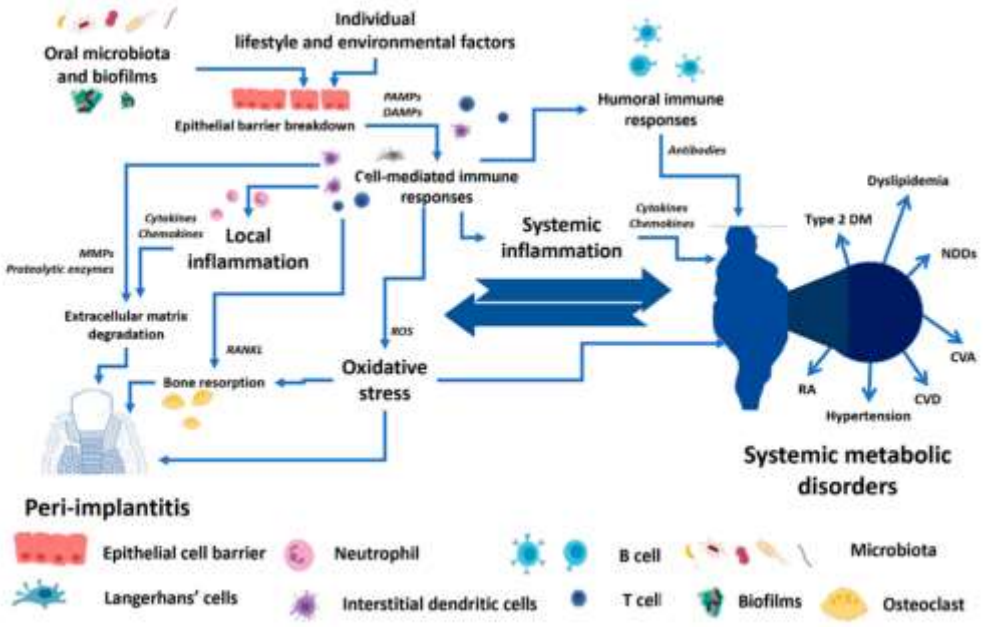


Figura 3 - Relação bidirecional entre peri-implantite e doenças metabólicas (Gasmi Benahmed et al., 2022).

O Médico Dentista deve realizar sondagem para vigiar a zona peri-implantar e diagnosticar precocemente alguma patologia (Lindhe & Meyle, 2008).

O tratamento não cirúrgico de lesões peri-implantares é imprevisível. No tratamento cirúrgico o objetivo é obter acesso à superfície do implante para desbridamento e descontaminação, a fim de alcançar a resolução do processo inflamatório (Lindhe & Meyle, 2008).

Reduzir as partículas de titânio libertadas no tecido peri-implantar por fricção e/ou corrosão eletroquímica pode ajudar a prevenir a peri-implantite (李悦 et al., 2023).

1.5. Inflamação

A inflamação é um conjunto de respostas fisiológicas protetoras a patógenos e consiste no recrutamento de leucócitos para áreas de infeção. A inflamação pode eliminar os patógenos e ser resolvida, levando à cicatrização dos tecidos, ou permanecer não resolvida, desencadeando processos patológicos nos órgãos (Arulselvan et al., 2016; Paul et al., 2021).

A doença periodontal desencadeia a produção de mediadores inflamatórios. Esses processos levam à perda da estrutura e função do tecido (Paul et al., 2021).

Na peri-implantite estão presentes macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e células plasmáticas (Fretwurst et al., 2021). No entanto, os macrófagos também desempenham um papel importante na homeostase óssea e na integração óssea em redor dos implantes dentários (Miron & Bosshardt, 2016).

Os macrófagos podem ser induzidos a assumir diferentes fenótipos e a tornarem-se protagonistas da progressão ou resolução da doença (Stöger et al., 2012). Os fenótipos M1 e M2 são conhecidos por serem pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, respetivamente (Garlet & Giannobile, 2018).

A expressão do fenótipo M1 é significativamente maior em locais de peri-implantite quando comparadas com locais de periodontite (Galarraga-Vinueza et al., 2021), sendo também associada à gravidade da peri-implantite (Garaicoa-Pazmino et al., 2019). Este, para além de ser pró-inflamatório, também é um indutor de efeitos osteolíticos (Garaicoa-Pazmino et al., 2019).

Já o fenótipo M2 tem a capacidade de desencadear respostas angiogénicas e a expressão do fator de crescimento endotelial pode acelerar a resolução da inflamação (Feito et al., 2019).

A inflamação periodontal está associada a um aumento dos fenótipos M1 e M2 dos macrófagos, nos quais uma mudança fenotípica de M2 para M1 pode ser um mecanismo mediador do dano ao tecido periodontal, incluindo a perda óssea alveolar (Yu et al., 2016).

As lesões de peri-implantite progridem mais rapidamente do que as lesões de periodontite devido à quantidade e expressão fenotípica de macrófagos (Fretwurst et al., 2020; Schwarz et al., 2018).

1.6. Vasos sanguíneos

Os vasos sanguíneos são formados por várias camadas, as túnicas (Figura 4). A túnica mais interna, a túnica íntima, consiste no endotélio e numa fina camada de TC laxo, sendo que no caso das artérias existe ainda uma lâmina elástica interna a separar esta túnica da túnica média. A camada intermediária, túnica média, é composta essencialmente por células musculares lisas em camadas concêntricas, sendo que mais uma vez, nas artérias existem lâminas de material elástico. Por fim, a túnica adventícia, é

constituída por TC, colagénio do tipo I e fibras elásticas. Nos capilares apenas está presente a túnica íntima (Junqueira & Carneiro, 2013).

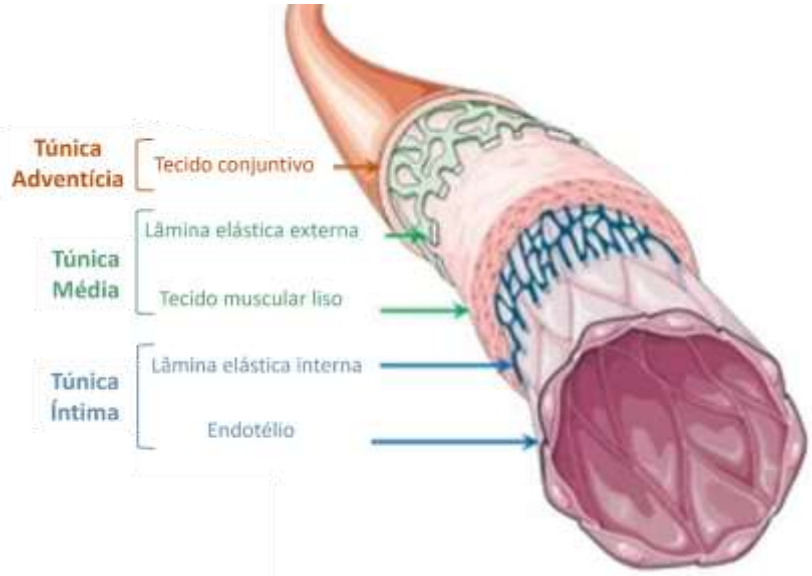


Figura 4 - Túnicas (Adaptado de Pan et al., 2022).

O endotélio vascular é a estrutura mais interna que reveste as paredes internas das artérias, capilares e veias (Krüger-Genge et al., 2019).

As **células endoteliais** (CEs) são células polarizadas e a sua forma é variada, mas geralmente são finas e alongadas, possuem aproximadamente 30 a 50 µm de comprimento, 10 a 30 µm de largura e uma espessura de 0,1 a 10 µm. As CE são orientadas ao longo do eixo do vaso na parede do vaso sanguíneo para minimizar as forças exercidas pelo sangue em circulação (Lee et al., 1999).

Existem células, os **pericitos**, que envolvem regiões das células endoteliais. Estes encontram-se envolvidos numa lâmina basal própria, no entanto, por vezes é difícil a distinção da lâmina basal das CEs. Os pericitos participam no processo de reparação dos tecidos, uma vez que têm a capacidade de se diferenciar e formar novos vasos sanguíneos ou até mesmo células do TC (Junqueira & Carneiro, 2013).

As CEs regulam, em coordenação com as células musculares lisas vasculares, o fluxo sanguíneo para os tecidos, em conjunto com outros elementos que circulam dentro e fora dos tecidos e com a vasorregulação local (Michiels, 2003).

O endotélio controla ativamente o grau de constrição vascular, o extravasamento de solutos, fluídos, hormonas e macromoléculas (Mehta & Malik, 2006), bem como de plaquetas e células sanguíneas (Krüger et al., 2013).

Em condições fisiológicas normais, a CE permanece em estado de repouso. No entanto, em resposta a lesões teciduais ou condições de hipoxia, as CEs podem formar novos vasos, um processo chamado angiogénese (Carmeliet & Jain, 2011).

1.6.1. Angiogénese

O processo de angiogénese, definido como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, tem um papel importante na reparação, expansão e remodelação tecidual em processos fisiológicos, como cicatrização de feridas (Barrientos et al., 2008; Bikfalvi, 2017), ovulação e desenvolvimento embrionário, e em várias patologias, incluindo tumores, aterosclerose, inflamação crónica (Bikfalvi, 2017) ou diabetes *mellitus* (Ribot et al., 2017).

Durante a angiogénese, uma inflamação local moderada contribui para a formação dos vasos, enquanto uma inflamação sistémica dificulta o seu desenvolvimento (Liu et al., 2020).

A angiogénese é dependente das interações essenciais entre CEs, pericitos (Blocki et al., 2018), células inflamatórias como macrófagos (Beyer et al., 2018) e outras células adjacentes associadas com a matriz extracelular (MEC) e a membrana basal (MB) vascular (Hughes, 2008).

A primeira etapa envolve a abertura dos capilares existentes e a degradação parcial dos capilares circundantes. Ao iniciar este processo, as CEs adotam uma função proteolítica e começam a quebrar a MB através de metaloproteinases de matriz (MMPs). MMP e seus inibidores endógenos, inibidores tecidulares das MMPs (ITMPs), regulam a degradação da matriz extracelular, remodelação, adesão celular e crescimento celular. Nesse processo, as CEs perdem o contacto com a lâmina da MB e ficam expostas ao colagénio, ativando cascatas de sinalização responsáveis pela reorganização e formação de novos vasos (Figura 5) (Hughes, 2008).

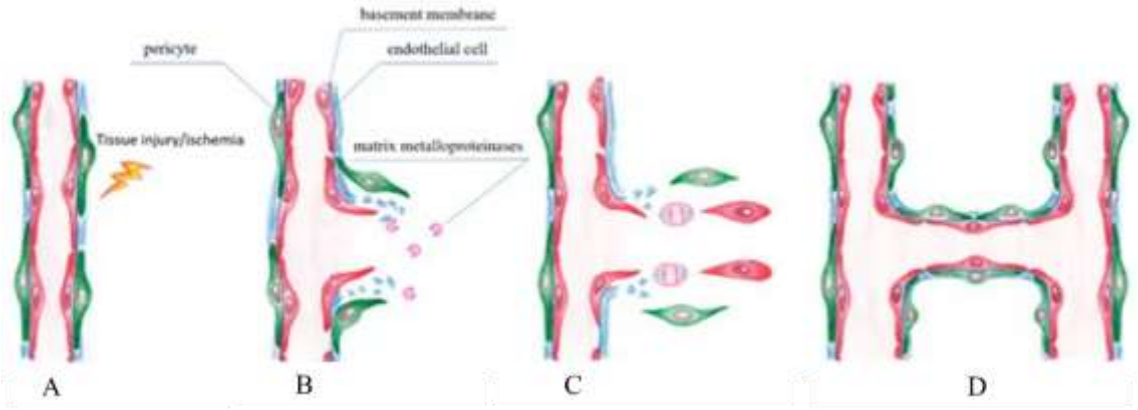


Figura 5 - Angiogénese: A - vaso sanguíneo em repouso; B - Degradação da membrana basal e descolamento celular; C - Proliferação e migração celular; D - Fusão e maturação dos vasos (Adaptado de Krüger-Genge et al., 2019).

Os **vasos do tipo H** são um subtipo de vasos sanguíneos que se distribuem essencialmente pela metáfise dos ossos (Kusumbe et al., 2014; Langen et al., 2017) e que são anastomosados por ansas ou arcos distais a outros vasos, cuja organização tem aspeto colunar (Kusumbe et al., 2014).

Estes são essenciais na modulação da formação e regeneração óssea, aumentando a massa óssea e acelerando a sua formação (Peng et al., 2020) - tendo um papel importante na osteogénese e angiogénese (Zhang et al., 2020). Deste modo, os vasos do tipo H podem ser encontrados preferencialmente em zonas osteogénicas, onde se encontram circundados por focos precursores osteogénicos e adjacentes às áreas de crescimento e remodelação óssea (Marger et al., 2022).

Os vasos do tipo H têm uma elevada tendência para se diferenciarem em artérias que criam a base para uma rede vascular no defeito ósseo. Para além disso, a existência de osteoprogenitores de fator de transcrição relacionado à Runt-2 (Runx2) e Osterix (Osx), que se localizam em redor dos vasos, contribuem também para a regeneração óssea (Kusumbe et al., 2014; Zhang et al., 2020).

As células $Gli1^+$ são uma subpopulação de células estaminais mesenquimatosas (CEMs), espacialmente relacionadas com os vasos tipo H, que acoplam e regulam a vasculatura. Na ocorrência de um defeito ósseo, surge um aumento de vasos do tipo H, bem como um recrutamento de células $Gli1^+$ para a área de cicatrização - o que sugere que estas células emergem e orientam a formação da vasculatura do tipo H no osso reparado (Chen et al., 2020).

Durante a osteógenese, as CEs vasculares do tipo H secretam fatores como Noggin e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que estimulam a proliferação e

diferenciação de osteoprogenitores, contribuindo para a regulação deste processo (Zhang et al., 2020).

O número de vasos H no tecido ósseo diminui tendencialmente com a idade, no entanto o mecanismo subjacente a esta redução ainda não é claro (He et al., 2022).

1.7. Morte celular

A morte celular caracteriza-se pela degeneração irreversível das funções celulares vitais, tais como a produção de ATP (Galluzzi et al., 2018).

Existem vários tipos de morte celular, a morte celular acidental (necrose) e a regulada (apoptose) (Junqueira & Carneiro, 2013).

A **morte celular acidental** ocorre de forma não controlada e existe quebra da membrana plasmática causada por fatores físicos, químicos ou mecânicos externos (Galluzzi et al., 2018). A necrose é caracterizada pela perda de integridade da membrana plasmática e libertação para o espaço extracelular de conteúdos intracelulares, estes ativam respostas imunes, após a fagocitose dos macrófagos, o que pode desencadear reações inflamatórias (Galluzzi et al., 2018; Junqueira & Carneiro, 2013).

A **morte celular regulada** resulta na ativação de módulos de transdução de sinal, podendo ser influenciada farmacologicamente ou geneticamente. Não ocorrendo perturbações da homeostase (Galluzzi et al., 2018). Na apoptose, a morte celular é regulada e executada por enzimas, as caspases, estas possuem atividade catalítica e são responsáveis pela fragmentação do DNA (Nagata, 2005) e formação de corpos apoptóticos (Sebbagh et al., 2001).

A apoptose possui características morfológicas específicas, tais como, fragmentação celular, nuclear e picnose; inicialmente pode haver preservação da integridade da membrana plasmática e posteriormente pode ocorrer eliminação por ação dos macrófagos ou outro tipo de células fagocíticas. Este último processo denomina-se eferocitose, não promovendo assim a inflamação (Galluzzi et al., 2018).

Existe a apoptose intrínseca, que é iniciada por perturbações microambientais extracelulares ou intracelulares (Galluzzi et al., 2018), como danos no DNA ou alterações mitrotubulares (Czabotar et al., 2014), e que se caracteriza pela permeabilização da membrana externa mitocondrial de maneira irreversível e generalizada (Galluzzi et al., 2016). Esta pode ser desencadeada pela família de proteínas BCL-2, levando a uma libertação irreversível de proteínas do espaço intermembranar para o citosol,

nomeadamente o citocromo C. Este por sua vez, ativa as caspases que clivam proteínas vitais ao normal funcionamento da célula, levando à sua morte (Kale et al., 2018).

Já a apoptose extrínseca é iniciada por perturbações microambientais extracelulares que são detetadas por recetores da membrana plasmática (Galluzzi et al., 2018).

1.8. Objetivos

O presente estudo tem como objetivo primário observar histologica e ultraestruturalmente amostras gengivais de peri-implantite e de periodontite. Sendo o objetivo secundário observar células endoteliais para posterior identificação dos vasos H.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Ética

Este projeto foi avaliado e aprovado pela comissão de Ética Egas Moniz (processo interno nº 1176 – anexo 6).

A identificação dos pacientes foi substituída por um código de maneira a garantir confidencialidade e anonimato.

Todas as amostras foram recolhidas por motivos terapêuticos previamente programados, tais como o tratamento periodontal cirúrgico e tratamento de peri-implantites. Todas as intervenções foram realizadas sob condições estritamente estéreis e utilizando anestesia local (articaína 72 mg + epinefrina 0,009 mg / 1,8 mL), em doses mínimas necessárias para o procedimento.

2.2. Local de realização do estudo

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrónica e Histopatologia (Cmicros) e no Laboratório de Morfologia (Morphology Lab) do Centro de Investigação Interdisciplinar da Egas Moniz (CiiEM).

2.3. Critérios de inclusão

- Amostras provenientes de pacientes com peri-implantite e/ou periodontite;
- Amostras fixadas imediatamente após a colheita;
- Amostras recolhidas de pacientes que deram consentimento informado;
- Para MO, amostras com dimensões superiores a 2 mm.

2.4. Critérios de exclusão

- Amostras provenientes de doentes com outras patologias orais que não a peri-implantite e/ou periodontite;
- Amostras não fixadas imediatamente após a colheita;
- Amostras cujos pacientes não deram consentimento informado;
- Amostras destruídas aquando dos procedimentos laboratoriais.

2.5. Grupos de estudo

Foram definidos dois grupos de estudo: grupo A – periodontite (3 amostras) e grupo B - peri-implantite (10 amostras).

2.6. Material

2.6.1. Amostras

- Gengiva humana

2.6.2. Consumíveis

- Acetato de sódio
- Acetato de uranilo a 1%
- Acetato de uranilo a 2%
- Ácido acético
- Ácido clorídrico
- Água ultrapura/bidestilada
- Álcool a 100%
- Álcool a 70%
- Álcool a 96%
- Azul de toluidina 0,1%
- Cacodilato de sódio
- Carbonato de sódio a 2,5%
- Cassetes de plástico
- Cera de dentista
- Citrato de chumbo
- Entellan®
- Eosina
- Epon
- Epóxipropano
- Formaldeído a 4%
- Formol
- Glutaraldeído a 3%
- Grelhas
- Hematoxilina
- Lamelas
- Lâminas
- Parafina
- Pipetas de Pasteur
- Placas de Petri
- Sulfato de cobre anidro
- Tetróxido de ósmio
- Tubos Eppendorf
- Xilol

2.6.3. Equipamento

- Aparelho de inclusão
- Banho-maria
- Cuba de coloração
- Estufa
- Faca de diamante
- Faca de vidro
- Garrafa de esguicho
- Hotte
- MET
- Micrótomo

- MO
- Pinças
- Placa fria
- Placa quente
- Processador de tecidos
- Tina de vidro
- Ultramicrótomo

2.7. Protocolo Experimental

2.7.1. Preparação das amostras para MO

Imediatamente após a colheita, as amostras foram fixadas em formol a 10% tamponado.

2.7.1.1. Processamento

Para realizar o processamento das amostras foi utilizado o processador de tecidos SAKURA Tissue-Tek® II (Figura 6). Após a fixação, de modo a desidratar as amostras, estas foram colocadas em álcool a 70%, seguido de álcool a 96%, novamente álcool a 96%, álcool a 100% por quatro vezes. Em seguida, passaram por dois banhos em xilol e, por fim, em parafina.

2.7.1.2. Inclusão

Seguidamente, foram incluídas em parafina utilizando um aparelho de inclusão Leica® EG11H (Figura 7). Após o enchimento das cassetes, estas foram colocadas na placa fria Leica® EG1130 (Figura 8), até se obterem blocos sólidos de parafina com a amostra incluída (Figura 9).

Figura 6 - Processador de tecidos SAKURA Tissue-Tek® II.

Figura 7 - Aparelho de inclusão Leica® EG11H.

Figura 8 - Placa fria Leica® EG1130.

Figura 9 - Amostras incluídas em parafina.

2.7.1.3. Cortes

Foi utilizado o micrótomo Microm HM 355S (Figura 10) para fazer os cortes das amostras incluídas previamente em parafina. Estes cortes foram feitos com uma espessura de 4 a 5 μm.

Ao serem realizados sucessivos cortes foram formadas ténias. Delicadamente estas foram transportadas para uma tina com água a temperatura ambiente, colocando a parte brilhante da parafina em contacto com a água.

Com ajuda de uma pinça foram separados os vários cortes, em seguida foi colocada uma lâmina num ângulo de 90° para ajudar a transportar o corte para a lâmina.

Posteriormente, transportámos as lâminas com os cortes à cuba de água quente, a cerca de 60° C, onde retirámos parcialmente a amostra da lâmina e a voltámos a colocar. Este passo permitiu distender a amostra.

As lâminas foram colocadas na estufa a uma temperatura de 65° a 70° durante 3 a 4 horas.

2.7.1.4. Coloração

A coloração utilizada foi Hematoxilina-Eosina (HE), considerada a coloração de rotina. Este é um procedimento que demora cerca de 45 minutos (Tabela 1). São necessários vários meios como xilol, álcool, água, hematoxilina, diferenciador e eosina (Figura 11). Sendo que o diferenciador foi feito com 200 mL de álcool a 70% e 1 mL de ácido clorídrico.

Tabela 1 - Etapas da coloração HE.

MEIOS	TEMPO
Xilol	10 min.
Álcool a 100%	1 min.
Álcool a 100%	1 min.
Álcool a 96%	1 min.
Álcool a 70%	1 min.
Água corrente	3 min.
Hematoxilina	8 a 10 min.
Água corrente	3 min.
Diferenciador	Poucos segundos
Água corrente	4 a 5 min.
Álcool a 70%	2 min.
Eosina	1 min.
Álcool a 96%	1 min.
Álcool a 96%	1 min.
Álcool a 100%	1 min.
Álcool a 100%	1 min.
Xilol	5 min.

2.7.1.5. Colocação de lamela

Com a ajuda de uma pinça, colocou-se a lâmina na bancada e verteu-se um fino fio de Entellan® em linha reta sob a lâmina.

Colocou-se uma lamela por cima da amostra lentamente, de modo a não se formem bolhas.

Após este processo aguardou-se que o Entellan® tomasse presa (Figura 12).

Figura 10 - Micrótomo Micron HM 355S.

Figura 11 - Cuba de coloração preparada para coloração HE.

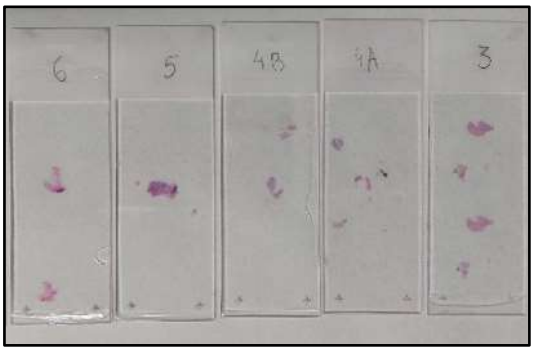


Figura 12 - Lâminas finalizadas para microscopia ótica.

2.7.2. Observação ao MO

Os cortes histológicos foram observados em MO Olympus® CX41, com uma ampliação de 10x, 20x e de 40x. As amostras foram fotografadas com a câmera DFK 33UX262 acoplada ao adaptador Olympus® U-CMAD3, utilizando o *software IC Capture 2.5*, no Laboratório de Morfologia da Egas Moniz School of Health and Science.

2.7.3. Preparação das amostras para MET

2.7.3.1. Fixação

Após a colheita, dispôs-se a amostra numa placa de cera de dentista, por permitir menos deformação durante o corte do que o parafilm®.

Colocaram-se sobre a amostra algumas gotas de fixador glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,3.

Cortou-se a amostra em pequenos fragmentos com uma lâmina de barbear de 2 gumes ou lâmina de micrótomo, esta deve ser limpa previamente com acetona ou clorofórmio para retirar o óleo presente. Durante este processo, se o fixador ficar muito turvo deve ser substituído para remover a contaminação que pode fazer baixar a concentração do fixador.

O corte executou-se fazendo movimentos verticais.

Com uma pipeta de Pasteur, aspirou-se o fixador para um tubo Eppendorf juntamente com amostras incorporadas, a ponta da pipeta faz uma seleção dos fragmentos por tamanho. O tamanho dos fragmentos deve ser no máximo de $1mm^3$. A quantidade de fixador por tamanho de amostra deve ser no mínimo 10/1.

A amostra deve permanecer pelo menos 2 horas no fixador, se necessário poderá ficar *overnight*, devendo este processo ser feito no frio.

No dia seguinte, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, trocou-se o fixador pelo tampão cacodilato de sódio.

2.7.3.2. Processamento

Colocaram-se as amostras em glutaraldeído a 3% durante pelo menos 2 horas, de modo a proceder-se à fixação primária.

Em seguida, fizeram-se 3 lavagens de 10 minutos cada em tampão cacodilato de sódio.

Colocaram-se em tetróxido de ósmio durante 1 hora, dando-se assim a fixação secundária. Este processo foi feito na hotte, uma vez que este composto químico é muito tóxico e corrosivo, e esta permite evitar a exposição a vapores tóxicos.

Lavaram-se novamente 3 vezes em tampão cacodilato de sódio durante 10 minutos cada lavagem. De seguida, lavaram-se 3 vezes em tampão acetato de sódio - ácido acético durante 10 minutos.

As amostras foram colocadas em acetato de uranilo a 1% em tampão acetato de sódio - ácido acético pH 5 – 5.5.

Foram feitas 3 lavagens em tampão acetato de sódio - ácido acético durante 10 minutos cada.

Colocaram-se em álcool a 70% 3 vezes durante 10 minutos cada; de seguida, colocaram-se 3 vezes em álcool a 96% durante 10 minutos cada.

As amostras foram colocadas em álcool absoluto, desidratado com sulfato de cobre anidro.

No passo seguinte, e na hotte, colocaram-se as amostras em epóxipropano 2 vezes durante 15 minutos cada. Foram colocadas na mistura de epóxipropano e epon com diluição de 1:1 inicialmente e, em seguida, apenas em epon no frigorifico *overnight*.

Por fim, incluíram-se as amostras no dia seguinte. Este processo foi realizado na estufa a 65° durante 3 dias.

A água utilizada nas preparações foi ultrapura/bidestilada.

2.7.3.3. Execução dos cortes semifinos

Para realizar esta etapa utilizou-se o ultramicrótomo Reichert-Jung Ultracut E (Figura 13).

Colocou-se o bloco com a amostra no ultramicrótomo e cortou-se o bloco para que a amostra ficasse contida num trapézio.

Encheu-se a faca de vidro com água bidestilada. A aproximação da faca à amostra foi feita com muita precaução para não danificar nem a amostra nem a faca. Quando a faca contactou com a amostra começaram-se a fazer os cortes com uma espessura de 1-2 μm, estes mantiveram-se à superfície da água.

Com a ajuda de um pequeno pincel improvisado com um palito, cera e um pelo de pestana levou-se o corte para um arame que nos ajudou a transportá-lo para a lâmina.

Colocou-se a lâmina na placa quente a 60-70°C para os cortes aderirem.

2.7.3.4. Coloração dos cortes semifinos

Após a evaporação da água da lâmina foi possível avançar para a coloração.

Cobriram-se os cortes com solução aquosa de carbonato de sódio a 2,5%, e colocaram-se 2 gotas de solução aquosa de azul de toluína 0,1%. Após alguns segundos passou-se a lâmina por água corrente. Voltou-se a colocar a lâmina na placa quente para que a amostra secasse, e por fim, verificou-se a coloração através do MO, tomando como referência o fundo da imagem.

Obtiveram-se desta maneira os cortes semifinos corados (Figura 14).

Figura 13 - Ultramicrótomo Reichert-Jung Ultracut E.

Figura 14 - Cortes semifinos.

2.7.3.5. Execução dos cortes ultrafinos

Após a observação dos cortes semifinos no MO foi realizada a seleção da região a observar em MET.

Em seguida, colocou-se o bloco no ultramicrótomo e, com a ajuda de uma lâmina de barbear, foi cortado de modo a obter uma pequena pirâmide com a área pretendida.

Posicionou-se o bloco no braço do micrótomo e com a faca de diamante igualmente preenchida com água bidestilada (tal como a faca de vidro anteriormente referida) fizeram-se cortes, ficando estes à superfície da água (Figura 15).

Com espessuras de 60 a 90 nm, obtêm-se cortes prateados, considerados os ideais para as nossas observações; a espessura dos cortes pode ser avaliada pela cor que apresentam à superfície da água com luz refletida (superfície espelhada), os cortes cinzentos têm espessuras menores e os cortes dourados ou azulados, espessuras maiores (Figura 16).

A grelha foi previamente lavada com clorofórmio.

Em seguida, os cortes são colhidos tocando-lhes com a superfície baça da grelha, à qual aderem.

2.7.3.6. Contrastação das grelhas

Numa placa de Petri colocou-se uma gota de acetato de uranilo a 2% por cada grelha. A face baça da grelha, onde se localizam os cortes, foi colocada sob a gota de modo a estes ficarem em contacto com o produto. Ao fim de 1 hora, a grelha foi lavada com água bidestilada usando uma garrafa de esguicho.

Por fim, colocou-se uma gota de citrato de chumbo na placa de Petri e, tal como realizado anteriormente, colocou-se a grelha sob a mesma (Figura 17). Após 4 minutos, foi realizada uma lavagem com água bidestilada.

Figura 15 – Ultramicrótomo com faca de diamante.

Figura 16 - Cortes ultrafinos.

Figura 17 - Contrastação das grelhas.

2.7.4. Observação ao MET

As grelhas foram observadas e fotografadas com MET JEOL 1200EX no Laboratório de Microscopia Eletrónica e Histopatologia (Cmicros) da Egas Moniz School of Health and Science.

III. RESULTADOS

De acordo com os critérios de inclusão/exclusão, foram estudadas 13 amostras, divididas em 2 grupos.

No grupo A (periodontite) foram consideradas 3 amostras. Todas as amostras deste grupo foram observadas por MO e por MET.

No grupo B (peri-implantite) foram consideradas 10 amostras. Todas as amostras deste grupo foram observadas por MO e 2 delas foram também observadas por MET.

3.1. Resultados de MO

A totalidade das amostras dos dois grupos foi observada através do MO Olympus® CX41 e fotografadas pela câmera DFK 33UX262 acoplada ao adaptador Olympus® U-CMAD3, utilizando o *software IC Capture 2.5*.

3.1.1. Grupo A - periodontite

As observações por MO permitiram a identificação de várias áreas com epitélio de revestimento estratificado pavimentoso e tecido conjuntivo de suporte (Figura 18), para além disso também foi possível encontrar áreas com um importante infiltrado inflamatório (Figura 19).

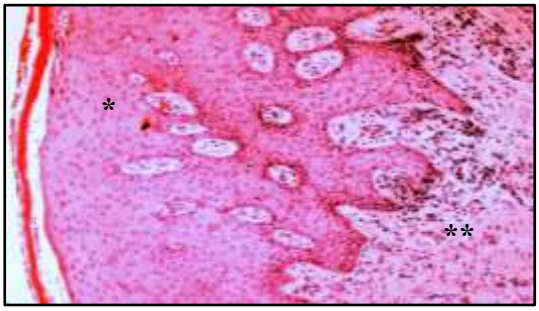


Figura 18 - Imagem de MO de periodontite: epitélio de revestimento (*) sobre o tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo (**). Ampliação de 4x.

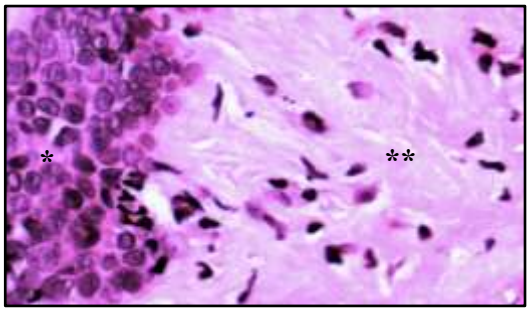


Figura 19 - Imagem de MO de periodontite: epitélio estratificado (*) e infiltrado inflamatório com plasmócitos, macrófagos e linfócitos (**). Ampliação de 40x.

3.1.2. Grupo B – peri-implantite

No grupo B, foi observado um elevado infiltrado de células inflamatórias, composto por plasmócitos, linfócitos e macrófagos, com aparentes alterações morfológicas (Figura 20). Em algumas regiões os macrófagos apresentaram-se organizados em paliçada (Figura 21).

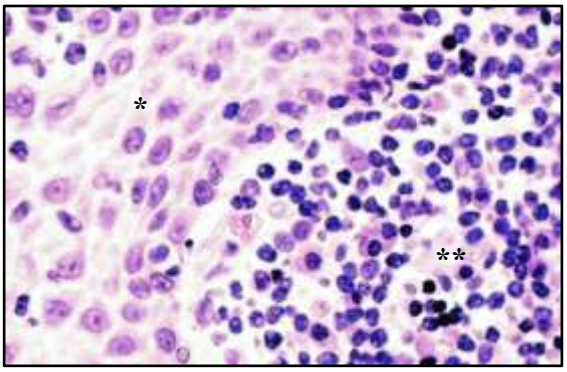


Figura 20 - Imagem de MO de peri-implantite: epitélio estratificado (*) e intenso infiltrado inflamatório com plasmócitos, macrófagos e linfócitos com aparentes alterações morfológicas (**). Ampliação de 40x.

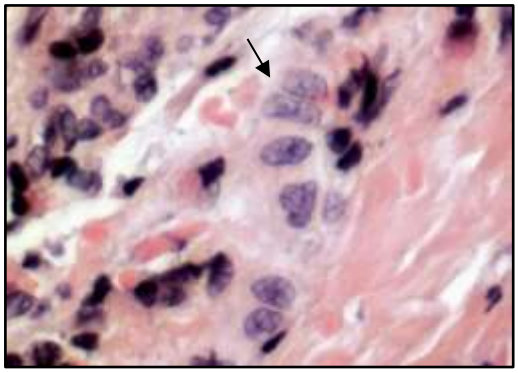


Figura 21 - Imagem de MO de peri-implantite: macrófagos em paliçada (seta). Ampliação de 40x.

Observaram-se vasos sanguíneos rodeados de células inflamatórias (Figuras 22 e 23). Foram encontradas zonas com agregados de material basófilo o que sugere alguma necrose na região (Figura 24.)

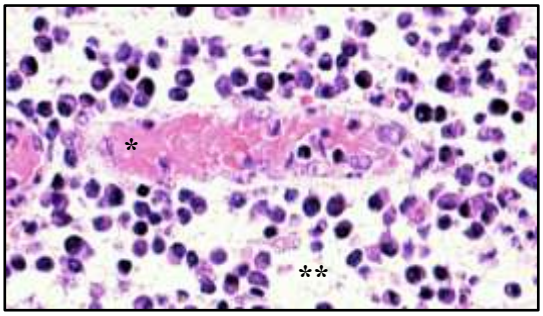


Figura 22 - Imagem de MO de peri-implantite: Vaso sanguíneo com endotélio alto (*) rodeado de células polimorfonucleares, algumas das quais em aparente degradação (**). Ampliação de 40x.

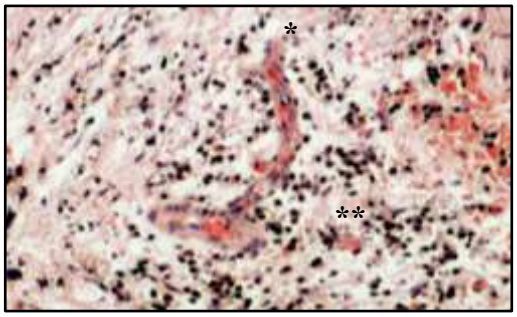


Figura 23 - Imagem de MO de peri-implantite: vaso sanguíneo (*) com tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório (**). Ampliação de 4x.

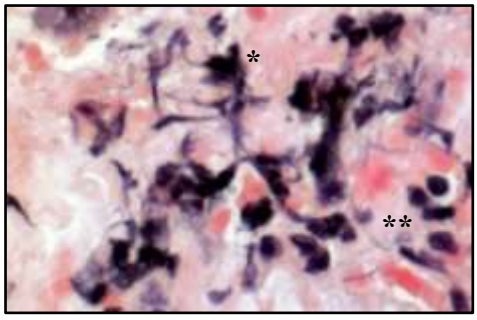


Figura 24 - Imagem de MO de peri-implantite: agregado de material basófilo (*) e alterações celulares estruturais (**). Ampliação de 40x.

3.2. Resultados de MET

Através de MET foram observadas as 3 amostras do grupo A – periodontite; e 2 das amostras do grupo B – peri-implantite. O MET utilizado foi o JEOL 1200EX.

3.2.1. Grupo A – periodontite

No TC foi possível visualizar fibroblastos (Figuras 25 e 26) rodeados de fibras de colagénio (Figura 27). Em ampliações superiores foram observadas partes do citoesqueleto da célula (Figura 28). Muitas das células apresentam alterações morfológicas como a condensação da cromatina (Figura 29).

Foram identificados macrófagos (Figuras 30, 31 e 34), alguns deles já em degradação (Figura 32) e apoptose (Figura 33).

Também linfócitos foram observados (Figuras 34 e 35). E plasmócitos com o retículo endoplasmático dilatado (Figuras 36 e 37).

Foram observados vasos sanguíneos (Figuras 38 e 39), alguns deles com a membrana basal espessada (Figura 40). Em redor destes vasos foi possível visualizar pericitos (Figuras 40 e 41). Com ampliações superiores evidenciaram-se as células endoteliais (Figuras 42, 43 e 44), bem como os desmossomas que permitem a sua junção (Figura 45).

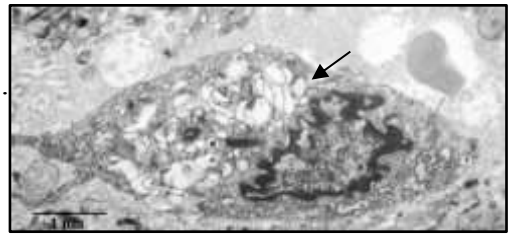


Figura 25 - Imagem de MET de periodontite: fibroblasto no tecido conjuntivo. Observa-se o complexo de Golgi perinuclear (seta).

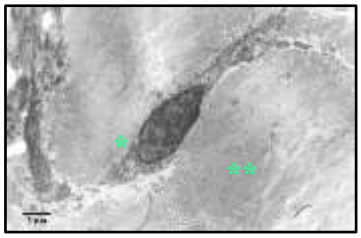


Figura 26 - Imagem de MET de periodontite: fibroblasto (*) rodeado de colagénio e tecido conjuntivo denso (**).

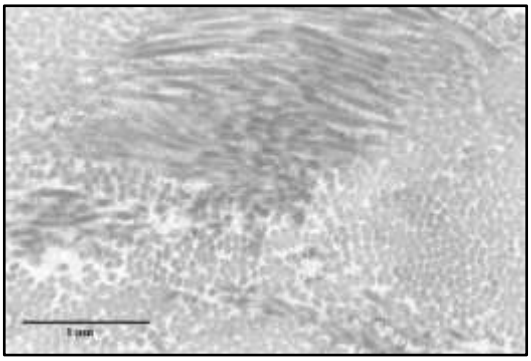


Figura 27 - Imagem de MET de periodontite: fibras de colagénio.

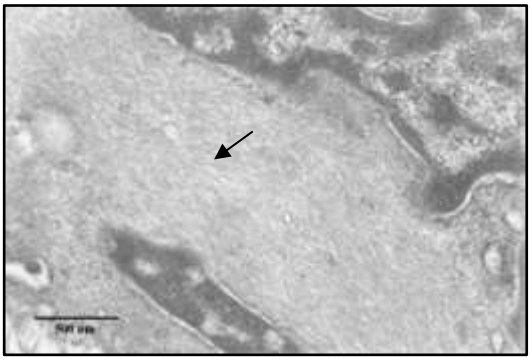


Figura 28 - Imagem de MET de periodontite: filamentos de vimentina presente num fibroblasto (seta).

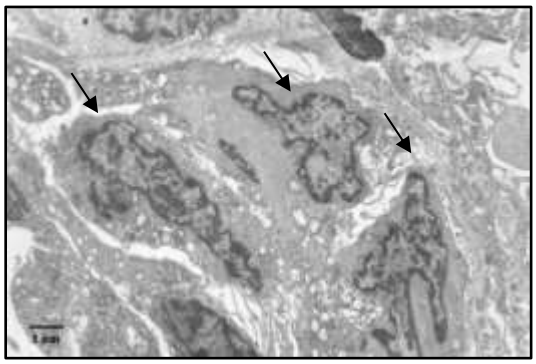


Figura 29 - Imagem de MET de periodontite: fibroblastos com alterações (seta).

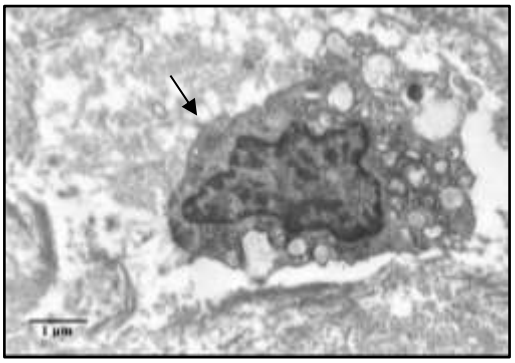


Figura 30 - Imagem de MET de periodontite: macrófago (seta).

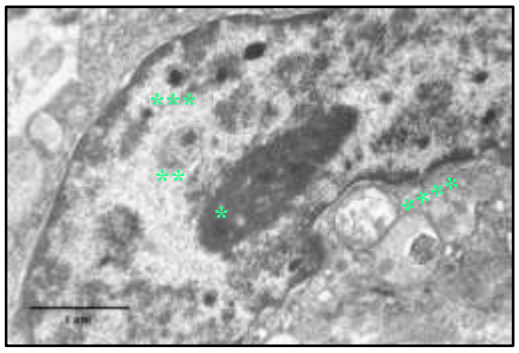


Figura 31 - Imagem de MET de periodontite: macrófago com nucléolo visível (*), corpos nucleares (**), grânulos intercromatínicos (***) e vacúolos (****).

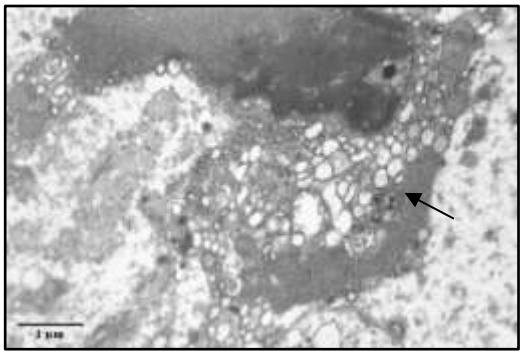


Figura 32 - Imagem de MET de periodontite: macrófago em aparente estado de necrose (seta).

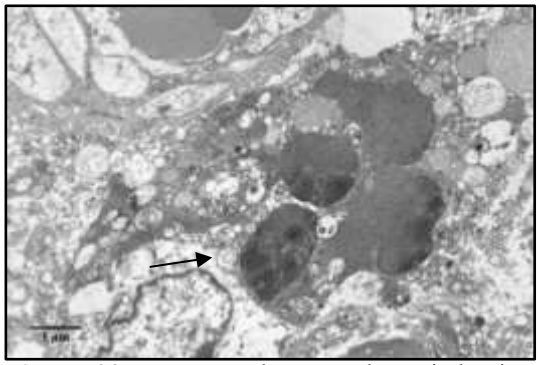


Figura 33 - Imagem de MET de periodontite: macrófago em estado de apoptose (seta).

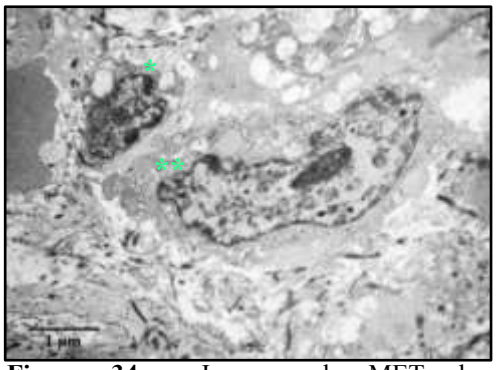


Figura 34 - Imagem de MET de periodontite: linfócito (*) e macrófago (**) no tecido conjuntivo.

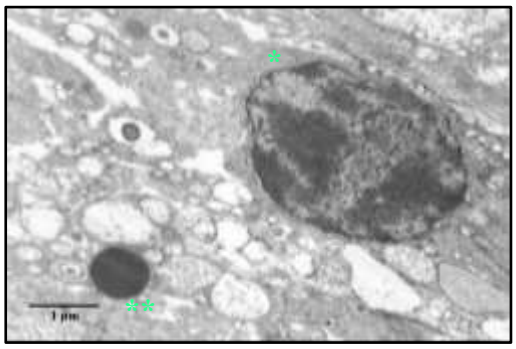


Figura 35 - Imagem de MET de periodontite: linfócito (*) e eritrócito (**).

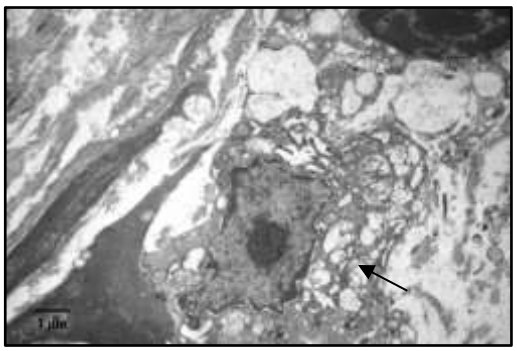


Figura 36 - Imagem de MET de periodontite: plasmócito com retículo endoplasmático dilatado (seta).

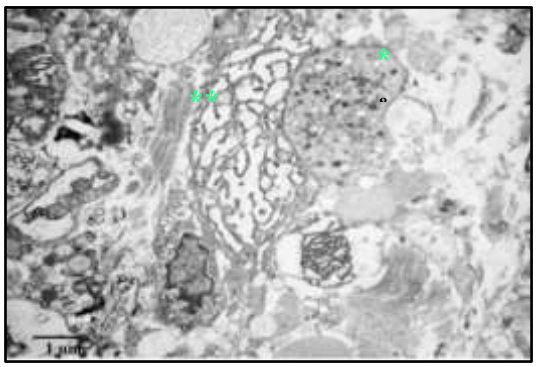


Figura 37 - Imagem de MET de periodontite: plasmócito e granulócito (*) no tecido conjuntivo. Observa-se o contacto próximo entre as células e o retículo endoplasmático dilatado (**).

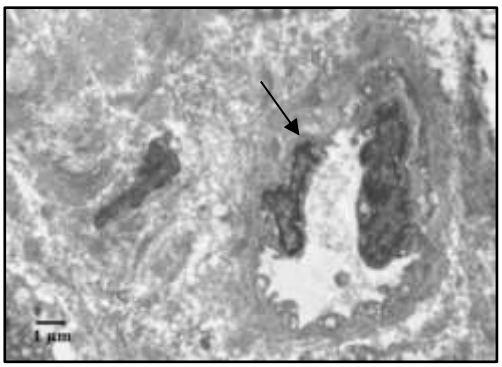


Figura 38 - Imagem de MET de periodontite: vaso sanguíneo com células endoteliais (seta).

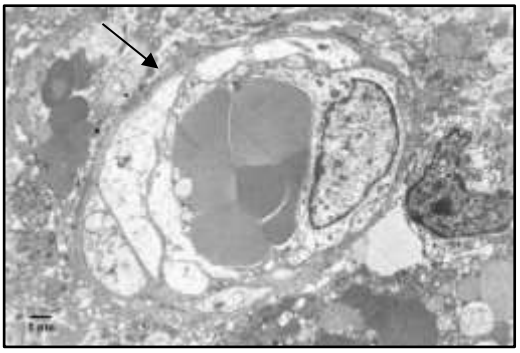


Figura 39 - Imagem de MET de periodontite: endotélio dilatado preenchido de eritrócitos (seta).

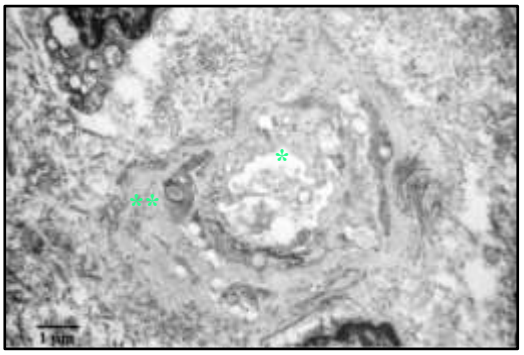


Figura 40 - Imagem de MET de periodontite: pequeno capilar (*) rodeado por pericitos (**) e membrana basal espessada.

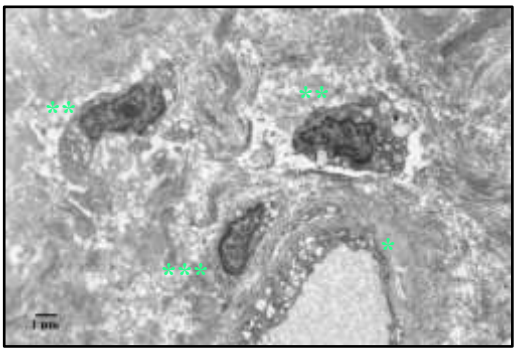


Figura 41 - Imagem de MET de periodontite: endotélio (*), macrófagos (**) e pericito (***).

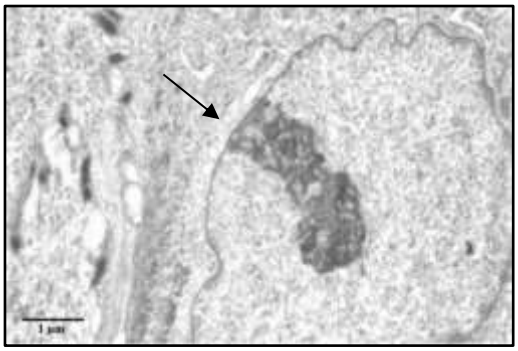


Figura 42 - Imagem de MET de periodontite: núcleo característico de célula epitelial (seta).

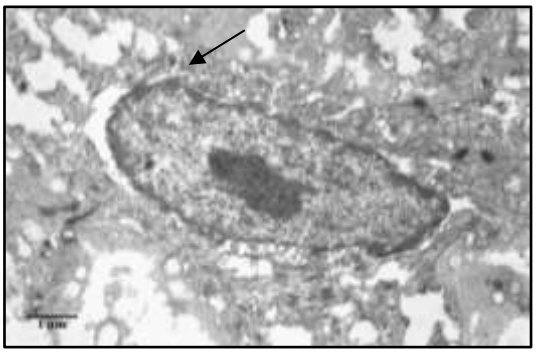


Figura 43 - Imagem de MET de periodontite: núcleo de célula epitelial (seta).

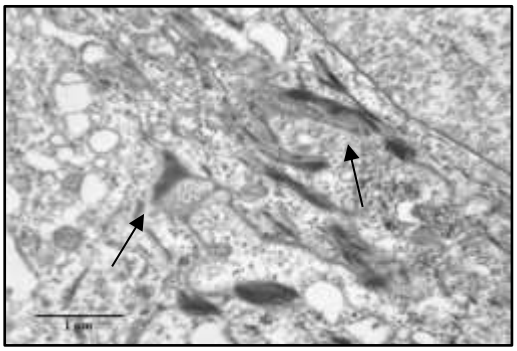


Figura 44 - Imagem de MET de periodontite: tonofilamentos de célula epitelial (seta).

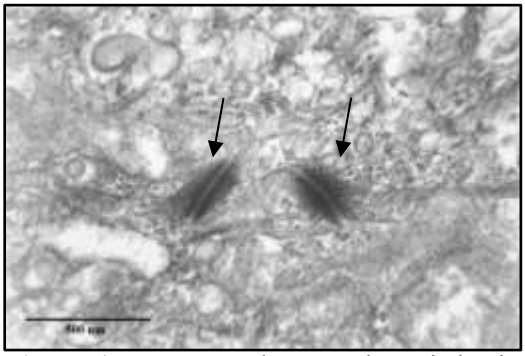


Figura 45 - Imagem de MET de periodontite: desmossomas nas células epiteliais (seta).

3.2.2. Grupo B – peri-implantite

Nas amostras de peri-implantite através de MET foi possível identificar fibroblastos (Figura 46), linfócitos em aparente necrose (Figuras 47 e 48), plasmócitos com um extenso RER (Figura 49). Alguns dos organelos observados apresentaram alterações, como é o caso das mitocôndrias (Figura 50).

Também foram observados vasos sanguíneos (Figuras 51), alguns deles com desdobramentos da membrana basal (Figura 52). Tal como nas amostras de periodontite, foram encontrados pericitos junto aos vasos (Figura 53).

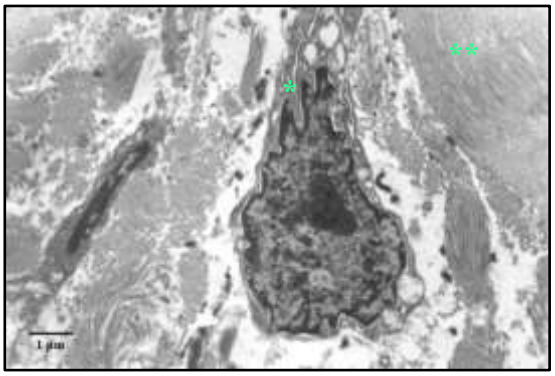


Figura 46 - Imagem de MET de peri-implantite: fibroblasto (*) e fibras de colagénio (**).

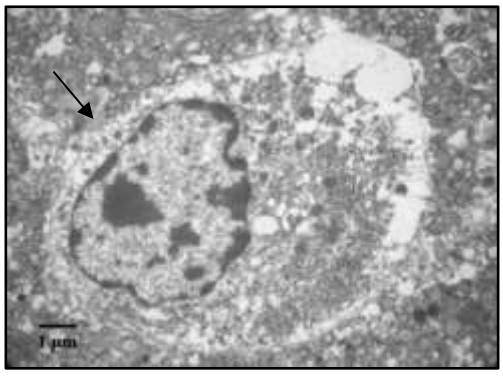


Figura 47 - Imagem de MET de peri-implantite: macrófago (seta) em zona necrosada (cromatina condensada).

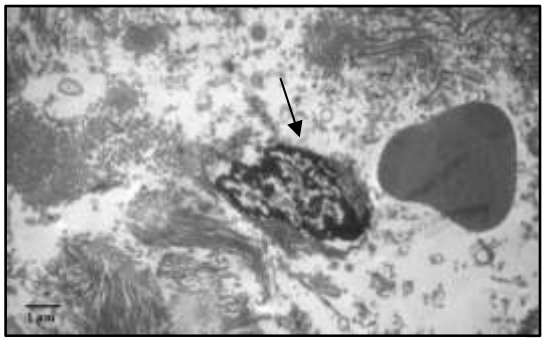


Figura 48 - Imagem de MET de peri-implantite: linfócito em degradação (seta).

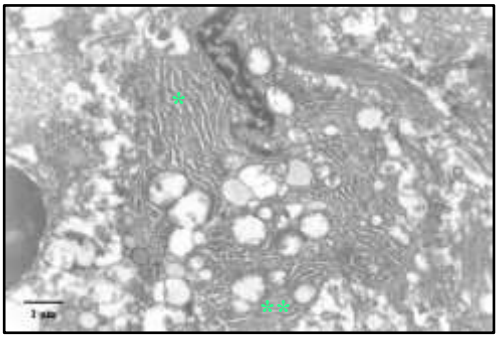


Figura 49 - Imagem de MET de peri-implantite: RER (*) e mitocôndrias (**) de plasmócito.

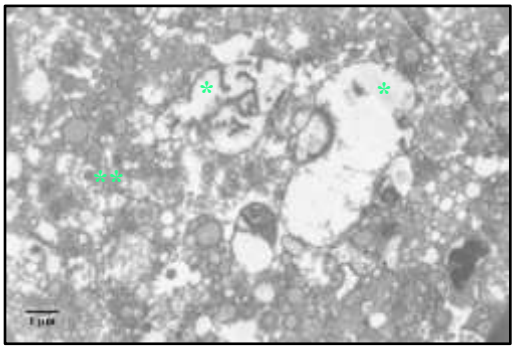


Figura 50 - Imagem de MET de peri-implantite: mitocôndrias turgidas (*) e corpos multivesiculados (**).

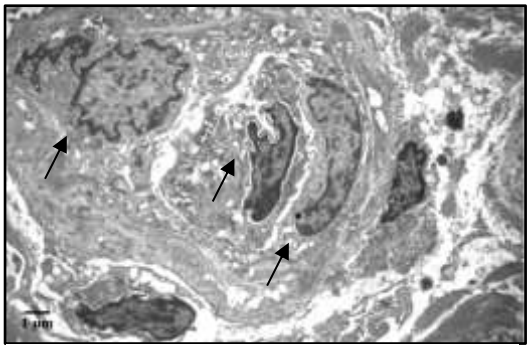


Figura 51 - Imagem de MET de peri-implantite: células endoteliais (seta).

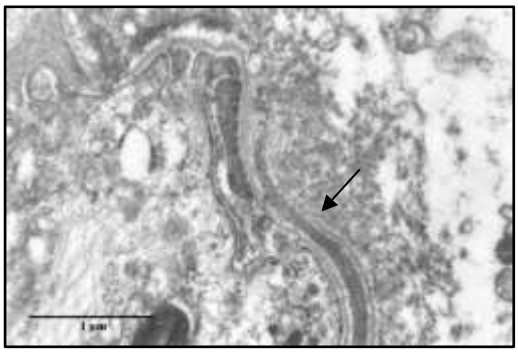


Figura 52 - Imagem de MET de peri-implantite: membrana basal da célula endotelial com desdobramento (seta).

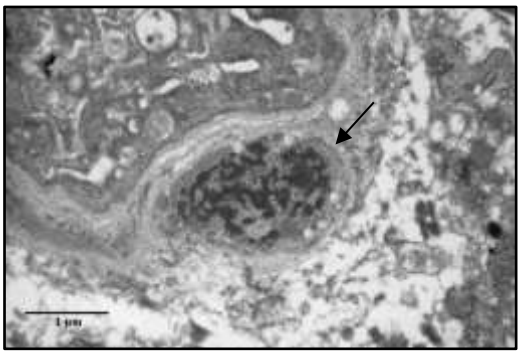


Figura 53 - Imagem de MET de peri-implantite: pericito em necrose (seta).

IV. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível constatar que na peri-implantite existe um maior infiltrado de células inflamatórias quando comparado com a periodontite. Tal foi anteriormente verificado nos estudos de Berglundh et al. (2011) e Schwarz et al. (2018); inclusive, nos estudos de Carcuac & Berglundh (2014) foram contabilizadas o dobro das células inflamatórias na peri-implantite comparativamente ao número de células inflamatórias observadas na periodontite.

Quanto ao tipo de células inflamatórias presentes nestas patologias, os nossos primeiros resultados vão de encontro aos estudos de Berglundh et al. (2011), Carcuac & Berglundh (2014) e de Chaparro et al. (2020) onde se observaram macrófagos, linfócitos e plasmócitos como células presentes em ambas as patologias. Quando comparadas com as lesões de gengivite, as lesões de periodontite são maiores e contêm um maior número de plasmócitos e macrófagos (Thorbert-Mros et al., 2015).

De acordo com os estudos de Thorbert-Mros et al. (2015), na periodontite foram encontrados linfócitos B e T na região adjacente ao epitélio da bolsa, e as células plasmáticas observadas concentraram-se mais na região periférica da lesão.

De acordo com a literatura, parece haver um predomínio de plasmócitos e de linfócitos na periodontite enquanto que os neutrófilos e os macrófagos são tendencialmente mais numerosos na peri-implantite (Berglundh et al., 2011). Na nossa opinião, este dado carece de mais estudos, uma vez que a maioria dos trabalhos não especifica o fenótipo dos macrófagos encontrados nestas lesões. Ainda assim, é sabido que os macrófagos podem ser induzidos a assumir diferentes fenótipos e desempenhar um papel importante na progressão ou resolução da doença (Stöger et al., 2012) . De acordo com Garlet & Giannobile (2018), o fenótipo M1 é pró-inflamatório e o M2 é anti-inflamatório. Um dos poucos estudos onde este importante aspeto é referido, afirma que a expressão do fenótipo M1 é significativamente maior em locais de peri-implantite quando comparadas com locais de periodontite, pelo que parece associar-se à gravidade da peri-implantite e aumentar o efeito osteolítico (Garaicoa-Pazmino et al., 2019). Já o fenótipo M2 tem a capacidade de desencadear respostas angiogénicas e a expressão do fator de crescimento endotelial pode acelerar a resolução da inflamação (Feito et al., 2019). Julgamos que é importante ter em linha de conta os resultados de Yu et al. (2016) que afirmam que a inflamação periodontal pode estar

associada a um aumento dos fenótipos M1 e M2 dos macrófagos, nos quais uma mudança fenotípica de M2 para M1 pode ser um mecanismo mediador do dano ao tecido periodontal, incluindo a perda óssea alveolar. Considerando que as lesões de peri-implantite progridem mais rapidamente do que as lesões de periodontite, devido à quantidade e expressão fenotípica de macrófagos (Fretwurst et al., 2020; Schwarz et al., 2018), é pertinente aumentar a nossa amostra e marcar o fenótipo dos macrófagos presentes em ambas as lesões.

Tanto mais que a capacidade de desencadear respostas angiogénicas na presença dos macrófagos M2 e a expressão do fator de crescimento endotelial nas condições inflamatórias, deve, na nossa opinião, ser motivo suficiente para procurar estudar com mais detalhe as alterações das células endoteliais observadas no nosso estudo. Sabe-se que, aquando da reorganização e formação de novos vasos, as células endoteliais perdem o contacto com a lâmina da membrana basal (Hughes, 2008). Alterações ao nível da membrana destas células foram também observadas ultraestruturalmente nas nossas amostras.

Por outro lado, têm sido referidas alterações celulares que refletem alterações tecidulares nas condições patológicas, como por exemplo: a remodelação das cristas mitocondriais sugere a possibilidade de que mudanças morfológicas possam geralmente ocorrer no início do processo apoptótico (Scorrano et al., 2002), tais como o edema ou rutura (Elmore, 2007). Sabe-se ainda que a apoptose pode não ocorrer sem a ativação da maquinaria de cisão mitocondrial (Karbowski & Youle, 2003). Os resultados das nossas observações parecem ir de encontro a este tipo de alterações, uma vez que foram observadas por MET mitocôndrias com alterações morfológicas sugestivas de apoptose.

Nalgumas patologias, como na glomeronefrite, é comum encontrar duplicação da membrana basal devido à inflamação presente (Hashimoto et al., 2019; Mii et al., 2022). No presente estudo, nas áreas de maior infiltrado inflamatório, foram observadas duplicações da membrana basal ao nível das células endoteliais.

4.1. Limitações e perspetivas futuras

A limitação deste estudo é o facto de não ter sido possível obter amostras com tecido ósseo, uma vez que estas provêm do tratamento cirúrgico de doenças periodontais e peri-implantares em humanos.

Futuramente pretendemos utilizar marcadores imuno-histoquimicos para a identificação de células inflamatórias e marcadores endoteliais como o CD31 e a endomucina para a identificação e caracterização dos vasos H.

V. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta investigação mostraram um aumento do infiltrado de células inflamatórias na peri-implantite, quando comparada com a periodontite.

Estas patologias revelaram a presença de vários tipos de células inflamatórias, como macrófagos, linfócitos e plasmócitos.

As células endoteliais apresentaram alterações ultraestruturais em ambas as patologias.

Na continuidade deste estudo, sugere-se a identificação do fenótipo dos macrófagos observados, bem como a imuno-marcação das células endoteliais numa amostra maior.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo, M. G., & Lindhe, J. (2018). Peri-implant health. *Journal of Periodontology*, *89 Suppl 1*, S249–S256. https://doi.org/10.1002/JPER.16-0424

Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., & Kumar, S. S. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/5276130

Avery, J. K., & Chiego, D. J. (2006). *Essentials of Oral Histology and Embryology* (Mosby Elsevier, Ed.; 3rd edition).

Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration : Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, *16*(5), 585–601. https://doi.org/10.1111/J.1524-475X.2008.00410.X

Baskaradoss, J. K. (2018). Relationship between oral health literacy and oral health status. *BMC Oral Health*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/S12903-018-0640-1

Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P. M., Chen, S., Cochran, D., Derks, J., Figuero, E., Hämmerle, C. H. F., Heitz-Mayfield, L. J. A., Huynh-Ba, G., Iacono, V., Koo, K. T., Lambert, F., McCauley, L., Quirynen, M., Renvert, S., … Zitzmann, N. (2018). Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, *89*(1), S313–S318. https://doi.org/10.1002/JPER.17-0739

Berglundh, T., Zitzmann, N. U., & Donati, M. (2011). Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *Journal of Clinical Periodontology*, *38 Suppl 11*(SUPPL. 11), 188–202. https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2010.01672.X

Berkovitz, B. K. B., Holland, G. R., & Moxham, B. J. (2004). *Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal* (Artemed Editora, Ed.; 3ª edição).

Beyer, S., Koch, M., Lee, Y. H., Jung, F., & Blocki, A. (2018). An In Vitro Model of Angiogenesis during Wound Healing Provides Insights into the Complex Role of Cells and Factors in the Inflammatory and Proliferation Phase. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10). https://doi.org/10.3390/IJMS19102913

Bikfalvi, A. (2017). History and conceptual developments in vascular biology and angiogenesis research: a personal view. *Angiogenesis*, *20*(4), 463–478. https://doi.org/10.1007/S10456-017-9569-2/METRICS

Blocki, A., Beyer, S., Jung, F., & Raghunath, M. (2018). The controversial origin of pericytes during angiogenesis - Implications for cell-based therapeutic

angiogenesis and cell-based therapies. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, *69*(1–2), 215–232. https://doi.org/10.3233/CH-189132

Botelho, J., Machado, V., Proença, L., Alves, R., Cavacas, M. A., Amaro, L., & Mendes, J. J. (2019). Study of Periodontal Health in Almada-Seixal (SoPHiAS): a cross-sectional study in the Lisbon Metropolitan Area. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/S41598-019-52116-6

Carcuac, O., & Berglundh, T. (2014). Composition of human peri-implantitis and periodontitis lesions. *Journal of Dental Research*, *93*(11), 1083–1088. https://doi.org/10.1177/0022034514551754

Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, *473*(7347), 298–307. https://doi.org/10.1038/NATURE10144

Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Periodontology*, *89*(S1), S1–S8. https://doi.org/10.1002/JPER.18-0157

Chaparro, A., Sanz, A., Wolnitzky, A., Realini, O., Bendek, M. J., Betancur, D., Albers, D., & Beltrán, V. (2020). Niveles de citoquinas quimiotácticas de linfocitos B y Th17 en el fluido crevicular periimplantario de pacientes con implantes sanos, perimucositis y periimplantitis. *Journal of Oral Research*, *1*(1), 20–25. https://doi.org/10.17126/%x

Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G. A., … Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, *89 Suppl 1*, S74–S84. https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719

Chen, J., Li, M., Liu, A. Q., Zheng, C. X., Bao, L. H., Chen, K., Xu, X. L., Guan, J. T., Bai, M., Zhou, T., Sui, B. D., Li, D. H., Jin, Y., & Hu, C. H. (2020). Gli1+ Cells Couple with Type H Vessels and Are Required for Type H Vessel Formation. *Stem Cell Reports*, *15*(1), 110–124. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.06.007

Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(1), 49–63. https://doi.org/10.1038/NRM3722

Drake, M. J., Hedlund, P., Andersson, K. E., Brading, A. F., Hussain, I., Fowler, C., & Landon, D. N. (2003). Morphology, Phenotype and Ultrastructure of Fibroblastic Cells from Normal and Neuropathic Human Detrusor: Absence of Myofibroblast Characteristics. *The Journal of Urology*, *169*(4), 1573–1576. https://doi.org/10.1097/01.JU.0000054928.34777.37

Ebenezer, S., Kumar, V. V., & Thor, A. (2021). Basics of Dental Implantology for the Oral Surgeon. *Oral and Maxillofacial Surgery for the Clinician*, 385–405. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1346-6_18/FIGURES/8

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337

Feito, M. J., Diez-Orejas, R., Cicuéndez, M., Casarrubios, L., Rojo, J. M., & Portolés, M. T. (2019). Characterization of M1 and M2 polarization phenotypes in peritoneal macrophages after treatment with graphene oxide nanosheets. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, *176*, 96–105. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.12.063

Fretwurst, T., Garaicoa-Pazmino, C., Nelson, K., Giannobile, W. V., Squarize, C. H., Larsson, L., & Castilho, R. M. (2020). Characterization of macrophages infiltrating peri-implantitis lesions. *Clinical Oral Implants Research*, *31*(3), 274–281. https://doi.org/10.1111/CLR.13568

Fretwurst, T., Müller, J., Larsson, L., Bronsert, P., Hazard, D., Castilho, R. M., Kohal, R., Nelson, K., & Iglhaut, G. (2021). Immunohistological composition of peri-implantitis affected tissue around ceramic implants-A pilot study. *Journal of Periodontology*, *92*(4), 571–579. https://doi.org/10.1002/JPER.20-0169

Freundlich, B., Bomalaski, J. S., Neilson, E., & Jimenez, S. A. (1986). Regulation of fibroblast proliferation and collagen synthesis by cytokines. *Immunology Today*, *7*(10), 303–307. https://doi.org/10.1016/0167-5699(86)90067-8

Galarraga-Vinueza, M. E., Obreja, K., Ramanauskaite, A., Magini, R., Begic, A., Sader, R., & Schwarz, F. (2021). Macrophage polarization in peri-implantitis lesions. *Clinical Oral Investigations*, *25*(4), 2335–2344. https://doi.org/10.1007/S00784-020-03556-2

Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2016). Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. *Microbial Cell*, *3*(3), 101. https://doi.org/10.15698/MIC2016.03.483

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., … Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, *25*(3), 486–541. https://doi.org/10.1038/S41418-017-0012-4

Garaicoa-Pazmino, C., Fretwurst, T., Squarize, C. H., Berglundh, T., Giannobile, W. V., Larsson, L., & Castilho, R. M. (2019). Characterization of macrophage polarization in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, *46*(8), 830–839. https://doi.org/10.1111/JCPE.13156

Garlet, G. P., & Giannobile, W. V. (2018). Macrophages: The Bridge between Inflammation Resolution and Tissue Repair? *Journal of Dental Research*, *97*(10), 1079. https://doi.org/10.1177/0022034518785857

Gasmi Benahmed, A., Gasmi, A., Tippairote, T., Mujawdiya, P. K., Avdeev, O., Shanaida, Y., & Bjørklund, G. (2022). Metabolic Conditions and Peri-Implantitis. *Antibiotics 2023, Vol. 12, Page 65*, *12*(1), 65. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12010065

Giraldo, V., Duque, A., Aristizabal, A., & Hernández, R. (2018). Prevalence of Peri-implant Disease According to Periodontal Probing Depth and Bleeding on Probing: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, *33*(4), e89–e105. https://doi.org/10.11607/JOMI.5940

Gualini, F., & Berglundh, T. (2003). Immunohistochemical characteristics of inflammatory lesions at implants. *Journal of Clinical Periodontology*, *30*(1), 14–18. https://doi.org/10.1034/J.1600-051X.2003.300103.X

Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2006). Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontology 2000*, *42*(1), 7–12. https://doi.org/10.1111/J.1600-0757.2006.00190.X

Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, *15*(1), 30–44. https://doi.org/10.1038/NRI3785

Hashimoto, K., Sano, T., Honma, Y., Ida, M., Tominaga, H., Sawada, A., Abe, T., Takahashi, H., Shimada, Y., Masaki, T., Kamata, M., Naito, S., Aoyama, T., Takeuchi, Y., Akiya, M., Inukai, M., & Nakata, N. (2019). An autopsy case of TAFRO syndrome with membranoproliferative glomerulonephritis-like lesions. *CEN Case Reports*, *8*(1), 48–54. https://doi.org/10.1007/S13730-018-0363-9/TABLES/3

He, W. Z., Yang, M., Jiang, Y., He, C., Sun, Y. C., Liu, L., Huang, M., Jiao, Y. R., Chen, K. X., Hou, J., Huang, M., Xu, Y. L., Feng, X., Liu, Y., Guo, Q., Peng, H., Huang, Y., Su, T., Xiao, Y., … Li, C. J. (2022). miR-188-3p targets skeletal endothelium coupling of angiogenesis and osteogenesis during ageing. *Cell Death & Disease 2022 13:5*, *13*(5), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41419-022-04902-w

Heitz-Mayfield, L. J. A., & Salvi, G. E. (2018). Peri-implant mucositis. *Journal of Clinical Periodontology*, *45 Suppl 20*, S237–S245. https://doi.org/10.1111/JCPE.12953

Holde, G. E., Oscarson, N., Trovik, T. A., Tillberg, A., & Jönsson, B. (2017). Periodontitis Prevalence and Severity in Adults: A Cross-Sectional Study in Norwegian Circumpolar Communities. *Journal of Periodontology*, *88*(10), 1012–1022. https://doi.org/10.1902/JOP.2017.170164

Hughes, C. C. W. (2008). Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. *Current Opinion in Hematology*, *15*(3), 204–209. https://doi.org/10.1097/MOH.0B013E3282F97DBC

Irie, K., Novince, C. M., & Darveau, R. P. (2014). Impact of the Oral Commensal Flora on Alveolar Bone Homeostasis. *Journal of Dental Research*, *93*(8), 801–806. https://doi.org/10.1177/0022034514540173

Junqueira, L. C. U., & Carneiro, J. (2013). *Histologia Básica* (Guanabara Koogan, Ed.; 12ª edição).

Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, *25*(1), 65–80. https://doi.org/10.1038/CDD.2017.186

Karbowski, M., & Youle, R. J. (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death & Differentiation 2003 10:8*, *10*(8), 870–880. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401260

Katchburian, E., & Arana, V. (2004). *Histologia e Embriologia Oral* (Editorial Médica Panamerica & Guanabara Koogan, Eds.; 2ª edição).

Krüger, A., Mrowietz, C., Lendlein, A., & Jung, F. (2013). Interaction of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with platelets in vitro: Influence of platelet concentration and reactivity. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, *55*(1), 111–120. https://doi.org/10.3233/CH-131695

Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(18). https://doi.org/10.3390/IJMS20184411

Kusumbe, A. P., Ramasamy, S. K., & Adams, R. H. (2014). Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*, *507*(7492), 323. https://doi.org/10.1038/NATURE13145

Langen, U. H., Pitulescu, M. E., Kim, J. M., Enriquez-Gasca, R., Sivaraj, K. K., Kusumbe, A. P., Singh, A., Russo, J. Di, Bixel, M. G., Zhou, B., Sorokin, L., Vaquerizas, J. M., & Adams, R. H. (2017). Cell-matrix signals specify bone endothelial cells during developmental osteogenesis Europe PMC Funders Group. *Nat Cell Biol*, *19*(3), 189–201. https://doi.org/10.1038/ncb3476

Lee, C. T., Huang, Y. W., Zhu, L., & Weltman, R. (2017). Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, *62*, 1–12. https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2017.04.011

Lindhe, J., & Meyle, J. (2008). Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, *35*(8 Suppl), 282–285. https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2008.01283.X

Lindle, J., & Lang, N. (2015). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (6th edition).

Liu, J. H., Yue, T., Luo, Z. W., Cao, J., Yan, Z. Q., Jin, L., Wan, T. F., Shuai, C. J., Wang, Z. G., Zhou, Y., Xu, R., & Xie, H. (2020). Akkermansia muciniphila promotes type H vessel formation and bone fracture healing by reducing gut permeability and inflammation. *Disease Models & Mechanisms*, *13*(11). https://doi.org/10.1242/DMM.043620

Loos, B. G., & Van Dyke, T. E. (2020). The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontology 2000*, *83*(1), 26–39. https://doi.org/10.1111/PRD.12297

Malech, H. L., Deleo, F. R., & Quinn, M. T. (2014). The Role of Neutrophils in the Immune System: An Overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1124*, 3. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-845-4_1

Marger, L., Liaudet, N., Scherrer, S. S., Brembilla, N. C., Preynat-Seauve, O., Manoil, D., Mekki, M., & Durual, S. (2022). Identification of Type-H-like Blood Vessels in a Dynamic and Controlled Model of Osteogenesis in Rabbit Calvarium. *Materials*, *15*(13). https://doi.org/10.3390/ma15134703

Mehta, D., & Malik, A. B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological Reviews*, *86*(1), 279–367. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00012.2005

Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology*, *196*(3), 430–443. https://doi.org/10.1002/JCP.10333

Mii, A., Terasaki, M., Kunugi, S., Seki, M., Kashiwagi, T., Sakai, Y., & Shimizu, A. (2022). A case of proliferative glomerulonephritis with monoclonal IgG3κ deposits accompanied by glomerular capillary microaneurysms. *CEN Case Reports*, *11*(3), 333–338. https://doi.org/10.1007/S13730-021-00676-W/FIGURES/4

Miron, R. J., & Bosshardt, D. D. (2016). OsteoMacs: Key players around bone biomaterials. *Biomaterials*, *82*, 1–19. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.12.017

Nagata, S. (2005). DNA degradation in development and programmed cell death. *Annual Review of Immunology*, *23*, 853–875. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.23.021704.115811

Nanci, A., & Bosshardt, D. D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, *40*(1), 11–28. https://doi.org/10.1111/J.1600-0757.2005.00141.X

Nazir, M., Al-Ansari, A., Al-Khalifa, K., Alhareky, M., Gaffar, B., & Almas, K. (2020). Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *TheScientificWorldJournal*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/2146160

Orakpoghenor, O., Avazi, D. O., Markus, T. P., & Olaolu, O. S. (2019). *Lymphocytes: A Brief Review*. www.scireslit.com

Pan, C., Gao, Q., Kim, B. S., Han, Y., & Gao, G. (2022). The Biofabrication of Diseased Artery In Vitro Models. *Micromachines 2022, Vol. 13, Page 326*, *13*(2), 326. https://doi.org/10.3390/MI13020326

Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., … Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, *45 Suppl 20*, S162–S170. https://doi.org/10.1111/JCPE.12946

Paul, O., Arora, P., Mayer, M., & Chatterjee, S. (2021). Inflammation in Periodontal Disease: Possible Link to Vascular Disease. *Frontiers in Physiology*, *11*, 1818. https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.609614/BIBTEX

Peng, Y., Wu, S., Li, Y., & Crane, J. L. (2020). Type H blood vessels in bone modeling and remodeling. In *Theranostics* (Vol. 10, Issue 1, pp. 426–436). Ivyspring International Publisher. https://doi.org/10.7150/thno.34126

Protasoni, M., & Zeviani, M. (2021). Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 1–55. https://doi.org/10.3390/IJMS22020586

Relvas, M., López-Jarana, P., Monteiro, L., Pacheco, J. J., Braga, A. C., & Salazar, F. (2022). Study of Prevalence, Severity and Risk Factors of Periodontal Disease in a Portuguese Population. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(13). https://doi.org/10.3390/JCM11133728

Renvert, S., & Quirynen, M. (2015). Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review. *Clinical Oral Implants Research*, *26 Suppl 11*, 15–44. https://doi.org/10.1111/CLR.12636

Ribot, J., Caliaperoumal, G., Paquet, J., Boisson-vidal, C., Petite, H., & Anagnostou, F. (2017). Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *21*(2), 349. https://doi.org/10.1111/JCMM.12969

Schwarz, F., Derks, J., Monje, A., & Wang, H. L. (2018). Peri-implantitis. *Journal of Periodontology*, *89 Suppl 1*, S267–S290. https://doi.org/10.1002/JPER.16-0350

Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A., & Korsmeyer, S. J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Developmental Cell*, *2*(1), 55–67. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00116-2

Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., & Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology*, *3*(4), 346–352. https://doi.org/10.1038/35070019

Staněk, D., & Fox, A. (2017). Nuclear bodies: news insights into structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, *46*, 94–101. https://doi.org/10.1016/J.CEB.2017.05.001

Stöger, J. L., Gijbels, M. J. J., van der Velden, S., Manca, M., van der Loos, C. M., Biessen, E. A. L., Daemen, M. J. A. P., Lutgens, E., & de Winther, M. P. J. (2012). Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *225*(2), 461–468. https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2012.09.013

Thorbert-Mros, S., Larsson, L., & Berglundh, T. (2015). Cellular composition of long-standing gingivitis and periodontitis lesions. *Journal of Periodontal Research*, *50*(4), 535–543. https://doi.org/10.1111/JRE.12236

Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, *89*, S159–S172. https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006

Tribble, G. D., & Lamont, R. J. (2010). Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontology 2000*, *52*(1), 68–83. https://doi.org/10.1111/J.1600-0757.2009.00323.X

Yu, T., Zhao, L., Huang, X., Ma, C., Wang, Y., Zhang, J., & Xuan, D. (2016). Enhanced Activity of the Macrophage M1/M2 Phenotypes and Phenotypic Switch to M1 in Periodontal Infection. *Journal of Periodontology*, *87*(9), 1092–1102. https://doi.org/10.1902/JOP.2016.160081

Zhang, J., Pan, J., & Jing, W. (2020). Motivating role of type H vessels in bone regeneration. In *Cell Proliferation* (Vol. 53, Issue 9). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/cpr.12874

李悦, 冯向辉, & 胡文杰. (2023). 种植体周炎的组织病理学特点. 中华口腔医学杂志, *58*(03), 281–286. https://doi.org/10.3760/CMA.J.CN112144-20220702-00362

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação de utilização de imagem referente à Figura 1.

Anexo 2 – Aprovação de utilização de imagem referente à Figura 2.

Anexo 3 – Aprovação de utilização de imagem referente à Figura 3.

Open Access Review

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. No special permission is required to reuse all or part of the article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. For more information, please refer to https://www.mdpi.com/openaccess.

Geir Bjørklund [7,*]

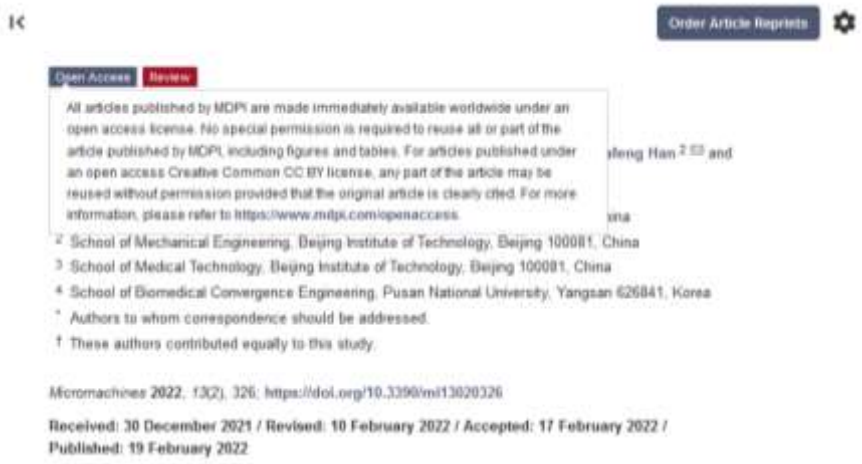
[2] Société Francophone de Nutrithérapie et de Nutrigénétique Appliquée, 69100 Villeurbanne, France
[3] Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital and Institute of Nutrition, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
[4] Nutritional and Environmental Medicine Department, BBH Hospital, Bangkok 10540, Thailand
[5] Birla Institute of Technology and Science-Pilani, Hyderabad 500078, India
[6] Pediatric Dentistry Department, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, 46003 Ternopil, Ukraine
[7] Council for Nutritional and Environmental Medicine, 8610 Mo i Rana, Norway
* Author to whom correspondence should be addressed.

Antibiotics **2023**, *12*(1), 65; https://doi.org/10.3390/antibiotics12010065

Received: 4 December 2022 / Revised: 24 December 2022 / Accepted: 28 December 2022 / Published: 29 December 2022

(This article belongs to the Special Issue Antimicrobial Activity of Dental Biomaterials)

Anexo 4 – Aprovação de utilização de imagem referente à Figura 4.



Order Article Reprints

Open Access Review

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. No special permission is required to reuse all or part of the article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. For more information, please refer to https://www.mdpi.com/openaccess.

leng Han [2,☒] and

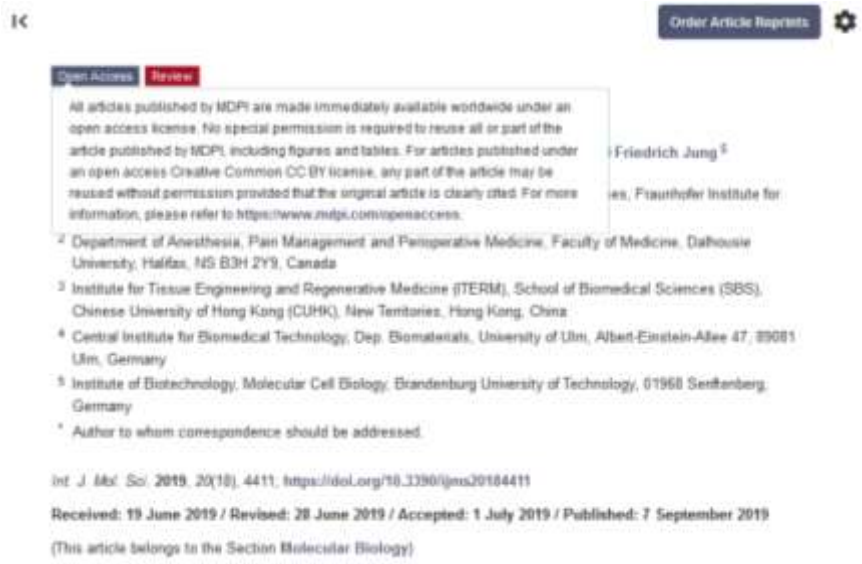
ona

[2] School of Mechanical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China
[3] School of Medical Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China
[4] School of Biomedical Convergence Engineering, Pusan National University, Yangsan 626841, Korea
* Authors to whom correspondence should be addressed.
† These authors contributed equally to this study.

Micromachines **2022**, *13*(2), 326; https://doi.org/10.3390/mi13020326

Received: 30 December 2021 / Revised: 10 February 2022 / Accepted: 17 February 2022 / Published: 19 February 2022

Anexo 5 – Aprovação de utilização de imagem referente à Figura 5.



Order Article Reprints

Open Access Review

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. No special permission is required to reuse all or part of the article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. For more information, please refer to https://www.mdpi.com/openaccess.

Friedrich Jung [5]

es, Fraunhofer Institute for

[2] Department of Anesthesia, Pain Management and Perioperative Medicine, Faculty of Medicine, Dalhousie University, Halifax, NS B3H 2Y9, Canada
[3] Institute for Tissue Engineering and Regenerative Medicine (iTERM), School of Biomedical Sciences (SBS), Chinese University of Hong Kong (CUHK), New Territories, Hong Kong, China
[4] Central Institute for Biomedical Technology, Dep. Biomaterials, University of Ulm, Albert-Einstein-Allee 47, 89081 Ulm, Germany
[5] Institute of Biotechnology, Molecular Cell Biology, Brandenburg University of Technology, 01968 Senftenberg, Germany
* Author to whom correspondence should be addressed.

Int. J. Mol. Sci. **2019**, *20*(18), 4411; https://doi.org/10.3390/ijms20184411

Received: 19 June 2019 / Revised: 28 June 2019 / Accepted: 1 July 2019 / Published: 7 September 2019

(This article belongs to the Section Molecular Biology)

Anexo 6 – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética Egas Moniz.

EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE

Comissão de Ética EGAS MONIZ

Proc. Interno nº 1176
PLATAFORMA

Ex.ma Senhora
Catarina Alexandra Santos Freire

Monte de Caparica, 2 de março de 2023.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado: **"A importância dos vasos do tipo H nas condições inflamatórias da gengiva e sua caracterização,** foi aprovado.

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita