

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL: DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ENDODONTIA

THEODORO WEISSHEIMER

MODULAÇÃO DA PROLACTINA NA INFLAMAÇÃO E REABSORÇÃO
ÓSSEA NA PERIODONTITE APICAL E SUA REGULAÇÃO PELO
ESTROGÊNIO

Porto Alegre

2024

THEODORO WEISSHEIMER

**MODULAÇÃO DA PROLACTINA NA INFLAMAÇÃO E REABSORÇÃO
ÓSSEA NA PERIODONTITE APICAL E SUA REGULAÇÃO PELO
ESTROGÊNIO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Doutor em Clínicas Odontológicas – ênfase em Endodontia.

Linha de Pesquisa: Epidemiologia, Etiopatogenia e Repercussão das Doenças da Cavidade Bucal e Estruturas Anexas

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Reis Só
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Coorientador: Prof. Dr. Anibal Roberto Diogenes
(University of Texas Health Science Center at San Antonio)

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Weissheimer, Theodoro
MODULAÇÃO DA PROLACTINA NA INFLAMAÇÃO E REABSORÇÃO
ÓSSEA NA PERIODONTITE APICAL E SUA REGULAÇÃO PELO
ESTROGÊNIO / Theodoro Weissheimer. -- 2024.
119 f.

Orientador: Marcus Vinicius Reis Só.

Coorientador: Anibal Roberto Diogenes.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2024.

1. Periodontite apical. 2. Estrogênio. 3.
Inflamação. 4. Prolactina. 5. Metabolismo ósseo. I.
Reis Só, Marcus Vinicius, orient. II. Diogenes,
Anibal Roberto, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha profunda gratidão por todos os que tornaram possível este momento em minha vida:

Primeiramente, agradeço a *Deus* por guiar meus passos e permitir que eu alcance este e tantos outros marcos. Sua luz tem sido meu farol.

Aos meus amados pais, *Eduardo Weissheimer* e *Joanice Maria Reuse Weissheimer*, e ao meu irmão, *Murillo Weissheimer*, dedico meu mais sincero agradecimento. Seu amor incondicional e apoio foram fundamentais para minha jornada. Sempre estiveram ao meu lado, sem poupar esforços na minha formação como ser humano e profissional. Agradeço por cada conselho sábio e por cada gesto de carinho. Esta conquista não seria realidade sem a imensurável dedicação de vocês.

À minha esposa, *Letícia Rodrigues Kreling*, agradeço por compreender a importância deste momento em minha vida e por sua constante presença ao meu lado. Agradeço pelo seu amor, sua luz e seu sorriso. Sou grato em saber que construímos uma vida juntos.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Marcus Vinicius Reis Só*, expresso minha profunda gratidão. Sua excelência profissional e humanidade foram inspirações constantes. A confiança que depositou em mim e as oportunidades de crescimento que me proporcionou são inestimáveis. A sua amizade e de sua família é algo que guardarei para sempre.

Ao meu coorientador, *Prof. Dr. Anibal Roberto Diogenes*, agradeço pela confiança depositada em mim e pela experiência única que vivenciei sob sua orientação. Cada ensinamento e o convívio ao longo deste ano que passei em seu laboratório foram enriquecedores e marcantes. Seu apoio, ensinamentos e dedicação me fizeram crescer enormemente.

Ao *Prof. Dr. Ricardo Abreu da Rosa*, manifesto minha gratidão pela confiança em minha capacidade e pela sua amizade. Sou profundamente grato por tudo que compartilhamos.

À *Universidade Federal do Rio Grande do Sul* e ao *Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS*, bem como aos professores do programa, especialmente os da área de Endodontia, agradeço por tornarem possível a realização deste sonho. O convívio e os ensinamentos recebidos foram fundamentais para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

À *University of Texas Health Science Center at San Antonio* e a todos seus funcionários e colegas, sou profundamente grato por toda a sua ajuda e tudo que fizeram por mim. Agradeço em especial ao *Prof. Dr. Kenneth M. Hargreaves*, a *Prof^{ta}. Dr^a. Nikita B. Ruparel*, a *Prof^{ta}. Dr^a. Asma A. Khan*, a *Prof^{ta}. Dr^a. Vanessa Chrepa*, a *Prof^{ta}. Dr^a. Shivani B. Ruparel*, ao *Prof. Dr. Armen Akopian*, a *Kathryn Garcia*, a *Sarah Saenz*, ao *Emiliano Puente*, aos colegas de laboratório *Ruta Grinceviciute*, *Stephen F. Hernandez*, *Dr^a. Katherine V. Lillis*, *Samuel M Florez*, *Josue de Jesus Murillo*, e ao *Alberto Angulo* e o *Departamento de Serviços Internacionais*.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* e à *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, agradeço imensamente pelo fomento recebido durante meus anos como aluno de doutorado. O apoio dessas instituições foi de fundamental importância para a minha formação e conclusão desta caminhada.

Ao *Prof. Dr. Carlos Estrela*, dedico este agradecimento pela sua incansável disposição em guiar e dedicação em ajudar. Sem o seu apoio, muito desta história não teria sido possível.

À *Prof^{ta}. Dr^a. Manoela Domingues Martins*, dedico este agradecimento pela sua delicadeza, gentileza e eterna vontade de ajudar a todos ao seu redor. Agradeço por me ensinar tanto pelo simples convívio diário.

Ao *Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers*, ao *Leonardo Diel*, e a todos do *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, agradeço por abrirem as portas dos seus departamentos e abrirem mão dos seus tempos para auxiliarem no meu aperfeiçoamento como pesquisador.

À *Marieli Chitolina Pradebon, Carolina Troian Michel, Bruna Barcelos Só, Gabriel Barcelos Só, Gabiana Freitas Rodrigues, Angélica Fensterseifer Lemos, Thalita Ayres Arrué, Simone Argenta Scalabrin, Bárbara Romana Rossetti, Luana Heck, Renata Aqel de Oliveira, Fernanda Friedrich, Igor Abreu de Bem, Luan Kovalski, Daniel Feijolo Marconi, Giovana Siocheta da Silva, Leonardo Thomasi Jahnke, Angela Longo do Nascimento, Natália Villa, Barbara Luzia Capitano, Natália Backa Abrahão, Vinícius Souza Eilers, Karolina Frick Bischoff, Letícia Tainá de Oliveira Lemes, Pedro Henrique Ferreira de Menezes, Wesley Misael Krabbe, Lara Broll, Livia Pacheco Rodrigues, Aline Teixeira Mendes, Lilian Tietz, Isadora Ames Silva, Charles André Dall Agnol Júnior, Pedro Henrique Marks Duarte, Ramiro Martins Quintana, Alexander Pompermayer Jardine, Felipe Barros Matoso, Lucas Siqueira Pinheiro, Paulo Augusto Scalzilli, Mauricio Anastacio*. Amigos, colegas, parceiros de pesquisa. Esses anos juntos foram certamente mais leves e felizes com todos vocês nessa caminhada.

Aos amigos *Damian Taylor Crow e Stephen Thurgood*, agradeço por sua ajuda essencial durante meu tempo em San Antonio. A disposição de vocês foi fundamental para superar todos os desafios. Obrigado pela convivência leve e pelas suas amizades.

Agradeço aos amigos de Bauru, *Pedro Henrique Souza Calefi, Victor Moraes Cruz, Paulo Roberto Jara de Souza, Roberto Barreto Osaki, Prof. Dr. Murilo Priori Alcalde, Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan, Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte, Prof. Dr. Renan Diego Furlan*, pela amizade e oportunidades de crescimento.

Aos professores e amigos do Instituto Odontológico das Américas, *Prof^a. Roberta Rossi de Carvalho e Silva, Prof^a. Dr^a. Natália Delfino Pacheco, Prof^a. Dr^a. Simone Viegas da Silva, Prof. Dr. Rafael Chies Hartmann*, agradeço imensamente por poder aprender com vocês e por todas as risadas compartilhadas. Ao nosso mentor, *Prof. Dr. Alexandre Azevedo Salles*, lhe agradeço diariamente por ter me cativado para o mundo da Endodontia. Minha jornada poderia ter sido muito diferente, se não fosse pela sua pessoa. Sou extremamente grato por poder conviver e aprender ao seu lado.

Agradeço ao *Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo, Prof. Dr. Alexandre da Silveira Gerszon, Prof. Denis Machado Caon, Prof^a. Dr^a. Vanessa Valgas dos Santos*,

Prof. Luis Alfredo Fardo, Prof^ª. Janaína Guzzo Zechin Kufner, Prof^ª. Érica Pozo Mautone, Prof^ª. Dr^ª. Lina Naomi Hasizume, Prof. Dr. Carlos Roberto Berger, Prof^ª. Dr^ª. Tathiane Larissa Lenzi, Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, Prof^ª. Dr^ª. Karem Paula Pinto, Prof. Dr. Alexandre Capelli, Prof. Dr. Matheus Albino Souza, Prof. Dr. Rodrigo Gonçalves Ribeiro, Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Vieira Vier-Pelisser, Prof. Dr. Maximiliano Schunke Gomes, Prof. Dr. Jefferson Ricardo Pereira, Prof. Dr. Carlos Alexandre Souza Bier, pela amizade e incentivo.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram e torceram pelo meu desenvolvimento pessoal e profissional durante essa caminhada. Meu sincero e profundo obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Dimorfismo Sexual no Mecanismo da Dor e Modulação da Inflamação	23
1.2 Estrogênio e Mecanismos de Sinalização de Receptores de Estrogênio	24
1.2.1 Efeitos De Sinalização Genômicos Diretos	26
1.2.2 Efeitos De Sinalização Genômicos Indiretos	26
1.2.3 Efeitos De Sinalização Não-Genômicos Indiretos	26
1.2.4 Efeitos De Sinalização Genômicos e Não-Genômicos (<i>Cross-Talk</i>)	28
1.2.5 Efeitos De Sinalização Independente	28
1.2.6 Regulação Transcricional por Co-Reguladores de Receptores de Estrogênio..	29
1.3 Estrogênio na Sensibilização Neural e Modulação da Inflamação	29
1.4 Prolactina	30
1.4.1 Regulação da Liberação de Prolactina Pituitária e Extrapituitária	32
1.4.2 Receptores de Prolactina	34
1.4.3 Mecanismos de Ativação e Vias de Transdução de Sinal	35
1.4.4 Prolactina na Modulação da Inflamação	37
1.4.5 Prolactina e Metabolismo Ósseo	40
2. OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo Geral	47
2.2 Objetivos Específicos	47
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	48
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar a expressão de prolactina (Prl) e receptores de prolactina (PRLR) na periodontite apical, mediada por β -Estradiol (E2), e seu papel na modulação da resposta imunológica e no desenvolvimento da periodontite apical devido a infecções dentárias. Doze camundongos ovariectomizadas (OVX; n=6/grupo) foram divididos em grupos E2 e veículo (Veh). Ainda, camundongos PRLR knockout condicional (R26-creER2/PRLR flx/flx) (n=6) e camundongos de controle -cre (n=3) foram utilizados, com a deleção do gene PRLR induzida por injeções de tamoxifeno por quatro dias a partir do dia da exposição pulpar. A periodontite apical foi induzida por 14 dias, e os camundongos OVX foram suplementados com injeções de E2 ou veículo – óleo de amendoim. Após 14 dias, os camundongos foram eutanasiados, e amostras foram coletadas para medição de soro de E2, microtomografia computadorizada (μ CT), reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR) e análises de imuno-histoquímica. Células MC3T3 foram cultivadas sozinhas ou com neurônios do gânglio trigêmeo e suplementadas com E2 ou E2 + antagonista PRLR. A mineralização foi avaliada após 21 dias. A significância estatística foi estabelecida em $P < .05$. Os dados do soro de E2 foram analisados usando o teste t de duas caudas não pareado. Os dados de μ CT e mineralização in vitro foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) de dois fatores com o teste post-hoc de Tukey. Um teste t de duas caudas não pareado foi usado para analisar os dados de RT-qPCR dos gânglios trigêmeos e glândulas pituitárias, e uma ANOVA de dois fatores com o teste post-hoc de Tukey foi usada para analisar os dados de RT-qPCR dos dentes/lesões periapicais. As imagens de imuno-histoquímica foram analisadas qualitativamente. A suplementação com E2 restaurou significativamente os níveis fisiológicos de E2 e reduziu o volume das lesões osteolíticas ($P < .05$). A expressão de Prl foi maior em lesões apicais de animais suplementados com E2, enquanto a expressão de PRLR foi ligeiramente reduzida ($P < .05$). A deleção de PRLR resultou em lesões significativamente menores ($P < .05$). Não houve diferenças na expressão de interleucina 1 α , 1 β , ou hormônio de crescimento entre animais tratados com E2 e Veh ($P > .05$). A imuno-histoquímica revelou expressão de Prl e PRLR nos gânglios trigêmeos e glândulas pituitárias de camundongos tratados com estrogênio, e uma expressão mais pronunciada em lesões apicais do grupo E2, com PRLR principalmente visto em osteoblastos. Níveis elevados de macrófagos, linfócitos T e neutrófilos foram observados no grupo E2. Prl dos neurônios do gânglio trigêmeo

suplementados com E2 aumentou a mineralização dos osteoblastos ($P < .05$), enquanto a suplementação com E2 + antagonista PRLR inibiu a mineralização ($P < .05$). O estrogênio exibiu um papel protetor na reabsorção óssea e modulação da inflamação na periodontite apical, mediado em parte pela expressão sexualmente dimórfica de PRL e seu receptor, modulando assim a resposta imunológica e reduzindo a reabsorção óssea devido à periodontite apical.

Palavras-Chave: Periodontite apical, estrogênio, inflamação, prolactina, metabolismo ósseo

ABSTRACT

This study aimed to investigate the expression of prolactin (Prl) and prolactin receptors (PRLR) in apical periodontitis, mediated by β -Estradiol (E2), and its role in modulating the immune response and development of apical periodontitis due to dental infections. Twelve ovariectomized mice (OVX; n=6/group) were divided into E2 and vehicle (Veh) groups. Additionally, PRLR (R26-creER2/PRLR flx/flx) conditional knockout mice (n=6) and -cre control mice (n=3) were used, with PRLR gene deletion induced by tamoxifen injections for four days starting on the day of pulp exposure. Apical periodontitis was induced for 14 days, and OVX mice were supplemented with E2 or vehicle – peanut oil - injections. After 14 days, mice were euthanized, and samples were collected for E2 serum measurement, microcomputed tomography (μ CT), real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and immunohistochemistry analyses. MC3T3 cells were cultured alone or with trigeminal ganglia neurons and supplemented with E2 or E2 + PRLR antagonist. Mineralization was assessed after 21 days. Statistical significance was set at $P < .05$. E2 serum data were analyzed using an unpaired two-tailed t-test. μ CT and in vitro mineralization data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tukey's test. An unpaired two-tailed t-test was used to analyze data from RT-qPCR of trigeminal ganglia and pituitary glands, and a two-way ANOVA with post-hoc Tukey's test was used to analyze data from RT-qPCR of teeth/periapical lesions. Immunohistochemistry images were qualitatively analyzed. E2 supplementation significantly restored physiological E2 levels and reduced osteolytic lesion volume ($P < .05$). Prl expression was higher in apical lesions of E2-supplemented animals, while PRLR expression was slightly decreased ($P < .05$). Deletion of PRLR resulted in significantly smaller lesions ($P < .05$). There were no differences in interleukin 1 α , 1 β , or growth hormone expression between E2 and Veh-treated animals ($P > .05$). Immunohistochemistry revealed Prl and PRLR expression in the trigeminal ganglia and pituitary glands of estrogen-treated mice, and more pronounced expression in apical lesions of the E2 group, with PRLR primarily seen in osteoblasts. Elevated levels of macrophages, T-lymphocytes, and neutrophils were observed in the E2 group. Prl from TG neurons supplemented with E2 increased osteoblast mineralization ($P < .05$), whereas E2 + PRLR antagonist supplementation inhibited mineralization ($P < .05$). Estrogen exhibited a protective role in bone resorption and inflammation modulation in apical periodontitis, mediated in part by the sexually

dimorphic expression of PRL and its receptor, thus modulating the immune response and reducing bone resorption due to apical periodontitis.

Keywords: Apical periodontitis, estrogens, inflammation, prolactin, bone metabolism

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Níveis de estradiol no soro sanguíneo analisados por ensaio ELISA.....71
- Figura 2 - (A) Imagens representativas de μ CT de polpa de 14 dias exposta e controle de primeiros molares inferiores de camundongos OVX. (B, C) Análise estatística de imagens μ CT demonstrando menor área de lesão periapical para o grupo E2 em comparação ao grupo Veh, tanto na mandíbula quanto na maxila.....72
- Figura 3 - Camundongos PRLR knockout exibem lesões periapicais significativamente maiores em comparação com o grupo -cre (controle).....73
- Figura 4 - A reposição do estradiol aumentou a expressão de Prl e diminuiu a expressão de PRLR tanto no lado exposto quanto no não exposto, sem diferenças significativas em IL-1 α , IL-1 β e Gh. Análises estatísticas da expressão gênica relativa, avaliada por RT-qPCR para (A) Prl, (B) PRLR, (C) IL-1 α , (D) IL-1 β e (E) Gh em dentes expostos e não expostos de camundongos OVX.....74
- Figura 5 - A reposição do estradiol aumentou a expressão de Prl na glândula pituitária e nos gânglios trigêmeos, e reduziu a expressão de PRLR na glândula pituitária. Análises estatísticas de expressão gênica relativa, avaliada por RT-qPCR para Prl em (A) glândula pituitária e (B) gânglios trigêmeos, e para PRLR em (C) glândula pituitária e (D) gânglios trigêmeos.....75
- Figura 6 - Imagens de imuno-histoquímica marcando para Prl (verde) + DAPI (azul). Imagem representativa da expressão de Prl nos gânglios trigêmeos (A-D) e na glândula pituitária (E-H) de animais OVX.....76
- Figura 7 - Imagens imuno-histoquímicas coradas com PRLR (verde) + DAPI (azul). Imagem representativa da expressão de PRLR nos gânglios trigêmeos (A-D) e na glândula pituitária (E-H) de animais OVX.....77
- Figura 8 - Imagens de imuno-histoquímica, em 20x, corando com Prl (verde) + DAPI (azul). Imagens representativas da expressão de Prl (setas) em mandíbula e maxila, tanto nos lados expostos como não expostos de animais OVX. O grupo E2 apresentou uma expressão ligeiramente aumentada em ambos os lados (A, E) expostos e (B, F) não expostos da mandíbula e maxila.....78

Figura 9 - Imagens de imuno-histoquímica, em 20x, marcando para Prl (verde) + NF-H (vermelho) + DAPI (azul). Imagens representativas da expressão de Prl (setas) + NF-H em mandíbula e maxila, em ambos os lados expostos e não expostos de animais OVX. O grupo E2 apresentou uma expressão ligeiramente aumentada em ambos os lados (A, E) expostos e (B, F) não expostos da mandíbula e maxila.....79

Figura 10 - Imagens de imuno-histoquímica, em 20x, corando com Prl (verde) + β -tubulina III (vermelho) + DAPI (azul). Imagens representativas da expressão de Prl (setas) + β -tubulina III em mandíbula e maxila, em ambos os lados expostos e não expostos de animais OVX. O grupo E2 demonstrou uma expressão ligeiramente aumentada em ambos os lados (A, E) expostos e (B, F) não expostos da mandíbula e maxila.....80

Figura 11 - Imagens representativas de lesões periapicais em primeiros molares inferiores de camundongos (A) E2 e (B) Veh, corados com Prl (verde), NF-H (vermelho) e DAPI (azul). Prl (setas) é altamente expresso em camundongos E2, e a colocalização dentro dos neurônios pode ser observada. Isto sugere que o E2 impulsiona a expressão de Prl e sua secreção extra-hipofisária nos neurônios. Imagens em 20x.....81

Figura 12 - Imagens de imuno-histoquímica, em 20x, corando para PRLR (verde) + NF-H (vermelho) + DAPI (azul). Imagens representativas da expressão de PRLR (setas) + NF-H em mandíbula e maxila, em ambos os lados expostos e não expostos de animais OVX. O grupo Veh demonstrou uma expressão ligeiramente aumentada em ambos os lados (C, G) expostos e (D, H) não expostos da mandíbula e maxila. Alguma colocalização foi observada.....82

Figura 13 - Imagens de imuno-histoquímica, em 20x, marcando para PRLR (verde) + β -tubulina III (vermelho) + DAPI (azul). Imagens representativas da expressão de PRLR (setas) + β -tubulina III em mandíbula e maxila, em ambos os lados expostos e não expostos de animais OVX. O grupo Veh demonstrou uma expressão ligeiramente aumentada em ambos os lados (C, G) expostos e (D, H) não expostos da mandíbula e maxila. Alguma colocalização foi observada.....83

Figura 14 - Imagens representativas em 20x representando coloração CD3 (verde) + Ly6G (vermelho) + DAPI (azul) na mandíbula e maxila, em ambos os lados expostos e não expostos de animais OVX. As células CD3+ e Ly6G+ (setas) apresentaram maior

expressão no lado exposto das mandíbulas (A, C) e maxilas (E, G) em ambos os grupos, um pouco mais no grupo E2.....84

Figura 15 - Imagens representativas, em 20x, corando para CD68 (verde) + Ly6G (vermelho) + DAPI (azul) na mandíbula e maxila, em ambos os lados expostos e não expostos de animais OVX. As células CD68+ e Ly6G+ (setas) apresentaram maior expressão no lado exposto das mandíbulas (A, C) e maxilas (E, G) em ambos os grupos, um pouco mais no grupo E2.....85

Figura 16 - A Prl derivada dos gânglios trigêmeos aumentou a mineralização dos osteoblastos. (A) Imagens representativas da coloração de osteoblastos com e sem cocultura de neurônios TG. (B) Os neurônios TG aumentaram significativamente a mineralização, que foi abolida por um antagonista de PRLR.....86

LISTA DE TABELAS

Tabela Suplementar 1 - Sinopse dos reagentes imuno-histoquímicos empregados.....87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Por cento

° - Grau

°C – Graus Celsius

[Ca²⁺]_i - Cálcio intracelular

17β-E2 - 17β-estradiol

μCT – Microtomografia computadorizada

μg - Microgramas

μL – Microlitros

μm - Micrometro

Akt - Proteína quinase B

AMPc - Monofosfato cíclico de adenosine

ANOVA - Análise de variância bidirecional

AP – Periodontite apical

Ca²⁺ - Cálcio

cDNA - DNA complementar

CD3 - Cluster de diferenciação 3

CD68 - Cluster de diferenciação 68

CGRP - Proteína do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CRH - Receptores de citocinas

D2 - Receptores de dopamina

DA - Dopamina

DC - Célula dendrítica

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DRG - Gânglio da raiz dorsal

E1 – Estrona

E2 – Estradiol

E3 – Estriol

E4 – Estretol

EC - Domínio extracelular

EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético

EGF - Fator de crescimento epidérmico

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

ER α - Receptor de estrogênio subtipo alfa

ER β – Receptor de estrogênio subtipo beta

ERE - Elemento receptores de estrogênio

ESR1 - Gene receptor de estrogênio 1

ESR2 - Gene receptor de estrogênio 2

et al. - Et aliae (e outros)

EtOH - Etanol

G – Gauge

GABA - Ácido γ -aminobutírico

GAS - Sequência ativada por gamma-interferon

Gh – Hormônio do crescimento

GPCR - Receptor transmembrana acoplado à proteína G

GPER - Receptor de estrogênio acoplado à proteína G

GPER1 - Receptor 1 de estrogênio acoplado à proteína G

GPR-30 - Receptor acoplado à proteína G 30

IC - Domínio intracelular

IFN- γ - Interferon- γ

IGF1 - Fator de crescimento semelhante à insulina-1

IL – Interleucina

IL-1 α - Interleucina-1 alfa

IL-1 β - Interleucina-1 beta

INF- γ RII - Receptor antiapoptótico do gene tipo II do interferon-gama

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

IP-10 - Proteína 10 induzida por interferon-gama

IRF1 - Fator regulador do interferon 1

JAK2 - Janus quinase2

kb – Kilobase

kDa – Kilodalton

kg – Kilograma

kV - Kilovolt

LPS – Lipopolissacarídeo

Ly6G - Locus complexo de antígeno 6 de linfócitos G6D

mA – Miliampere

MAP - Proteína quinase ativada por mitógeno

MAPKs - Proteína quinases ativadas por mitógeno

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos 1

MC3T3 - Linhagem celular precursora de osteoblastos derivada da calvária de Mus musculus (camundongo)

MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações

mg – Miligrama

MIP-1 α - Macrófago 1 α

miRNA - Micro-RNA

ml – Mililitro

MMP 9 - Metaloproteinase de matriz 9

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NBF - Formalina tamponada neutra

NF- κ B - Fator nuclear kappa-light-chain-enhancer de células B ativadas

NF-H - Cadeia pesada de neurofilamento

NK - Natural killers

nm - Nanometro

NSB - Ligação não específica

NT – Neurotensina

OPG - Osteoprotegerina

OT – Ocitocina

OVX – Ovariectomizada

OVX-E2 – Ovariectomizada com reposição de estrogênio

PBS - Tampão fosfato-salino

PBST - Tampão fosfato-salino com Triton X 100

PFA - Paraformaldeído

PKA - Proteína quinase A

PKC - Proteína quinase C

PKC ϵ - Proteína quinase C tipo épsilon

PRLR - Receptor de prolactina

PRLR-L - Receptor de prolactina longo

PRLR-S - Receptor de prolactina curto

PI3K - Fosfoinosítido 3-quinase

PIF - Fator inibidor de prolactina

PRF - Fator liberador de prolactina

Prl – Prolactina

RANK – Receptor ativador do fator nuclear NF kB

RANK-L - Ligante RANK

RNA - Ácido ribonucleico

ROI – Região de interesse

RT-qPCR - Transcrição reversa reação em cadeia da polimerase quantitativa

SGC - Célula glia satélite

SH3 - Quinase Src homóloga ao domínio 3

SP – Substância P

SST – Somatostatina

STAT - Proteína transdutora e ativador de transcrição

TG - Gânglio trigeminal

TGF β - Fator de crescimento transformador beta

TIDA - Tuberoinfundibular dopaminérgico

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa

TRAP - Fosfatase ácida resistente ao tartarato

TRH - Hormônio liberador de tireotropina

TRPV1 - Canal catiônico de potencial receptor transitório vanilóide 1

Tyr – Tirosina

Veh – Veículo

X - Vezes

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado contém como estrutura principal um artigo científico que será submetido para revisão no periódico científico *Journal of Endodontics*. Por esse motivo, o presente artigo se encontra de acordo com as normas estabelecidas pela revista supracitada.

As etapas experimentais da pesquisa foram realizadas durante período de 1 ano como pesquisador visitante na University of Texas – Health Science Center at San Antonio, por meio de bolsa de doutorado sanduíche no exterior (Processo: 200894/2022-6), fomentada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI).

Ainda, cabe-se ressaltar que a presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da University of Texas – Health Science Center at San Antonio.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dimorfismo Sexual no Mecanismo da Dor e Modulação da Inflamação

Por definição, dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante àquela associada a dano tecidual real ou potencial” (Raja et al., 2020). Esta pode ser de caráter agudo ou crônico e, ao contrário da dor aguda, caracterizada por dor intensa e que cessa com a cicatrização do tecido lesionado, a dor crônica perdura além do estágio de cicatrização, resultando em modificações patológicas no sistema nervoso periférico e/ou central (Basbaum et al., 2009; Treede et al., 2019).

Além das diferenças inerentes aos processos agudos e crônicos, estudos investigando múltiplos transtornos de dor vêm demonstrando que o sexo do paciente pode, em parte, ser um fator de risco para inúmeras condições de dor aguda e crônica, com um risco aumentado para o desenvolvimento de distúrbios dolorosos em mulheres, incluindo evidências sobre neuralgia trigeminal (Hung et al., 2022; De Stefano et al., 2023; Kilgore et al., 2023), desordens temporomandibulares (Sarhani et al., 2007; Lee et al., 2019; Sannajust et al., 2019), dores orofaciais (Häggman-Henrikson et al., 2020), dor após extração dental (Malkawi et al., 2011; Matijević et al., 2013), tratamento endodôntico (Polycarpou et al., 2005), cirurgia periodontal (Ahmadi et al., 2018) e cirurgia de colocação de implantes (Kim et al., 2013), dores de cabeça do tipo tensional e enxaquecas (Rasmussen et al., 1991), dores lombares (George et al., 2007; Meints et al., 2018), dores musculoesqueléticas nos ombros (Kindler et al., 2011), dores oriundas de fibromialgia (Wolfe et al., 2018), espondiloartrite axial (Rusman et al., 2018), osteoartrite (Cimmino et al., 2005; Perrot et al., 2009; Kim et al., 2011), artrite reumatoide (Vogel et al., 2023) e câncer (Fillingim et al., 2009), dores provenientes ou relacionadas a síndromes do intestino irritável (Mayer et al., 2004), cólica biliar (Everhart et al., 1999) e doença de Parkinson (Marsala et al., 2011), além de apresentarem menores limiares para respostas dolorosas à estímulos elétricos e maior intensidade de dor à estímulos frios durante testes pulpares (Mladenovic et al., 2018).

O dimorfismo sexual tem se destacado como um campo de estudo crescente, motivado por pesquisas que evidenciam não apenas disparidades clínicas entre os gêneros, mas também variações observadas em pesquisas de natureza básica e em modelos animais de doenças neurológicas. Pesquisas clínicas indicam que as mulheres

tendem a apresentar limiares mais baixos para dor associada a estímulos térmicos e mecânicos (Sarlani et al., 2003; Sarlani et al., 2004; Rolke et al., 2006; Averbeck et al., 2017; Miclescu et al., 2022; Cosentino et al., 2023). Essas descobertas são respaldadas por estudos em animais que revelam disparidades na percepção da dor e na hiperalgesia entre os sexos (Paige et al., 2020), e na expressão de genes relacionados à dor, inflamação e neuro-imunidade (Ray et al., 2019). Ainda, além da conotação de impacto na percepção dolorosa, pesquisas de natureza básica recentes vêm demonstrando que o gênero também pode impactar significativamente na modulação da inflamação e da resposta do organismo (Annibalini et al., 2014; Sorge et al., 2015; Lopes et al., 2017; Carmichael et al., 2019).

Embora os mecanismos subjacentes à ocorrência e persistência da dor e de modulação da inflamação sejam complexos e ainda não completamente compreendidos, pesquisas têm evidenciado o papel de hormônios sexo-específicos em tais mecanismos. (Klein & Flanagan., 2016; Maurer et al., 2016; Lenert et al., 2021). Dentre tais hormônios, destacamos o estrogênio.

1.2 Estrogênio e Mecanismos de Sinalização de Receptores de Estrogênio

O termo “estrogênio” se refere ao grupo de hormônios gonodais, predominantemente femininos, que inclui estrona (E1), estradiol (E2), estriol (E3) e estreol (E4). A síntese dos estrogênios ocorre principalmente nos ovários, bem como nas glândulas suprarrenais e no tecido adiposo e, quimicamente, enquadram-se numa categoria de compostos orgânicos chamados esteroides. Sua estrutura central é formada por 17 ligações de carbono-carbono organizadas em quatro anéis fundidos (três de ciclohexano e um de ciclopentano). Os quatro estrogênios contêm 18 carbonos ($C_{18}H_{24}O_2$) e são coletivamente conhecidos como esteroides C18. Eles compreendem um anel de benzeno, um grupo hidroxila fenólico e um grupo cetona (estrona); ou um (17 β -estradiol), dois (estriol) ou três grupos hidroxila (estreol) (Fuentes & Silveyra, 2019).

Como descrito, os estrogênios são hormônios sexuais esteroides e, por consequência, desempenham diversas funções fisiológicas essenciais. Entre essas funções estão a regulação do ciclo menstrual e da reprodução, a densidade óssea, a função cerebral, a mobilização do colesterol, o desenvolvimento do tecido mamário e dos órgãos

sexuais, além do controle da inflamação (Liang & Shang, 2013). Na Odontologia, é descrito que a sinalização do estrogênio desempenha um papel importante no dimorfismo sexual das doenças periodontais e distúrbios da articulação temporomandibular. Essa sinalização é complexa e dependente dos diversos níveis de estrogênio ao longo da vida de uma mulher, que podem ter um impacto nas doenças bucais. Por exemplo, os níveis variáveis de estrogênio durante a idade fértil e a perimenopausa podem predispor as mulheres à dor facial. O aumento dos níveis de estrogênio durante a gravidez pode provocar alterações no microbiota oral, levando à gengivite, enquanto os baixos níveis de estrogênio após a menopausa podem intensificar a degeneração da articulação temporomandibular e a perda óssea alveolar (Robinson et al. 2020). Ainda, evidências limitadas apontam que os estrogênios podem promover um efeito inibitório nas reabsorções radiculares induzidas por movimentos ortodônticos (Deng & Guo, 2020), e é descrito que a deficiência de estrogênio pode favorecer a progressão da periodontite apical (apical periodontitis – AP) (Rossetti et al. 2022).

No organismo, os efeitos fisiológicos dos compostos estrogênicos são principalmente regulados pelos receptores de estrogênio subtipo alfa (estrogen receptor alpha - ER α) e beta (estrogen receptor beta - ER β) (Paterni et al., 2014), membros da família de receptores nucleares codificados pelos genes receptor de estrogênio 1 (Estrogen Receptor 1 - ESR1) e receptor de estrogênio 2 (Estrogen Receptor 2 - ESR2) (Heldring et al., 2007), respectivamente. Como um hormônio esteroide, o estrogênio tem a capacidade de atravessar a membrana plasmática e interagir com ER α e ER β dentro da célula, exercendo efeitos diretos por meio da ligação a sequências de ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid – DNA), portanto as ações do estrogênio, por sua sinalização intracelular canônica resulta em modificações genômicas com profunda modificação do “transcriptome” celular. De forma alternativa, pode ativar cascatas de sinalização intracelular ao interagir com o receptor 1 de estrogênio acoplado à proteína G (G protein-coupled estrogen receptor 1 - GPER1; inicialmente conhecido como receptor acoplado à proteína G 30 - G protein-coupled receptor 30 - GPR-30) e/ou ER α e ER β (Fuentes & Silveyra, 2019). Em conclusão, os efeitos de sinalização do estrogênio podem ser divididos em genômicos (via clássica) e não-genômicos (via alternativa), devido às diferenças nos eventos celulares e moleculares que regulam a expressão genética, e serão descritos a seguir.

1.2.1 Efeitos De Sinalização Genômicos Diretos

Os efeitos de sinalização genômicos diretos envolvem os receptores de estrogênio ($ER\alpha$ e $ER\beta$), que desempenham o papel de fatores de transcrição ativados por ligantes (O'Malley, 2005; Marino et al., 2006). Após a união do estradiol ao $ER\alpha$ ou $ER\beta$ no citoplasma, ocorre uma alteração conformacional que induz a dimerização do receptor (Le Dily & Beato, 2018). Esse complexo é então transportado para o núcleo celular, onde se liga à cromatina em sequências de elementos receptores de estrogênio (estrogen response elements – ERE), que consistem em sequências palindrômicas imperfeitas conhecidas por serem ligadas e ativadas pelos receptores de estrogênio e regiões potencializadoras dentro ou próximas aos promotores e/ou regiões 3' não traduzidas de genes alvo no DNA (Klinge, 2001).

1.2.2 Efeitos De Sinalização Genômicos Indiretos

Além dos efeitos de sinalização genômicos diretos, existe a possibilidade de ocorrência de efeitos de sinalização genômicos indiretos. Essa forma de sinalização ocorre por meio da ativação da expressão genética por receptores de estrogênio que não se ligam diretamente ao DNA, mas sim por meio de complexos de interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição e elementos de resposta (Göttlicher et al., 1998; Aranda & Pascual, 2001) influenciando a ativação ou supressão da expressão do gene alvo.

1.2.3 Efeitos De Sinalização Não-Genômicos Indiretos

Entretanto, mais de um terço dos genes humanos regulados pelos receptores de estrogênio não contêm elementos de sequência ERE (O'Lone et al. 2004). De fato, a observação de rápidas respostas biológicas provocadas pelo estrogênio levantou a hipótese de que o estrogênio poderia estar atuando por meio de mecanismos que não envolvem diretamente a transcrição do gene alvo e a síntese de proteínas, levando à descoberta subsequente do GPER1 (Prossnitz & Barton, 2011; Prossnitz & Barton, 2014). As atividades não genômicas do estrogênio frequentemente implicam a ativação de mecanismos de transdução de sinal, levando à geração de segundos mensageiros

intracelulares, regulação do monofosfato cíclico de adenosina (cyclic adenosine monophosphate – AMPc) e ativação de cascatas de sinalização por proteína-quinase, resultando em modificações na expressão gênica (Lösel & Wehling, 2003). A interação entre GPER1 e os estrogênios desencadeia a ativação dependente de estrogênio da adenilil ciclase e do receptor do fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor receptor - EGFR). A fosforilação subsequente de fatores de transcrição por essas proteínas quinases mencionadas anteriormente pode modificar sua função e capacidade de se ligar a sequências genômicas, também afetando a expressão gênica (Fuentes & Silveyra, 2019).

Desta forma, ao ativar esses mecanismos não-genômicos para genômicos, os receptores de estrogênio ER α e ER β regulam indiretamente a transcrição genética em outros elementos de resposta ao DNA, para além dos efeitos genômicos previamente mencionados que implicam a ligação direta aos EREs. Outro fator é que tanto o ER α quanto o ER β também sofrem fosforilação por proteínas quinases, incluindo proteínas quinases ativadas por mitógeno (mitogen activated protein kinases – MAPKs), sugerindo que as atividades não genômicas dos estrogênios da mesma forma podem abranger a autorregulação da expressão do receptor (de Leeuw et al., 2011).

Ainda, além do receptor de estrogênio ligado à membrana GPER1, algumas formas variantes de ER α e ER β foram vinculadas à sinalização não genômica de estrogênio (Filardo & Thomas, 2012; Barton et al., 2018). Foi sugerido que as atividades não genômicas do ER α e ER β poderiam ser intermediadas por uma subpopulação de receptores localizados na membrana celular, capazes de iniciar cascatas de sinalização intracelular (Razandi et al., 2004) por meio de interações com proteínas *scaffold* (Cheski et al., 2008), proteínas G, receptores de membrana e moléculas sinalizadoras (Song et al., 2005; Song et al., 2007; Song et al., 2010; Boonyaratanakornkit, 2011). Essas interações promovem a ativação intracelular de MAPKs e vias de sinalização da proteína quinase B (protein kinase B - Akt) que podem influenciar a regulação transcricional (Li et al., 2010). Apesar da falta de consenso sobre a conexão de ER α e ER β com a membrana plasmática, pesquisas sugerem que os processos citados anteriormente são particulares de tipos celulares e são acionados em circunstâncias fisiológicas específicas, bem como por variações específicas de receptores (Li et al., 2003).

1.2.4 Efeitos De Sinalização Genômicos e Não-Genômicos (*Cross-Talk*)

Até o presente momento, dois mecanismos de "*cross-talk*" foram descritos, nos quais ocorrem interações proteína-proteína entre componentes de ambas as vias. O primeiro mecanismo descreve que complexos receptores nucleares de estrogênio, ligados ao estrogênio, são dimerizados e translocados para o núcleo, onde se ligam a fatores de transcrição fosforilados resultantes da sinalização mediada por GPER1. Tais complexos podem, dessa forma, se ligar às sequências ERE por meio dos receptores nucleares de estrogênio ou a outras proteínas cognatas ao DNA (Björnström & Sjöberg, 2005). Já o segundo mecanismo descreve que as interações entre GPER1 e os receptores de estrogênio ER α e ER β localizados na membrana plasmática ativam cascatas de proteínas quinases, resultando na fosforilação das mesmas proteínas cognatas ao DNA, além de outros fatores de transcrição. Esses fatores de transcrição, incluindo os próprios receptores de estrogênio, podem então interagir com sequências de DNA para regular a transcrição (Björnström & Sjöberg, 2005).

1.2.5 Efeitos De Sinalização Independente

A ativação do receptor de estrogênio, independentemente do ligante, ocorre principalmente pela fosforilação em resíduos específicos, como serina e tirosina, nos próprios receptores, ou por sua associação com co-reguladores (Nilsson et al., 2001). Esse mecanismo independente requer a ação de moléculas reguladoras necessárias para a fosforilação, como a proteína quinase A (protein kinase A - PKA), a proteína quinase C (protein kinase C - PKC), componentes da cascata de fosforilação das MAPKs, bem como citocinas inflamatórias, como a interleucina (interleukin - IL) -2, moléculas de adesão celular, como a heregulina, reguladores do ciclo celular, como as ciclinas A e D1 do ativador da proteína RAS p21, e fatores de crescimento peptídico, incluindo fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor - EGF), insulina, fator de crescimento semelhante à insulina-1 (insulin-like growth factor-1 - IGF1) e fator de crescimento transformador beta (transforming growth factor beta - TGF β) (Nilsson et al., 2001). Ainda, é possível a ocorrência de ambos os mecanismos de sinalização genômicos e não-genômicos de forma convergente.

1.2.6 Regulação Transcricional por Co-Reguladores de Receptores de Estrogênio

Além das vias regulatórias mencionadas anteriormente, a célula também expressa uma variedade de co-reguladores que podem modular a atividade transcricional dos receptores de hormônios esteroidais, conhecidos como coativadores e corepressores do receptor de estrogênio, respectivamente. Os co-reguladores são um conjunto de proteínas capazes de funcionar como integradores de sinais de hormônios esteroides e têm sido vinculados a várias doenças influenciadas por hormônios sexuais (Lonard & O'Malley, 2006). Existe uma grande quantidade de co-reguladores de receptores nucleares que desempenham papéis variados no processo de expressão gênica, incluindo modificação e reorganização da cromatina, início da transcrição, alongamento de cadeias de ácido ribonucleico (ribonucleic acid – RNA), *splicing* de ácido ribonucleico mensageiro (messenger ribonucleic acid – mRNA), tradução de mRNA, processamento de micro-RNA (miRNA) e degradação dos complexos ativados pelo receptor nuclear (Lonard & O'Malley, 2007). Os mecanismos pelos quais os co-reguladores influenciam as ações dos receptores de estrogênio ainda são tópicos de investigação e demandam elucidações, demonstrando a complexidade dos processos descritos até o momento.

1.3 Estrogênio na Sensibilização Neural e Modulação da Inflamação

Nos últimos anos, vêm sendo demonstrado que os estrogênios regulam múltiplos aspectos da resposta inflamatória e de sensibilização neural por meio de mecanismos moleculares complexos influenciados pelo sexo do indivíduo (Khan & Ahmed, 2016). Dessa forma, é possível que qualquer célula que expresse receptores de estrogênio possa responder e influenciar o desfecho da resposta dolorosa e imunológica.

Nociceptores – neurônios detectores de dor - provenientes do gânglio trigeminal (trigeminal ganglia – TG) inervando a região de cabeça e pescoço, e gânglio da raiz dorsal (dorsal root ganglia – DRG) inervando o resto do corpo expressam receptores de estrogênio (Bereiter et al., 2005). Em nociceptores, o tratamento com 17 β -estradiol (17 β -E2) possui influência sobre diversas funções e processos celulares, incluindo a mobilização de cálcio (Ca²⁺) (Chaban & Micevych, 2005), a atividade da quinase regulada por sinal extracelular (Liverman et al., 2009), a expressão de mRNA e proteína

do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (calcitonin gene-related peptide – CGRP) (Gangula et al., 2000) e do canal catiônico de potencial receptor transitório vanilóide 1 (transient receptor potential vanilloid 1 - TRPV1) (Xu et al., 2008).

Entretanto, os efeitos derivados do estrogênio sobre os nociceptores podem variar de acordo com a natureza do estímulo doloroso (Cairns & Gazerani, 2009; Fillingim et al., 2009), tendo sido reportado efeitos pronociceptivos e antinociceptivos para dor de natureza inflamatória (Straub, 2007). Quando na presença de dor de origem inflamatória, ocorre a liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, citocinas e proteases, sendo possível que o efeito do estrogênio varie dependendo do mediador inflamatório específico envolvido.

Estudos mostram que células B apresentam níveis elevados de RNA ESR1 ($ER\alpha$), enquanto as células T CD4+, T CD8+, *natural killers* (NK) e células dendríticas (DC) plasmocitoides exibem níveis intermediários. Monócitos demonstram os níveis mais baixos de RNA ESR1, entretanto, há um aumento deste RNA nas células DC originadas de monócitos, o que sugere que o ESR1 é induzido durante o processo de diferenciação das DC. Quanto ao RNA ESR2 ($ER\beta$), este é expresso de forma elevada nas células B e DC plasmocitoides, enquanto é encontrado em níveis inferiores em outros tipos celulares. Também é demonstrado que os monócitos humanos, assim como as DC derivadas destes monócitos, além das DC mieloides e plasmocitoides presentes no sangue, modificam suas respostas funcionais após serem expostos a estrogênios (Mor et al., 2003; Escribese et al., 2008; Seillet et al., 2012). Ainda, os estrogênios atuam sobre os receptores $ER\alpha$ mediando a sinalização de bradicininas em neurônios sensoriais periféricos (Rowan et al., 2014), que possuem atividade vasodilatadora e de permeabilização vascular em condições de inflamação.

Conforme mencionado anteriormente, os receptores de estrogênio são expressos em nociceptores provenientes de TGs (Bereiter et al., 2005), e sua ativação altera a expressão de determinados genes nos neurônios sensoriais (Allen & McCarson, 2005), entre eles, a prolactina, que pode contribuir para o desenvolvimento de distúrbios de dor (Diogenes et al., 2006; Patil et al., 2013a; Patil et al., 2013b; Patil et al., 2019a; Hovhannisyanyan et al., 2021), influenciar na resposta do sistema imunológico (Lahat et al., 1993; Somers et al., 1994; Peeva et al., 2003; Dimitrov et al., 2004; Peeva & Zouali, 2005; Tomio et al., 2008; Saha et al., 2009) e no metabolismo ósseo (Bataille-Simoneau et al., 1996; Seriwatanachai et al., 2008; Takahashi et al., 2008; Seriwatanachai et al., 2009; Wongdee et al., 2011; Ledesma-Colunga et al., 2017).

1.4 Prolactina

A prolactina (Prl) é um polipeptídeo hormonal produzido e liberado principalmente por células especializadas da glândula pituitária anterior (também conhecida como hipófise), chamadas de lactotróficos e classificadas dentro do grupo I dos hormônios proteicos do feixe helicoidal, pertencentes a família que engloba, além da própria prolactina, hormônio do crescimento e lactogênio placentário (Horseman & Yu-Lee, 1994). Sua denominação deriva do efeito observado em experimentos nos quais extratos da glândula pituitária bovina promoviam o crescimento do saco vitelino, estimulavam a produção de leite em pombos ou induziam a lactação em coelhos (Riddle et al., 1933), embora possua mais de 300 atividades biológicas distintas conhecidas (Bole-Feysot et al., 1998).

No genoma humano, um único gene localizado no cromossomo 6 é responsável pela codificação da prolactina (Owerbach et al., 1981), possuindo um tamanho de 10 kilobases (kb) e composto por 5 éxons e 4 íntrons (Cooke et al., 1981; Truong et al., 1984). A transcrição desse gene é regulada por duas regiões promotoras independentes. Uma região promotora proximal, situada entre as posições +33 e -250, bem como um intensificador distal e promotor superdistal encontrados nas posições -3500 a -5000 da região flanqueadora 5', sendo que ambos promotores parecem ter uma função na expressão de Prl em tecidos, com os promotores proximais envolvidos na transcrição em locais pituitários, e os distais envolvidos na transcrição em locais extrapituitários (Berwaer et al., 1991; Berwaer et al., 1994). Nesta região intensificadora, estão presentes EREs que, quando ativados por receptores de estrogênio aumentam a taxa de transcrição por meio de mecanismo de loop de DNA (Day & Maurer, 1989), facilitando a formação do constituinte transcricional (Maurer, 1982).

O DNA complementar (complementary DNA – cDNA) da prolactina humana tem 914 nucleotídeos e contém um quadro de leitura aberto de 681 nucleotídeos que codifica o pró-hormônio da prolactina, composto por 227 aminoácidos. O peptídeo sinal é constituído por 28 aminoácidos, resultando na prolactina humana madura, composta por 199 aminoácidos (Sinha, 1995) e com peso molecular de 23 kilodaltons (kDa) (Shome & Parlow, 1977). A estrutura primária da molécula de prolactina é organizada em uma única cadeia de aminoácidos, com três ligações dissulfeto intramoleculares entre seis resíduos de cisteína (Cys4-Cys11, Cys58-Cys174 e Cys191-Cys199, em humanos) (Cooke et al.,

1980). A estrutura molecular secundária e terciária da prolactina é baseada na estrutura do hormônio do crescimento e consiste em 4 hélices α dispostas de forma antiparalela (Abdel-Meguid et al., 1987; Goffin et al., 1996). Entretanto, relata-se na literatura a existência de diversas formas modificadas da estrutura da prolactina, derivadas de processos de *splicing* alternativo do transcrito primário (Emanuele et al., 1992; Wilson et al., 1992), clivagem proteolítica (Sinha et al., 1985; Clapp et al., 1994; Torner et al., 1995) e outras modificações pós-traducionais das cadeias de aminoácidos, tais como, processos de dimerização e polimerização (Sinha, 1995), fosforilação (Greenan et al., 1989; Wang & Walker, 1993), e glicosilação (Sinha, 1995).

1.4.1 Regulação da Liberação de Prolactina Pituitária e Extrapituitária

A secreção de prolactina é estimulada por um ritmo circadiano, modificado por estímulos ambientais (ex.: stress, sons, odores, luz), com o meio interno (estradiol, progesterona, glucocorticóides, osmolaridade plasmática) e por estímulos reprodutivos afetando os elementos inibitórios ou estimuladores do circuito regulador hipotalâmico (Freeman et al., 2000). As vias finais do controle estimulatório e inibitório central da secreção de prolactina são os neurônios neuroendócrinos que produzem fatores inibidores de prolactina (prolactin inhibiting factors - PIF), como dopamina (dopamine - DA), somatostatina (somatostatin - SST) e ácido γ -aminobutírico (gamma-aminobutyric acid - GABA); ou fatores liberadores de prolactina (prolactin releasing factors - PRF), como hormônio liberador de tireotropina (thyrotropin releasing hormone - TRH), ocitocina (oxytocin - OT), neurotensina (neurotensin - NT) e estrogênio (Freeman et al., 2000).

Em relação aos fatores inibidores de prolactina, tal função é primariamente realizado pela dopamina liberada por neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos, que se estende até a glândula, atuando sobre receptores de dopamina (D2), regulando a liberação de prolactina pela glândula pituitária (Freeman et al., 2000). A ativação de tais receptores, acoplados às proteínas Gi/Go, pertencentes à família de receptores transmembrana acoplados à proteína G (G protein-coupled receptors – GPCR), desencadeia tanto uma inibição rápida, quanto o retardo da liberação de prolactina. Os efeitos rápidos ocorrem em segundos, pela modificação na condutância celular, resultando em hiperpolarização e redução do cálcio intracelular (intracelular calcium - $[Ca^{2+}]_i$) (Lledo et al., 1990). Os

efeitos de retardo da dopamina estão associados à redução da atividade da adenilato ciclase (Swennen & Denef, 1982), ao metabolismo do inositol fosfato (Jarvis et al., 1988), à liberação de ácido araquidônico (Canonica, 1989) e à expressão do gene da prolactina (Maurer, 1980; Burdman et al., 1982). Dessa forma, alterações na liberação e nas taxas de depuração da dopamina afetam diretamente a taxa de liberação de prolactina pela glândula pituitária (Sellix & Freeman, 2003).

Quanto aos fatores de liberação de prolactina, no presente trabalho, destacamos o estrogênio. Pesquisas vêm demonstrando que a administração rápida de estrogênio exógeno ou os aumentos cíclicos do estradiol endógeno acarretam em uma liberação rápida de prolactina pela ativação de canais de Ca^{2+} (Brown et al., 2004; Szawka & Anselmo-Franci, 2004; Bulayeva et al., 2005). A hipótese é de que o efeito rápido do estradiol na liberação de prolactina é mediado pelos receptores de estrogênio localizados na membrana plasmática, visto que o efeito do estradiol é bloqueado pela administração de um anticorpo direcionado contra um elemento de dobradiça dos receptores de estrogênio (Watson et al., 1999; Norfleet et al., 2000). As mesmo tempo, como descrito anteriormente, variações em níveis de estrogênio resultam em um efeito mais prolongado na produção da prolactina por ativação de sua transcrição gênica. Em conclusão, o estrogênio promove um aumento na produção da prolactina e também estimula sua liberação por um processo de secreção vesicular.

O PIF e o PRF dos neurônios neuroendócrinos podem ser liberados na eminência mediana nas veias portais longas ou no lobo neuro-intermediário, conectado ao lobo anterior da glândula pituitária pelos vasos portais curtos. Dessa forma, células da glândula pituitária anterior que sintetizam e secretam prolactina, conhecidos como lactotróficos, são regulados por agentes sanguíneos do sistema nervoso central ou de origem pituitária entregues ao lobo anterior pelas veias portais longas ou curtas. Os lactotróficos também são influenciados pelo PRF e PIF liberados pelas células vizinhas (regulação parácrina) ou pelos próprios lactotróficos (regulação autócrina) (Freeman et al., 2000).

Entretanto, além da produção pituitária de prolactina, é reconhecida a produção e secreção desse hormônio em locais extrapituitários, tais como: componentes do sistema imune – linfonodos (Wu et al., 1996), timócitos (O'Neal et al., 1992), células mononucleares (Sabharwal et al., 1992; Cesario et al., 1994), e linfócitos B (Hartmann et al., 1989; McMurray et al., 1991; Lahat et al., 1993) e T (Hartmann et al., 1989; Viselli

et al., 1991) -, componentes do sistema nervoso central – hipotálamo (Hansen et al., 1982; DeVito et al., 1987; DeVito et al., 1991; Curlewis, 1992; Hnasko & Buntin, 1993; Clapp et al., 1994), mesencéfalo (Nishizuka et al., 1990), córtex cerebral (Emanuele et al., 1987; DeVito, 1988a,b), hipocampo (Siaud et al., 1989; Paut-Pagano et al., 1993), amígdalas (Siaud et al., 1989); septo pelúcido (Harlan et al., 1989; Paut-Pagano et al., 1993), núcleo caudado e putâmen (Emanuele et al., 1987), tálamo (DeVito et al., 1987; Emanuele et al., 1987; Paut-Pagano et al., 1993), ponte de Varólio no tronco cerebral (Siaud et al., 1989), cerebelo (Emanuele et al., 1987; DeVito, 1988b), medula espinhal (Emanuele et al., 1989; Harlan et al., 1989) e plexo coroide (Thompson, 1982) -, células mamárias (Nolin & Witorsch, 1976; Malven & Keenan, 1983), placenta (Robertson et al., 1990; Robertson et al., 1991), pele (Paus, 1991), glândulas sudoríparas (Robertson et al., 1986), e nervos do gânglio trigêmeo (Diogenes et al., 2006).

A prolactina extrapituitária representa uma fonte significativa de prolactina circulante e também pode se encontrar em áreas distintas extracelulares a nível de nicho celular em concentrações superiores à do plasma. Em um estudo realizado em ratos, avaliando os níveis plasmáticos de prolactina após a remoção da glândula pituitária, foram encontrados níveis de 50% do hormônio em relação ao controle, sugerindo uma capacidade compensatória de síntese e secreção de prolactina pelos sítios extrapituitários (Nagy & Berczi, 1991). Tal relevância se dá pelo papel modulatório da prolactina no comportamento cerebral e na patogênese de condições como câncer de próstata e de mama (Freeman et al., 2000), além do papel na proliferação de células do sistema imunológico, podendo resultar em comprometimento imunológico. Ainda no estudo supracitado, a neutralização da prolactina circulante com anticorpos específicos resultou em comprometimento imunológico grave e morte (Nagy & Berczi, 1991).

1.4.2 Receptores de Prolactina

A prolactina exerce suas funções biológicas pela ativação dos receptores de prolactina (prolactin receptor - PRLR), amplamente expressos em diversos tipos celulares (Mancini et al., 2008). PRLR é uma proteína transmembrana monomérica categorizada na classe 1 da superfamília de receptores de citocinas e células hematopoiéticas. O gene que codifica o PRLR humana se encontra no cromossomo 5 e compreende pelo menos

10 exons (Bazan, 1990a; Bazan 1990b). A regulação transcricional deste gene é mediada por três regiões promotoras distintas, com especificidade tecidual. O promotor I é específico para tecidos gonadais, o promotor II para o fígado, enquanto o promotor III é considerado "genérico", encontrado em tecidos gonadais e não gonadais (Hu et al., 1998). Ainda, sabe-se que a expressão de PRLR é regulada por diversos fatores, tais como, fatores de crescimento (Tseng & Zhu, 1998; Cassy et al., 2000), hormônios, como o estrogênio (Sakaguchi et al., 1994; Leondires et al., 2002; Pi et al., 2003), e a própria Prl (Matsuda & Mori, 1997).

Diversas isoformas de PRLR foram identificadas em diferentes tecidos, resultantes de transcrições iniciadas em sítios alternativos dos promotores de PRLR e de splicing alternativo de transcritos de exons codificantes e não codificantes (Hu & Dufau, 1991; Hu et al., 1998). Entretanto, cabe-se destacar que a expressão destas formas de PRLR é tecido-específica (Kinoshita et al., 2001; Yamamoto et al., 2003). As três principais isoformas de PRLR descritas em ratos e humanos são as formas curta (prolactin receptor-short - PRLR-S) e longa (prolactin receptor-long - PRLR-L), bem como uma variante intermediária raramente expressa (Goffin & Kelly, 1996; Bole-Feysot et al., 1998). Embora as isoformas variem em comprimento, a depender da quantidade de sequência de aminoácidos na cauda citoplasmática (incluindo a quantidade de resíduos de tirosina - tyrosine – Tyr) presentes, os domínios extracelulares permanecem idênticos (Kelly et al., 1991; Lesueur et al., 1991). O domínio extracelular (EC) consiste em 210 aminoácidos (Boutin et al., 1988; Boutin et al., 1989) e mostra semelhanças de sequência com outros receptores de citocinas (cytokine receptor homology domain - CRH) (Wells & Devor, 1996). O domínio extracelular pode ser ainda dividido em subdomínios D1 do terminal NH₂ (grupo amina), e D2 proximal à membrana da molécula (Kelly et al., 1991; Wells & Devos, 1996).

1.4.3 Mecanismos de Ativação e Vias de Transdução de Sinal

Em relação ao mecanismo de ativação do PRLR, esse ocorre por meio da dimerização progressiva do receptor induzida pelo ligante (Bole-Feysot et al., 1998) mediada pela molécula da prolactina que possui dois sítios de ligação. Inicialmente, ocorre uma ligação 1 entre prolactina circulante (endócrina) ou localmente produzida

(parácrina e autócrina) e uma molécula de PRLR no domínio EC (etapa 1). A formação do complexo inicial hormônio-receptor induz a interação do local de ligação 2 na mesma molécula de prolactina com um segundo PRLR (Bole-Feysot et al., 1998) (etapa 2). Dessa forma, constitui-se um complexo 1:2 (1 prolactina : 2 receptores de prolactina). Após a formação deste complexo, ocorre a ativação da tirosina quinase conhecida como Janus quinase2 (Janus kinase2 - JAK2), constitutivamente associada ao domínio intracelular (IC) do PRLR, ancoradas na cauda citoplasmática de cada PRLR. A proximidade das moléculas JAK2 permite que elas se fosforilem entre si e com os receptores de prolactina (Jabbour & Kelly, 1997). O PRLR ativado (fosforilado) pode então ativar uma variedade de vias de sinalização (Bole-Feysot et al., 1998).

Após ativação, é sabido que a via de sinalização mais comumente associada ao PRLR-L é a via JAK-STAT. Membros da família de proteínas transdutoras e ativadores de transcrição (signal transducer and activator of transcription – STAT) (Ihle et al., 1994), STAT1, STAT3, STAT5a e STAT5b são as moléculas de transdução centrais das vias de transdução de sinal iniciadas pela ativação da PRLR-L (Goffin et al., 1998; Jabbour et al., 1998). STAT contém um domínio de ligação ao DNA, um domínio semelhante à quinase Src homóloga ao domínio 3 (Src kinase homology domain 3 – SH3), um domínio semelhante ao SH2 e um domínio de transativação terminal NH2 e COOH (grupo carboxila) (Finidori & Kelly, 1995). De acordo com o modelo de consenso de ativação STAT, um resíduo Tyr fosforilado do PRLR-L ativado interage com o domínio SH2 de um STAT. Enquanto está ligado ao receptor, o STAT é fosforilado pela JAK associada ao receptor. Posteriormente, o STAT fosforilado se desassocia do receptor e hetero- ou homodimeriza por meio de seus resíduos de fosfotirosina com o domínio SH2 de outra molécula STAT fosforilada. Finalmente, o dímero STAT transloca-se para o núcleo e ativa um motivo de ligação ao DNA STAT no promotor de um gene alvo (Bole-Feysot et al., 1998), conhecido como sequência ativada por gamma-interferon (γ -interferon activated sequence - GAS) (Horseman & Yu-Lee, 1994). Apesar de JAK-STAT representarem as vias primárias iniciadas pela ativação da PRLR-L, diversos estudos também apontam para a ativação da cascata de proteína quinase ativada por mitógeno (mitogen-activated protein - MAP) (Buckley et al., 1994; Clevenger et al., 1994; Piccoletti et al., 1994; Das & Vonderhaar, 1995a; Rwin et al., 1995; Das & Vonderhaar, 1996; Nohara et al., 1997; Nemeth et al., 1998). Os resíduos de fosfotirosina da PRLR-L podem funcionar como pontos de ancoragem para proteínas adaptadoras

(Shc/Grb2/SOS), estabelecendo a ligação do receptor com a cascata Ras/Raf/MAPK (Da R & Vonderhaar, 1995b; Carter-Su & Smith, 1998). Embora inicialmente as vias JAK-STAT e MAPK fossem consideradas independentes ou paralelas, dados sugerem uma interconexão entre essas vias (Guerra et al., 1998). Tais vias de sinalização associadas ao PRLR-L regulam a transcrição e produzem efeitos de longa-duração (Brown et al., 2012; Yip et al., 2012).

No que se refere ao PRLR-S, pouco é sabido sobre suas vias de transdução de sinal. É apontado que a ativação da PRLR-S pela Prl produz efeitos transitórios, de curta duração, em neurônios sensoriais através da ativação das vias da proteína quinase C tipo épsilon (protein kinase C epsilon type - PKC ϵ) ou fosfoinositídeo 3-quinase (phosphoinositide 3-kinase - PI3K), mas não é capaz de induzir a via JAK-STAT (Belugin et al., 2013). Conforme mencionado, o PRLR pertence à família de receptores de citocinas de classe 1, e este achado é consistente com a capacidade de outros membros desta família de ativar independentemente as vias PKC e PI3K (Boutin et al., 1988). Os receptores de citocinas da classe 1 têm a capacidade de ativar as vias PKC e PI3K em cascata, uma após a outra (Ben-Jonathan et al., 2008) e, ainda, podem ser ativadas independentemente nos neurônios sensoriais do gânglio trigeminal (Belugin et al., 2013). A ativação dessas vias de sinalização celular pela Prl em células não neuronais já foi previamente demonstrada, incluindo a ativação da PKC pela Prl em células do sistema imunológico (Kumar et al., 1997).

1.4.4 Prolactina na Modulação da Inflamação

A prolactina é um membro integrante da cadeia imuno-neuro-endocrinológica e há muito tempo está relacionada com doenças autoimunes (Vera-Lastra et al., 2002; Anaya & Shoenfeld, 2005; Watad et al., 2016). Apesar de este hormônio ter recebido o nome de prolactina por ter seu efeito na lactação inicialmente identificado, muitos dos inúmeros efeitos biológicos são relacionados a regulação imunológica, algo não tão surpreendente já que seus receptores pertencem à família de receptores da citocina e ao caminho de sinalização da JAK/STAT, muito utilizada por mediadores de inflamação. Altos níveis de prolactina sérica foram descritos na história de várias doenças autoimunes, tanto específicas de órgãos, como diabetes tipo 1, esclerose múltipla, miastenia gravis,

pênfigo vulgar, psoríase vulgar, doença celíaca, doença autoimune da tireoide, uveíte autoimune, doença de Addison, hipofisite linfocítica, cardiomiopatia periparto e rejeição de transplante cardíaco; quanto não específicas, como lúpus eritematoso sistêmico, síndrome antifosfolípide, artrite reumatoide, artrite psoriática, síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica, doença de Behçet, e artrite reativa (Orbach et al., 2007). Tais interações entre prolactina, citocinas, anticorpos e envolvimento de órgãos corroboram a influência ativa da prolactina nos processos inflamatórios e imunológicos, atuando como um elo entre o sistema neuroendócrino e imunológico (De Bellis et al., 2005; Szyper-Kravitz et al., 2005).

É sabido que receptores de prolactina são expressos em uma grande variedade de células imunológicas, incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos, granulócitos, células NK e células epiteliais tímicas (Borba et al., 2019). A Prl pode mediar efeitos em todos esses tipos celulares. Conforme descrito anteriormente, o receptor de prolactina pertence à superfamília de receptores de citocinas e células hematopoiéticas, que também inclui receptores para leptina, interleucina (interleukin – IL) -2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, hormônio do crescimento, eritropoietina e fator inibidor de leucemia. A ligação da prolactina ao seu receptor desencadeia diferentes vias de reação, nomeadamente PKC/P13K, JAK/STAT e MAPK (Bole-Feysot et al., 1998). A ativação dessas cascatas tem a capacidade de influenciar a secreção, diferenciação, proliferação e sobrevivência das células imunes (Somers et al., 1994), podendo gerar efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios.

Entre os efeitos pró-inflamatórios, foi verificada que a Prl é capaz de estimular a secreção de citocinas, como o interferon- γ (IFN- γ), a IL-12 e a IL-10 em células sanguíneas totais quando administrados lipopolissacarídeos (LPS) ou fitohemaglutininas (Matalka, 2003), além de regular as citocinas do tipo Th1, aumentando a produção de IL-1, IL-2, IL-6, e a expressão do receptor de IL-2 (Vera-Lastra et al., 2002; Brand et al., 2004). Nos macrófagos, a Prl estimula a liberação de quimiocinas, tais como a proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP-1 α , também conhecida com CCL4), a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, também conhecida como CCL2), a proteína 10 induzida por interferon-gama (IP-10) e a quimiocina CCL5 (Sodhi & Tripathi, 2008). A Prl também aumenta a atividade citotóxica dos macrófagos e a produção de espécies reativas de oxigênio em ambientes tumorais (Majumder et al., 2002; Malaguarnera et al., 2004). Nos granulócitos, a Prl induz a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e fator regulador do interferon 1 (interferon regulatory factor 1 - IRF1) (Dogusan et al.,

2001). Além disso, a Prl aumenta a proliferação e a secreção de IFN- γ em células NK (Matera et al., 1999; Sun et al., 2004). Em um modelo de doença de Chagas em ratos, a Prl aumentou o número de células NK ativadas, reduziu a apoptose dos esplenócitos e aumentou a porcentagem de células T CD4+ produtoras de IFN- γ (Del Vecchio Filipin et al., 2019).

A Prl ainda atua como um comitógeno, promovendo a sobrevivência celular em células T (Sabharwal et al., 1992; Bauernhofer et al., 2003) e aumentando a produção do TNF α , IFN- γ e IL-2 em células T CD8+ tratadas com acetato de miristato de forbol (Dimitrov et al., 2004). Também reduz a função supressora das células T reguladoras (Legorreta-Haquet et al., 2012; Wu et al., 2014) e nas células B, a Prl diminui a apoptose de células B T1 durante a seleção negativa, induzindo a expressão do receptor antiapoptótico do gene tipo II do interferon-gama (INF- γ type II receptor - INF- γ RII) e reduzindo a expressão do gene pró-apoptótico Trp63. A Prl também modifica a edição de células B, reduzindo o limiar de ativação da anergia nessas células e aumentando o cálcio intracelular (Saha et al., 2009). Em células B ativadas, a Prl aumenta a secreção de anticorpos (Lahat et al., 1993) e estimula a proliferação em hibridomas de células B (Richards et al., 1998).

Em relação aos efeitos anti-inflamatórios exercidos pela Prl, essa possui a capacidade de exercer um efeito de supressão na resposta imune ao LPS, inibindo a expressão do receptor tipo Toll 4 induzido pelo LPS e a fosforilação do fator nuclear *kappa-light-chain-enhancer* de células B ativadas (NF- κ B). Isso resulta na diminuição da secreção de TNF- α , interleucina-1 beta (interleukin-1 beta - IL-1 β) e IL-6 em cotilédones placentários (Olmos-Ortiz et al., 2019). Estudos in vitro utilizando membranas fetais humanas demonstraram que o LPS estimula a secreção de TNF- α e IL-1 β nas regiões coriódica e amniótica, entretanto, o tratamento conjunto com Prl reduz a expressão de TNF- α na região coriódica e de IL-1 β em ambas as regiões (Flores-Espinosa et al., 2017). Culturas de explantes de membrana fetal mostraram expressão de IL-1 β , TNF- α e metalopeptidase de matriz 9 após 24 horas, porém, na presença de Prl, a expressão de IL-1 β e metalopeptidase de matriz 9 é reduzida, enquanto a expressão de TNF- α não apresenta uma redução significativa (Zaga-Clavellina et al., 2014).

Em resumo, pesquisas *in vitro* e *in vivo* sugerem que a Prl tem uma função pró- e anti-inflamatória. E que essas dualidades de efeito são amplamente influenciadas pelo tipo de célula-alvo e pela composição molecular do ambiente circundante.

1.4.5 Prolactina e Metabolismo Ósseo

Além do papel destacado na modulação da inflamação, estudos vêm demonstrando que a prolactina está associada com o processo de reabsorção/neoformação óssea (turnover ósseo). Entretanto, não há até o presente momento nenhum estudo que tenha avaliado os efeitos da prolactina na reabsorção óssea que ocorre durante a periodontite apical.

Dito isso, as informações disponíveis até o presente momento demonstram que a prolactina reduz a expressão da osteoprotegerina (osteoprotegerin - OPG) nos osteoblastos, enquanto simultaneamente aumenta os níveis do ativador de receptor do ligante do fator nuclear kappa-B (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand – RANKL), um fator crucial na formação de osteoclastos. Esse fenômeno resulta em um aumento das taxas de renovação óssea (Seriwatanachai et al., 2008). Em outro estudo com células pré-osteoblásticas humanas, foi demonstrado que a prolactina diminuiu significativamente a proliferação celular, ao mesmo tempo em que aumentou os marcadores de formação óssea, como o fator de transcrição 2 relacionado ao Runt (Runt-related transcription factor 2 - RUNX2) e fosfatase alcalina (alkaline phosphatase – ALP), durante os estágios iniciais da diferenciação dos osteoblastos (Seriwatanachai et al., 2009). Ainda, observou-se que o efeito da prolactina nos osteoblastos não depende de suprimentos adicionais de hormônios sexuais, o que reforça a ideia do impacto direto da prolactina nessas células (Seriwatanachai et al., 2009). Notavelmente, em fases posteriores, a prolactina reduziu a expressão desses marcadores de formação óssea, indicando um efeito bidirecional na função dos osteoblastos (Seriwatanachai et al., 2009). Além disso, a expressão de receptores de prolactina foi confirmada em células semelhantes a osteoblastos, como células MG-63 e Saos (Bataille-Simoneau et al., 1996).

Apesar da ausência de evidências conclusivas sobre o efeito direto da prolactina nos osteoclastos, alguns estudos sugerem uma associação indireta (Takahashi et al., 2008; Wongdee et al., 2011). Além da superexpressão de RANKL em precursores de

osteoblastos, a prolactina também parece desempenhar um papel na regulação positiva de produção e secreção de moduladores osteoclastogênicos em linfócitos T e macrófagos, como na proteína quimioatraente de monócitos-1 (monocyte chemoattractant protein-1 - MCP-1), ciclo-oxigenase-2 (cyclooxygenase-2 - COX-2), TNF- α , IL-1 e efrina-B1, influenciando a função dos osteoclastos e a remodelação óssea (Wongdee et al., 2011). Outro estudo demonstrou um efeito bidirecional da prolactina; em concentrações baixas, variando de 0,01 a 100 ng/mL, a atividade osteoclástica foi reduzida, enquanto em concentrações acima de 100 ng/mL, essa atividade foi aumentada (Takahashi et al., 2008). Adicionalmente, foi verificado que a prolactina desencadeia a fosforilação e ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição-3 (STAT3), resultando na regulação negativa da diferenciação dos osteoclastos, que é induzida por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 (Ledesma-Colunga et al., 2017). Isso inclui a inibição do ativador do receptor RANKL, um promotor significativo da formação de osteoclastos (Ledesma-Colunga et al., 2017).

Portanto, a prolactina pode ter um efeito bidirecional através do controle de produção e secreção de fatores que podem estimular ou inibir a diferenciação e função dos osteoblastos e osteoclastos.

1.4.6 Prolactina e Papel na Sensibilização Neural

Embora o presente trabalho não tenha objetivado a avaliação do papel da prolactina na sensibilização neural em periodontite apical, é de fundamental importância o entendimento do papel neuronal na modulação da inflamação e reabsorção óssea que ocorre nesta doença e que podem ser mediados pela prolactina de forma sexo-específica.

Os tecidos perirradiculares possuem um suprimento abundante de neurônios que se originam no gânglio trigêmeo. Além destes, vasos sanguíneos, fibroblastos, células epiteliais, odontoblastos, cementoblastos, osteoblastos, osteoclastos, macrófagos e células-tronco indiferenciadas que formam o ligamento periodontal e o osso alveolar estão presentes (Hassel, 1993; Nanci & Bosshardt, 2006). Em condição de inflamação, a resposta neurogênica, conhecida como inflamação neurogênica, é iniciada quando neuropeptídeos, como a substância P (substance P - SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), são liberados por nociceptores ativados e atuam em receptores

nas células imunes residentes e nas células endoteliais, produzindo vasodilatação, extravasamento plasmático e o recrutamento de outras células imunes (Luthman et al., 1988; Lundy & Linden, 2004; Sakallioğlu et al., 2008; Menon & Kishen, 2023). Os neuropeptídeos ativam células imunológicas que liberam citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (tumor necrosis factor alpha - TNF α), IL-1, IL-6, fator de crescimento nervoso e prostaglandina E2 que, por sua vez, são conhecidos por ativar neurônios sensoriais (Crosson et al., 2019; Kabata & Artis, 2019). Vale destacar que a inflamação neurogênica ocorre devido à ativação dos nociceptores periféricos, desencadeando eventos inflamatórios nos tecidos que envolvem os sistemas imunológicos inato e adaptativo do organismo. A prova de uma conexão funcional entre neurônios sensoriais e células imunológicas está na proximidade entre as terminações nervosas sensoriais e tais células. Isso é apoiado pela expressão de receptores específicos de neuropeptídeos em células imunes, bem como receptores de citocinas e receptores capazes de reconhecer patógenos microbianos em neurônios nociceptores trigeminais (Takeda et al., 2007; Chiu et al., 2012).

Estudos ainda sugerem que a inflamação, a lesão tecidual e o trauma levam a uma regulação positiva da Prl extrapituitária, de maneira sexo-dependente e regulada pelos estrogênios, nos terminais periféricos e centrais dos neurônios sensoriais (Diogenes et al., 2006; Patil et al., 2013a; Patil et al., 2013b). A expressão da prolactina por neurônios do nervo trigêmeo foi descrita pela primeira vez em um estudo sobre controle sexo-específico da dor, que avaliou o efeito gênico do estrogênio nos neurônios trigêmeos (Diogenes et al., 2006). De grande importância, foi demonstrado que a prolactina produzida pelos neurônios age de forma autócrina nesses neurônios resultando em uma sensibilização e potencialização de respostas neuronais (Diogenes et al., 2006). A hipótese relacionada aos efeitos da Prl na excitabilidade de neurônios sensoriais em contextos de dor inflamatória e não inflamatória de maneira sexo-específica, com maior expressão no gênero feminino, é de que a Prl é guiada pela regulação da tradução do mRNA de PRLR, controlado pelo E2 (Patil et al., 2019b).

Estudos clínicos e pré-clínicos indicam que o estresse relacionado a lesões e inflamações desencadeia a liberação de Prl não apenas pela glândula pituitária (Chernow et al., 1987; Noreng et al., 1987; Yardeni et al., 2007), mas em outros tecidos, como a pele e a medula espinhal (BenJonathan et al., 1996; Scotland et al., 2011; Patil et al., 2013). Dessa forma, podemos hipotetizar que a Prl pode estar presente nos tecidos

circundando o periodonto apical. Por fim, a ativação do PRLR pode induzir alterações epigenéticas e regular a transcrição de vários genes por meio da via STAT (Bole Feysot et al., 1998; Ben-Jonathan et al., 2008). Essa regulação transcricional subsequente pode levar a uma maior diversificação nas respostas dos nociceptores à lesão, especialmente porque essa via pode não ser induzida em neurônios masculinos, que geralmente possuem baixos níveis de PRLR funcional em muitos tipos neuronais sensoriais (Patil et al., 2019b), reforçando a ideia de dimorfismo nas respostas do organismo. Também, foi demonstrado que a ablação global de Prl e PRLR leva a uma redução substancial e seletiva para mulheres na hipersensibilidade pós-operatória e inflamatória ao calor e hipersensibilidade mecânica, embora o último efeito tenha sido observado em ambos camundongos machos e fêmeas (Patil et al., 2013a, Patil et al., 2013b). Com base nesses dados, é seguro determinar que prolactina está envolvida, pelo menos parcialmente, na diferença relacionada aos mecanismos de sensibilização neural de maneira sexo-específicas e nas respostas teciduais frente à estímulos nocivos ao organismo.

Uma variedade de condições que evocam dor, tais como as associadas a procedimentos cirúrgicos (Noel et al., 1972; Sakellaris et al., 2004), enxaqueca (Cassidy et al., 2003; Bosco et al., 2008), queimaduras (Dugan et al., 2004), artrite reumatoide (Matteo et al., 1998; Straub et al., 2002), e osteoartrite (Fojtíková et al., 2010), desencadeiam um aumento nos níveis séricos de Prl em homens, e em um aumento ainda maior em mulheres. A periodontite apical é uma condição caracterizada pela presença ou ausência de dor. Entretanto, até o presente momento, não existem informações pertinentes à presença da prolactina em tal condição patológica.

1.5. Lacunas nas Evidências Atuais

A periodontite apical é um grupo de doenças inflamatórias causadas por microrganismos que infectam o sistema de canais radiculares. O processo inicia-se após necrose pulpar por cárie, trauma ou procedimentos iatrogênicos, quando bactérias invadem e colonizam o sistema de canais radiculares (Siqueira & Rôças, 2007). Após a ativação dos receptores de reconhecimento de patógenos e da expressão de mediadores bioquímicos intra- e extracelulares, diversos tipos celulares são ativados. Como parte da resposta imunoinflamatória, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, células plasmáticas,

células dendríticas e células NK são recrutadas para o local da inflamação com o objetivo de eliminar o agente agressor (Stashenko et al., 1992; Nair 2004). Essa ação é coordenada e regulada pela liberação de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e outras moléculas bioativas (Stashenko et al., 1992; Nair 2004).

Radiograficamente, a AP é caracterizada por reabsorção óssea ao redor do dente inflamado/infectado. Os componentes envolvidos no processo de reabsorção das estruturas ósseas e dentárias são conhecidos como mediadores canônicos da osteoclastogênese e incluem o receptor ativador do fator nuclear NF kB (RANK), o ligante RANK (RANK-L) e a osteoprotegerina (OPG) (Boyce 2013; Andruciolu et al., 2019). RANK é um receptor localizado na superfície das células clásticas que participa na diferenciação celular. RANKL é um ligante solúvel produzido por osteoblastos, osteócitos e células do sistema imunológico que, ao se ligar ao receptor RANK, induzem a expressão de genes específicos da linhagem de osteoclastos, como a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), a metaloproteinase de matriz 9 (MMP 9), a catepsina K e o receptor de calcitonina, promovendo a diferenciação, maturação e ativação dos osteoclastos para estimular a reabsorção de tecidos mineralizados (Wang & McCauley, 2011; Boyce 2013). RANKL promove a maturação e atividade dos osteoclastos (Boyce 2013). Por outro lado, a OPG é um receptor solúvel que se liga ao RANKL, inibindo a diferenciação e atividade dos osteoclastos. O desequilíbrio na expressão de RANKL e OPG em condições inflamatórias, caracterizado pelo aumento de RANKL e redução da atividade de OPG, resulta em osteoclastogênese exacerbada e reabsorção óssea (Menezes et al., 2008; Cavalla et al., 2021).

A prevalência global de AP é relatada em cerca de 52% (Tibúrcio-Machado et al., 2021). Essa prevalência tende a aumentar em dentes tratados endodonticamente, com o avanço da idade e na presença de condições sistêmicas (Tibúrcio-Machado et al., 2021). Entretanto, até o presente momento, pouco se sabe sobre o dimorfismo sexual envolvido no desenvolvimento e progressão desta doença. Dados provenientes de estudos clínicos demonstram que a AP é significativamente mais prevalente em homens diabéticos do que em mulheres diabéticas (Al-Nazhan et al., 2017). Ainda, mulheres fumantes podem possuir uma prevalência de AP significativamente maior em comparação aos homens fumantes (Al-Nazhan et al., 2017). Em outro estudo, mulheres com doença inflamatória intestinal apresentaram um número significativamente maior de dentes com AP do que os controles pareados, o que não foi observado em homens (Piras et al., 2017). Estudos

adicionais investigando o dimorfismo sexual na AP demonstraram a expressão diferencial de citocinas e marcadores de estresse oxidativo (Cotti et al., 2015). A expressão de IL-2 foi significativamente maior nos tecidos de AP de homens e mulheres em comparação com controles saudáveis correspondentes, enquanto essa expressão foi mais elevada em homens com AP quando com mulheres com AP (Cotti et al., 2015). Níveis elevados de IL-1 β , TNF- α e IL-6 foram encontrados em tecidos com AP de homens em comparação com mulheres (Bakhsh et al., 2022), o que também foi confirmado em um modelo de camundongo (Valerio et al., 2017). Em contraste, os níveis de espécies reativas de oxigênio aumentaram significativamente apenas nos tecidos com AP das mulheres (Cotti et al., 2015).

A resposta individual do hospedeiro durante o desenvolvimento da AP também pode ser modulada por polimorfismos genéticos, conforme demonstrado por estudo prévio que mostrou a associação de polimorfismos de nucleotídeo único em genes envolvidos com inflamação, cicatrização de feridas, remodelação óssea e outros genes relevantes relacionados à AP (de Souza et al., 2019). Recentemente, um estudo de associação genômica ampla e um estudo de associações baseadas em genes relataram expressões sexo-específicas entre polimorfismos em numerosos genes e AP (Petty et al., 2023; Lillis et al., 2024). Estas descobertas fornecem evidências de que o dimorfismo sexual influencia a predisposição para AP e estão de acordo com estudos que utilizam modelos animais, que mostram diferenças entre os sexos na inflamação periapical e no padrão de perda óssea (Valerio et al., 2017).

Com base nessas informações, estudos vem demonstrando que essa doença é modulada por diversos fatores sexo-específicos, entre eles o estrogênio que, quando em deficiência, impacta significativamente na progressão da lesão (Rossetti et al., 2022). Uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos mostrou que animais com deficiência de estrogênio apresentaram lesões periapicais significativamente maiores e/ou menor densidade óssea radiográfica em comparação com animais saudáveis operados de forma simulada (Rossetti et al., 2022), demonstrando um papel protetor do estrogênio na progressão da AP.

Baseado nessas informações, é possível hipotetizarmos que o sexo do indivíduo de fato possui grande influência no desenvolvimento e progressão da AP. Conforme descrito anteriormente, hormônios pituitários, incluindo a prolactina, são altamente

expressos nos nervos sensoriais provenientes do gânglio trigeminal (Diogenes et al., 2006; Hovhannisyanyan et al., 2021), sendo esse o gânglio sensorial responsável por cada nervo trigeminal (quinto par de nervos cranianos). Em um estudo prévio, foi detectado entre 50-60% de PRLR nos neurônios provenientes de TG de ratas fêmeas, assim como na maioria das células gliais satélites (satellite glial cells – SGC) envolvendo os corpos celulares neuronais (Kossiakoff, 2004). Em uma análise mais detalhada, foi revelado que o PRLR-L está presente em apenas 3-5% dos neurônios TG de ratos machos e fêmeas, sugerindo que a maior parte da imunorreatividade ao PRLR se deve à isoforma curta (Kossiakoff, 2004). Em relação à polpa dentária, essa é ricamente innervada por uma densa rede de terminações nervosas provenientes dos neurônios trigeminais. Essas fibras neurais possuem uma grande capacidade para detectar uma variedade de estímulos nocivos, incluindo sinais térmicos, mecânicos, químicos e biológicos (Diogenes, 2020). Em uma análise do tecido da polpa dentária humana realizado por estudo prévio, foi verificada a ausência predominante do PRLR-L nos nervos aferentes, porém presente na bainha de mielina da glia periférica envolvendo os nervos (Kossiakoff, 2004). Em contrapartida, a utilização de anticorpos humanos específicos para isoformas mostrou a presença de PRLR-S, tanto no axoplasma do nervo, quanto na glia periférica (Kossiakoff, 2004). Dessa forma, dada a presença de receptores de prolactina, é possível hipotetizarmos a presença de prolactina na região do periodonto apical.

Tendo em conhecimento o papel do estrogênio na modulação da prolactina e da periodontite apical, a presença de prolactina e seus receptores nos nervos trigeminais, e o papel da prolactina na modulação da inflamação e metabolismo ósseo, é possível hipotetizarmos que a prolactina pode estar envolvida na patogênese e fisiopatologia da periodontite apical. Portanto, **o objetivo do presente estudo foi o de avaliar a expressão de prolactina e sua influência na modulação da inflamação e reabsorção óssea na periodontite apical.**

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de prolactina e sua influência na modulação da inflamação e metabolismo ósseo em condição de periodontite apical.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar, por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), os níveis de estrogênio em camundongos fêmeas ovariectomizadas (OVX) com e sem reposição de β -estradiol;

Analisar, por meio de microtomografia computadorizada, o tamanho das lesões periapicais, correlacionando com os níveis de estrogênio em camundongos OVX e prolactina e em camundongos com ablação do gene de receptor de prolactina (PRLR knockout);

Quantificar, por método de transcrição reversa reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR), a expressão de prolactina, receptores de prolactina e mediadores químicos de inflamação em gânglio trigeminal, glândula pituitária e dentes/lesão periapical de camundongos OVX com e sem reposição de β -estradiol;

Avaliar, por método de imuno-histoquímica, a expressão de prolactina e de células do sistema imune de camundongos OVX com e sem reposição de β -estradiol;

Analisar a mineralização em células tratadas com prolactina, por meio de método de co-cultura celular utilizando uma linhagem celular precursora de osteoblastos (MC3T3) e células provenientes do gânglio trigeminal de camundongos.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A periodontite apical é uma doença modulada por diversos fatores locais e sistêmicos. Diante das condições experimentais desse estudo, foi possível demonstrar pela primeira vez que a regulação da periodontite apical pelo estrogênio é modulada, ao menos em parte, pela prolactina. Ainda, pela primeira vez, foi estabelecida a presença da prolactina e do receptor de prolactina no local da periodontite apical.

Conforme esperado, a reposição de estrogênio resultou em menor volume de lesão periapical, corroborando o papel protetor do estrogênio na progressão desta doença. Ainda, a deleção do gene do receptor da prolactina, por meio da utilização de camundongos PRLR knockout, resultou em lesões periapicais significativamente maiores. De forma complementar, a ausência de diferenças na expressão de Gh corrobora a hipótese de que o estrogênio é o principal mediador na expressão de prolactina/receptores de prolactina em periodontite apical. Estes resultados em conjunto representam a primeira demonstração de que a prolactina, mediada pelo estrogênio, regula a perda óssea na periodontite apical e que este efeito é sexo-específico e detectado apenas em camundongos fêmeas.

No presente estudo, não houve diferenças na expressão de IL-1 α e IL-1 β , e apenas um ligeiro aumento na expressão de células CD68+ (macrófagos), CD3+ (T linfócitos) e Ly6G+ (neutrófilos) no lado exposto de animais E2 em relação aos animais Veh. Dessa forma, podemos hipotetizar que a os efeitos do E2/prolactina não são exercidos na modulação direta de células inflamatórias, mas sim na modulação direta de células ósseas. Ao avaliarmos os efeitos na mineralização de células precursoras de osteoblastos em cocultura com células neuronais do gânglio trigeminal suplementadas com E2 ou E2 + antagonista de PRLR, foi evidente o papel dos neurônios TG na expressão de Prl extrapituitária e por consequência a comprovação dos efeitos do conjunto E2/Prl na modulação de células ósseas, além da importância exercida pela Prl extrapituitária.

Em conclusão, além de demonstrarmos que a a regulação da periodontite apical pelo estrogênio é mediada, ao menos em parte, pela Prl, demonstramos também a

presença de fontes de Prl extrapituitária nas lesões apicais e que diversos tipos de células expressam PRLR. Além disso, a deleção genética de PRLR levou a um aumento significativo da perda óssea. A maioria dos efeitos observados parece ser decorrente da modulação direta das células ósseas pela Prl, já que houve pouco ou nenhum impacto na resposta imune, embora sejam necessários estudos adicionais para confirmar essas observações. Finalmente, o papel regulador recentemente descoberto da Prl na osteólise em periodontite apical, somado ao seu conhecido papel sexualmente dimórfico na dor, sugere um novo alvo terapêutico para o tratamento da periodontite apical.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MEGUID S. S., et al. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 18, p. 6434-6437, 1987.

AHMADI, M.; KIAKOJORI, A.; MOUDI, S. Association of anxiety with pain perception following periodontal flap surgery. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 28-33, 2018.

AL-NAZHAN, S. A., et al. Prevalence of apical periodontitis and quality of root canal treatment in an adult Saudi population. **Saudi Medical Journal**, v. 38, n. 4, p. 413–421, 2017.

ALLEN, A. L., MCCARSON, K. E. Estrogen increases nociception-evoked brain-derived neurotrophic factor gene expression in the female rat. **Neuroendocrinology**, v. 81, n. 3, p. 193–199, 2005.

ANAYA, J. M.; SHOENFELD, Y. Multiple autoimmune disease in a patient with hyperprolactinemia. **Israel Medical Association Journal**, v. 7, n. 11, p. 740-741, 2005.

ANDRUCIOLI, M., et al. Quantification of pro-inflammatory cytokines and osteoclastogenesis markers in successful and failed orthodontic mini-implants. **Journal of Applied Oral Sciences**, v. 27, p. e20180476, 2019.

ANNIBALINI, G., et al. Effects of sex hormones on inflammatory response in male and female vascular endothelial cells. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 37, n. 9, p. 861-869, 2017.

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1269–1304, 2001.

AUSTAH, O. N., et al. Capsaicin-sensitive innervation modulates the development of apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 10, p. 1496–1502, 2016.

AUSTAH, O., et al. Expression of neurotrophic factors in human dentin and their regulation of trigeminal neurite outgrowth. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 4, p. 414–419, 2019.

AVERBECK, B., et al. Sex differences in thermal detection and thermal pain threshold and the thermal grill illusion: a psychophysical study in young volunteers. **Biology of Sex Differences**, v. 8, n. 1, p. 1-13; 2017.

BAKSHSH, A., et al. The impact of apical periodontitis, non-surgical root canal retreatment and periapical surgery on serum inflammatory biomarkers. **International Endodontic Journal**, v. 55, n. 9, p. 923–937, 2022.

BARTON, M., et al. Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 176, p. 4–15, 2018.

BASBAUM, A. I., et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BATAILLE-SIMONEAU, N., et al. Expression of prolactin receptors in human osteosarcoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 229, n. 1, p. 323–328, 1996.

BAUERNHOFER, T., et al. Role of prolactin receptor and CD25 in protection of circulating T cells from apoptosis in patients with breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 8, p. 1301–1309, 2003.

BAZAN, J. F. Haemopoietic receptors and helical cytokines. **Immunology Today**, v. 11, n. 10, p. 350–354, 1990.

BAZAN, J. F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 18, p. 6934–6938, 1990.

BELUGIN, S., et al. Mechanisms of transient signaling via short and long prolactin receptor isoforms in female and male sensory neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 48, p. 34943–34955, 2013.

BEM-JONATHAN, N., et al. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 6, p. 639–669, 1996.

BEN-JONATHAN, N.; LAPENSEE, C. R.; LAPENSEE E. W. What can we learn from rodents about prolactin in humans? **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 1, p. 1–41, 2008.

BEREITER, D. A.; CIOFFI, J. L.; BEREITER, D. F. Oestrogen receptor-immunoreactive neurons in the trigeminal sensory system of male and cycling female rats. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 11, p. 971-979, 2005.

BERWAER, M., et al. Multihormonal regulation of the human prolactin gene expression from 5000 bp of its upstream sequence. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 80, n. 1-3, p. 53-64, 1991.

BERWAER, M.; MARTIAL, J. A.; DAVIS, J. R. Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. **Molecular Endocrinology**, v. 8, n. 5, p. 635-642, 1994.

BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 4, p. 833–842, 2005.

BOLE-FEYSOT, C., et al. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 3, p. 225–268, 1998.

BOONYARATANAKORNKIT, V. Scaffolding proteins mediating membrane-initiated extra-nuclear actions of estrogen receptor. **Steroids**, v. 76, n. 9, p. 877–884, 2011.

BOUTIN, J. M., et al. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. **Cell**, v. 53, n. 1, p. 69–77, 1988.

BOUTIN, J. M., et al. Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. **Molecular Endocrinology**, v. 3, n. 9, p. 1455–1461, 1989.

BORBA, V. V.; ZANDMAN-GODDARD, G.; SHOENFELD, Y. Prolactin and autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 73, 2018.

BORBA, V. V.; ZANDMAN-GODDARD, G.; SHOENFELD, Y. Prolactin and autoimmunity: The hormone as an inflammatory cytokine. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 33, n. 6, p. 101324, 2019.

BOSCO, D., et al. Relationship between high prolactin levels and migraine attacks in patients with microprolactinoma. **Journal of Headache and Pain**, v. 9, n. 2, p. 103-107, 2008.

BOYCE, B. F. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 10, p. 860-867, 2013.

BOWEN, J. M., et al. Downregulation of long-form prolactin receptor mRNA during prolactin-induced luteal regression. **European Journal of Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 285-292, 2000.

BRAND, J. M., et al. Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. **European Cytokine Network**, v. 15, n. 2, p. 99-104, 2004.

BROWN, A. M., et al. Effects of cyclic steroid hormone replacement on prolactin and luteinizing hormone surges in female rats. **Reproduction**, v. 128, n. 3, p. 373-378, 2004.

BROWN, R. S. E., et al. Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons. **Endocrinology**, v. 153, n. 5, p. 2375–2384, 2012.

BROWN, R. S. E., et al. Conditional deletion of the prolactin receptor reveals functional subpopulations of dopamine neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 35, p. 9173–9185, 2016.

BUCKLEY, A. R.; et al. Prolactin-induced phosphorylation and nuclear translocation of MAP kinase in Nb2 lymphoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 204, n. 3, p. 1158–1164, 1994.

BULAYEVA, N. N., et al. Mechanisms of membrane estrogen receptor- α -mediated rapid stimulation of Ca^{2+} levels and prolactin release in a pituitary cell line. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 288, n. 2, p. E388-397, 2005.

BURDMAN, J. A., et al. Lisuride, a dopamine agonist, inhibits DNA synthesis in the pituitary gland. **Neuroendocrinology**, v. 35, n. 4, p. 282-286, 1982.

CAIRNS, B. E.; GAZERANI, P. Sex-related differences in pain. **Maturitas**, v. 63, n. 4, p. 292–296, 2009.

CANONICO, P. L. D-2 dopamine receptor activation reduces free [3H]arachidonate release induced by hypophysiotropic peptides in anterior pituitary cells. **Endocrinology**, v. 125, n. 3, p. 1180-1186, 1989.

CARMICHAEL, N. M. E., et al. Sex differences in inflammation evoked by noxious chemical, heat and electrical stimulation. **Brain Research**, v. 1276, p. 103-111, 2009.

CARTER-SU, C.; SMIT, L. S. Signaling via JAK tyrosine kinases: growth hormone receptor as a model system. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 53, p. 61–82, 1998.

CASSY, S., et al. Increase in prolactin receptor (PRL-R) mRNA level in the mammary gland after hormonal induction of lactation in virgin ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 41-55, 2000.

CASSIDY, E. M., et al. Differing central amine receptor sensitivity in different migraine subtypes? A neuroendocrine study using buspirone. **Pain**, v. 101, n. 3, p. 283-290, 2003.

CAVALLA, F., et al. Determinants of Periodontal/Periapical Lesion Stability and Progression. **Journal of Dental Research**, v. 100, n. 1, p. 29-36, 2021.

CESARIO, T. C., et al. Enhanced yields of gamma interferon in prolactin treated human peripheral blood mononuclear cells. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 205, n. 1, p. 89-95, 1994.

CHABAN, V. V.; MICEVYCH, P. E. Estrogen receptor- α mediates estradiol attenuation of ATP-induced Ca²⁺ signaling in mouse dorsal root ganglion neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 81, n. 1, p. 31–37, 2005.

CHEN, Y., et al. The prolactin receptor long isoform regulates nociceptor sensitization and opioid-induced hyperalgesia selectively in females. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 529, p. eaay7550, 2020.

CHERNOW, B., et al. Hormonal responses to graded surgical stress. **Archives of Internal Medicine**, v. 147, n. 7, p. 1273–1278, 1987.

CHESKIS, B. J., et al. MNAR plays an important role in ER α activation of Src/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. **Steroids**, v. 73, n. 9–10, p. 901–905, 2008.

CHIU, I. M.; VON HEHN, C. A.; WOOLF, C. J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1063–1067, 2012.

CIMMINO, M. A., et al. Clinical Presentation of Osteoarthritis in General Practice: Determinants of Pain in Italian Patients in the AMICA Study. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 35, n. 1, p. 17-23, 2005.

CLAPP, C., et al. The prolactin gene is expressed in the hypothalamicneurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 22, p. 10384–10388, 1994.

CLEVENGER, C. V.; TORIGOE, T.; REED, J. C. Prolactin induces rapid phosphorylation and activation of prolactin receptor-associated RAF-1 kinase in a T-cell line. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 8, p. 5559–5565, 1994.

COOKE, N. E., et al. Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 13, p. 6502-6510, 1980.

COOKE, N. E., et al. Human prolactin cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 8, p. 4007–4016, 1981.

COSENTINO, G., et al. Age-, gender- and body site-specific reference values of thermal Quantitative Sensory Testing in the Italian population using the Q-sense device. **Neurological Sciences**, v. 44, n. 12, p. 4481-4489, 2023.

COTTI, E., et al. Endodontic infection and endothelial dysfunction are associated with different mechanisms in men and women. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 5, p. 594–600, 2015.

CROSSON, T.; et al. Profiling of how nociceptor neurons detect danger—New and old foes. **Journal of Internal Medicine**, v. 286, n. 3, p. 268–289, 2019.

CURLEWIS, J. D. Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 1992.

DAS, R.; VONDERHAAR, B. K. Transduction of prolactin's (PRL) growth signal through both long and short forms of the PRL receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 9, n. 12, p. 1750–1759, 1995a.

DAS, R.; VONDERHAAR, B. K. Involvement of SHC, GRB2, SOS and RAS in prolactin signal transduction in mammary epithelial cells. **Oncogene**, v. 13, n. 6, p. 1139–1145, 1995b.

DAS, R.; VONDERHAAR, B. K. Activation of raf-1, MEK and MAP kinase in prolactin responsive mammary cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 40, n. 2, p. 141–149, 1996.

DAY, R. N.; MAURER, R. A. The distal enhancer region of the rat prolactin gene contains elements conferring response to multiple hormones. **Molecular Endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 3-9, 1989.

DE BELLIS, A., et al. Prolactin and autoimmunity. **Pituitary**, v. 8, n. 1, p. 25-30, 2005.

DE LEEUW, R.; NEEFJES, J.; MICHALIDES, R. A role for estrogen receptor phosphorylation in the resistance to tamoxifen. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

DE SOUZA, L. C., et al. WNT gene polymorphisms and predisposition to apical periodontitis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18980, 2019

DE STEFANO, G., et al. Sex differences in trigeminal neuralgia: a focus on radiological and clinical characteristics. **Neurological Sciences**, v. 44, n. 12, p. 4465-4472, 2023.

DENG, L.; GUO, Y. Estrogen effects on orthodontic tooth movement and orthodontically induced root resorption. **Archives of Oral Biology**, v. 118, p. 1-7, 2020.

DEVITO, W. J.; CONNORS, J. M.; HEDGE, G. A. Immunoreactive prolactin in the rat hypothalamus: in vitro release and subcellular localization. **Neuroendocrinology**, v. 46, n. 2, p. 155-161, 1987.

DEVITO, W. J. Heterogeneity of immunoreactive prolactin in the rat brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 150, n. 2, p. 599-604, 1988a.

DEVITO, W. J. Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hypophysectomy and intraventricular administration of colchicine. **Neuroendocrinology**, v. 47, n. 4, p. 284-289, 1988b.

DEVITO, W. J.; STONE, S.; AVAKIAN, C. Prolactin stimulation of protein kinase C activity in the rat hypothalamus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 176, n. 2, p. 660-667, 1991.

DIMITROV, S., et al. A regulatory role of prolactin, growth hormone, and corticosteroids for human Tcell production of cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 1 n. 4, p. 368-374, 2004.

DIOGENES, A., et al. Prolactin modulates TRPV1 in female rat trigeminal sensory neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 31, p. 8126-8136, 2006.

DIOGENES, A. Trigeminal sensory neurons and pulp regeneration. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 9S, p. S71-S80, 2020.

DOGUSAN, Z., et al. Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 120, n. 1-2, p. 58-66, 2001.

DUGAN, A. L., et al. Serum levels of prolactin, growth hormone, and cortisol in burn patients: correlations with severity of burn, serum cytokine levels, and fatality. **Journal of Burn Care and Rehabilitation**, v. 25, n. 3, p. 306-313, 2004.

EMANUELE, N. V., et al. Extrahypothalamic brain prolactin: characterization and evidence for independence from pituitary prolactin. **Brain Research**, v. 421, n. 1-2, p. 255-262, 1987.

EMANUELE, N. V., et al. Presence of prolactin-like immunoreactivity and bioactivity in rat spinal cord. **Neuroendocrinology**, v. 49, n. 3, p. 331-335, 1989.

EMANUELE, N. V., et al. The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. **Molecular Endocrinology**, v. 6, n. 1, p. 35-42, 1992.

ESCRIBESE, M. M., et al. Estrogen inhibits dendritic cell maturation to RNA viruses. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4574-4584, 2008.

ESTRELA, C., et al. Diagnostic and clinical factors associated with pulpal and periapical pain. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, n. 4, 306-311, 2011.

EVERHART, J. E., et al. Prevalence and ethnic differences in gallbladder disease in the United States. **Gastroenterology**, v. 117, n. 3, p. 632-639, 1999.

FERRARIS J, et al. Prolactin receptor antagonism in mouse anterior pituitary: effects on cell turnover and prolactin receptor expression. **American Journal of Physiol Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 3, p. E356-E364, 2012.

FILARDO, E. J.; THOMAS, P. G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. **Endocrinology**, v. 153, n. 7, p. 2953-2962, 2012.

FILIPIN, M. D. V., et al. Does prolactin treatment trigger immunoenocrine alterations during experimental T. cruzi infection? **Cytokine**, v. 121, p. 154736, 2019.

FILLINGIM, R. B., et al. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 5, p. 447-485, 2009.

FINIDORI, J.; KELLY, P. A. Cytokine receptor signalling through two novel families of transducer molecules: Janus kinases and signal transducers and activators of transcription. **The Journal of Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 11-23, 1995.

FLORES-ESPINOSA, P., et al. Selective immuno-modulatory effect of prolactin upon pro-inflammatory response in human fetal membranes. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 123, p. 58-64, 2017.

FOJTÍKOVÁ, M., et al. Elevated prolactin levels in patients with rheumatoid arthritis: association with disease activity and structural damage. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 28, n. 6, p. 849-854, 2010.

FREEMAN, M. E., et al. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 4, p. 1523-1631, 2000.

FUENTES, N.; SILVEYRA P. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Advances in Protein, Chemistry and Structural Biology**, v. 116, p. 135-170, 2019.

GALLER, K. M., et al. Inflammatory response mechanisms of the dentine–pulp complex and the periapical tissues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1480, 2021.

GANGULA, P. R., et al. Regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglia of rats by female sex steroid hormones. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 1033–1039, 2000.

GEORGE, S. Z., et al. Sex and pain-related psychological variables are associated with thermal pain sensitivity for patients with chronic low back pain. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 1, p. 2-10, 2007.

GOFFIN, V.; KELLY, P. A. Prolactin and growth hormone receptors. **Clinical Endocrinology**, v. 45, n. 3, p. 247–255, 1996.

GOFFIN, V., et al. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 4, p. 385-410, 1996.

GOFFIN, V., et al. Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 840, p. 498–509, 1998.

GÖTTLICHER, M.; HECK, S.; HERRLICH, P. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. **Journal of Molecular Medicine (Berlin)**, v. 76, n. 7, p. 480–489, 1998.

GRAUNAITE, I.; LODIENE, G.; MACIULSKIENE, V. Pathogenesis of apical periodontitis: A literature review. **Journal of Oral & Maxillofacial Research**, v. 2, n. 4, p. 1–15, 2012.

GREENAN, J. R., et al. Biosynthesis of the secreted 24 K isoforms of prolactin. **Endocrinology**, v. 125, n. 4, p. 2041–2048, 1989.

GUAN, X., et al. Estrogen deficiency aggravates apical periodontitis by regulating NLRP3/caspase-1/IL-1 β axis. **American Journal of Translational Research**, v. 12, n. 2, p. 660-671, 2020.

GUERRA, M. J.; LISTE, I.; LABANDEIRA-GARCIA, J. L. Interaction between the serotonergic, dopaminergic, and glutamatergic systems in fenfluramine-induced Fos expression in striatal neurons. **Synapse**, v. 28, n. 1, p. 71–82, 1998.

HÄGGMAN-HENRIKSON, B., et al. Increasing gender differences in the prevalence and chronification of orofacial pain in the population. **Pain**, v. 161, n. 8, p. 1768-1775, 2020.

HANSEN, B. L.; HANSEN, G. N.; HAGEN, C. Immunoreactive material resembling ovine prolactin in perikarya and nerve terminals of the rat hypothalamus. **Cell and Tissue Research**, v. 226, n. 1, p. 121-131, 1982.

HARLAN, R. E., et al. Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. **Neuroendocrinology**, v. 49, n. 1, p. 7-22, 1989.

HARTMANN, D. P.; HOLADAY, J. W.; BERNTON, E. W. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. **FASEB Journal**, v. 3, n. 10, p. 2194-2202, 1989.

HASSELL, M. T. Tissues and cells of the periodontium. **Periodontology 2000**, v. 3, p. 9–38, 1993.

HELDRING, N., et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets, **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 905–931, 2007.

HNASKO, R. M.; BUNTIN, J. D. Functional mapping of neural sites mediating prolactin-induced hyperphagia in doves. **Brain Research**, v. 623, n. 2, p. 257-266, 1993.

HORSEMAN, N. D.; YU-LEE, L. Y. Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 5, p. 627–649, 1994.

HOVHANNISYAN, A. H., et al. Pituitary hormones are specifically expressed in trigeminal sensory neurons and contribute to pain responses in the trigeminal system. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 17813, 2021.

HU, Z. Z.; DUFAU, M. L. Multiple and differential regulation of ovarian prolactin receptor messenger RNAs and their expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 181, n. 1, p. 219–225, 1991.

HU, Z. Z., et al. Transcriptional regulation of the generic promoter III of the rat prolactin receptor gene by C/EBPbeta and Sp1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 26225–26235, 1998.

HUNG, P. S-P., et al. Sex differences in patient journeys to diagnosis, referral, and surgical treatment of trigeminal neuralgia: implications for equitable care. **Journal of Neurosurgery**, v. 30, p. 1-9, 2022.

IHLE, J. N., et al. Signalling by the cytokine receptor superfamily: Jaks and Stats. **Trends in Biochemical Science**, v. 19, n. 5, p. 222–227, 1994.

JABBOUR, H. N.; KELLY, P. A. Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 14-18, 1997.

JABBOUR, H. N.; CRITCHLEY, H. O.; BODDY, S. C. Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 7, p. 2545–2553, 1998.

JANSEN, R., et al. Sex differences in the human peripheral blood transcriptome. **BMC Genomics**, v. 15, p. 33, 2014.

JARVIS, W. D.; JUDD, A. M.; MACLEOD, R. M. Attenuation of anterior pituitary phosphoinositide phosphorylase activity by the D2 dopamine receptor. **Endocrinology**, v. 123, n. 6, p. 2793-2799, 1988.

KABATA, H.; ARTIS, D. Neuro-immune crosstalk and allergic inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 4, p. 1475–1482, 2019.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 20, n. 3, p. 340–349, 1965.

KOSSIAKOFF, A. A. The structural basis for biological signaling, regulation, and specificity in the growth hormone-prolactin system of hormones and receptors. **Advances in Protein Chemistry**, v. 68, p. 147-69, 2004.

KELLY, P. A., et al. The prolactin/growth hormone receptor family. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 3, 235–251, 1991.

KELLY, P. A., et al. Implications of multiple phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 22, n. 2, p. 140-145, 2001.

KHAN, A. A., et al. Measurement of mechanical allodynia and local anesthetic efficacy in patients with irreversible pulpitis and acute periradicular periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 7, p. 796–799, 2007.

KHAN, D.; AHMED S. A. The immune system is a natural target for estrogen action: opposing effects of estrogen in two prototypical autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1-8, 2016.

KILGORE, C. B., et al. Sex-specific pain outcomes following microvascular decompression for trigeminal neuralgia. **World Neurosurgery**, v. 173, p. e431-e435, 2023.

KIM, I. J., et al. Prevalence of knee pain and its influence on quality of life and physical function in the korean elderly population: a community based cross-sectional study. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, n. 9, p. 1140-1146, 2011.

KIM, S., et al. Assessment of pain and anxiety following surgical placement of dental implants. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 28, n. 2, p. 531-535, 2013.

KINDLER, L. L., et al. Sex differences in experimental and clinical pain sensitivity for patients with shoulder pain. **European Journal of Pain**, v. 15, n. 2, p. 118-123, 2011.

KINOSHITA, H., et al. Expression of ovarian prolactin receptor in relation to hormonal changes during induction of ovulation in the rat. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 52, n. 2, p. 132-138, 2001.

KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 626-638, 2016.

KLINGE, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 14, p. 2905–2919, 2001.

KUMAR, A.; SINGH, S. M.; SODHI, A. Effect of prolactin on nitric oxide and interleukin-1 production of murine peritoneal macrophages: role of Ca²⁺ and protein kinase C. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 129-133, 1997.

LAHAT, N., et al. Differential effects of prolactin upon activation and differentiation of human B lymphocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 47, n. 1, p. 35-40, 1993.

LE DILY, F.; BEATO, M. Signaling by steroid hormones in the 3D nuclear space. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p 1-16, 2018.

LEDESMA-COLUNGA, M. G., et al. Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 19, n. 1, p. 93, 2017.

LEE, Y-H., et al. Sex-related differences in symptoms of temporomandibular disorders and structural changes in the lateral pterygoid muscle after whiplash injury. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 46, n. 12, p. 1107-1120, 2019.

LEGORRETA-HAQUET, M. V., et al. Prolactin down-regulates CD4+ CD25hiCD127low/- regulatory T cell function in humans. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 48, n. 1, p. 77–85, 2012.

LENERT, M. E., et al. Sensory neurons, neuroimmunity, and pain modulation by sex hormones. **Endocrinology**, v. 162, n. 8, p. 1-17, 2021.

LEONDIRES, M. P., et al. Estradiol stimulates expression of two human prolactin receptor isoforms with alternative exons-1 in T47D breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 82, n. 2-3, p. 263-268, 2002.

LEUNG, K-C., et al. Estrogen regulation of growth hormone action. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 693-721, 2004.

LESUEUR, L., et al. Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 3, p. 824–828, 1991.

LIANG, J.; SHANG, Y. Estrogen and cancer. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 225–240, 2013.

LI, L.; HAYNES, M. P.; BENDER, J. R. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 8, p. 4807–4812, 2003.

LI, Y., et al. Estrogen stimulation of cell migration involves multiple signaling pathway interactions. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5146–5156, 2010.

LILLIS, K.; GRINCEVICIUTE, R.; DIOGENES, A. Sex-specific nociceptor modulation of the apical periodontitis transcriptome. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 11, p. 1338511, 2024.

LIVERMAN, C. S., et al. Oestrogen increases nociception through ERK activation in the trigeminal ganglion: evidence for a peripheral mechanism of allodynia. **Cephalalgia**, v. 29, n. 5, p. 520–531, 2009.

LLEDO, P. M., et al. Effects of dopamine on voltage-dependent potassium currents in identified rat lactotroph cells. **Neuroendocrinology**, v. 52, n. 6, p. 545-555, 1990.

LONARD, D. M.; O'MALLEY, B. W. The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. **Cell**, v. 125, n. 3, p. 411-414, 2006.

LONARD, D. M.; O'MALLEY, B. W. Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. **Molecular Cell**, v. 27, n. 5, p. 691-700, 2007.

LOPES, D. M., et al. Sex differences in peripheral not central immune responses to pain-inducing injury. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-8, 2017.

LUNDY, F. T.; LINDEN, G. J. Neuropeptides and neurogenic mechanisms in oral and periodontal inflammation. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 2, p. 82-98, 2004.

LUTHMAN, J., et al. Immunohistochemical study of neurochemical markers in gingiva obtained from periodontitis - affected sites. **Journal of Periodontal Research**, v. 24, n. 4, p. 267-278, 1989.

MAJUMDER, B.; BISWAS, R.; CHATTOPADHYAY, U. Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12. **International Journal of Cancer**, v. 97, n. 4, p. 493-500, 2002.

MALAGUARNERA, L., et al. Prolactin induces chitotriosidase gene expression in human monocyte-derived macrophages. **Immunology Letters**, v. 94, n. 1-2, p. 57-63, 2004.

MALKAWI, Z.; AL-OMIRI, M. K.; KHRAISAT, A. Risk indicators of postoperative complications following surgical extraction of lower third molars. **Medical Principles and Practice**, v. 20, n. 4, p. 321-325, 2011.

MALVEN, P. V.; KEENAN, T. W. Immunoreactive prolactin in subcellular fractions from bovine mammary tissue. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 6, p. 1237-1242, 1983.

MANCINI, T.; CASANUEVA, F. F.; GIUSTINA, A. Hyperprolactinemia and prolactinomas. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 37, n. 1, p. 67-99, 2008.

MARINO, M.; GALLUZZO, P.; ASCENZI, P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. **Current Genomics**, v. 7, n. 8, p. 497–508, 2006.

MARSALA, S. Z., et al. Spontaneous pain, pain threshold, and pain tolerance in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 258, n. 4, p. 627-633, 2011.

MATALKA, K. Z. Prolactin enhances production of interferon- γ , interleukin-12, and interleukin-10, but not of tumor necrosis factor- α , in a stimulus-specific manner. **Cytokine**, v. 21, n. 4, p. 187–194, 2003.

MATEO, L., et al. High serum prolactin levels in men with rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 25, n. 11, p. 2077-2082, 1998.

MATERA, L., et al. Up-modulation of interferon- γ mediates the enhancement of spontaneous cytotoxicity in prolactin-activated natural killer cells. **Immunology**, v. 98, n. 3, p. 386–392, 1999.

MATIJEVIĆ, M., et al. The influence of surgical experience, type of instructions given to patients and patient sex on postoperative pain intensity following lower wisdom tooth surgery. **Acta Clinica Croatica**, v. 52, n. 1, p. 23-28, 2013.

MATSUDA, M.; MORI, T. Effect of hormones on expression of prolactin receptor messenger ribonucleic acids in pancreatic islets of adult female mice in vitro. **Zoological Science**, v. 14, n. 1, p. 159-165, 1997.

MAURER, R. A. Dopaminergic inhibition of prolactin synthesis and prolactin messenger RNA accumulation in cultured pituitary cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 17, p. 8092-8097, 1980.

MAURER, R. A. Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 5, p. 2133-2136, 1982.

MAURER, A. J., et al. Pain and sex hormones: a review of current understanding. **Pain Management**, v. 6, n. 3, p. 285-296, 2016.

MAYER, E. A., et al. Sex-based differences in gastrointestinal pain. **European Journal of Pain**, v. 8, n. 5, p. 451-463, 2004.

MCMURRAY, R., et al. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 11, p. 3780-3787, 1991.

MEINTS, S. M.; WANG, V.; EDWARDS, R. R. Sex and race differences in pain sensitization among patients with chronic low back pain. **The Journal of Pain**, v. 19, n. 12, p. 1461-1470, 2018.

MENEZES, R., et al. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 8, p. 932-938, 2008.

MENON, N.; KISHEN, A. Nociceptor–macrophage interactions in apical periodontitis: how biomolecules link inflammation with pain. **Biomolecules**, v. 13, n. 8, p. 1193, 2023.

MICLESCU, A. A., et al. Sex-related differences in experimental pain sensitivity in subjects with painful or painless neuropathy after surgical repair of traumatic nerve injuries. **Pain Reports**, v. 7, n. 6, p. e1033, 2022.

MLADENOVIC, I., et al. Pulp sensitivity: influence of sex, psychosocial variables, COMT gene, and chronic facial pain. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 5, p. 717-721, 2018.

MOR, G., et al. Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 114–122, 2003.

NAGY, E.; BERCZI, I. Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. **Endocrinology**, v. 128, n. 6, p. 2776-2784, 1991.

NAIR, P. N. R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 6, p. 348–381, 2004.

NANCI, A., BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 11–28, 2006.

NEMETH, E.; BOLE-FEYSOT, C.; TASHIMA, L. S. Suppression subtractive hybridization (SSH) identifies prolactin stimulation of p38 MAP kinase gene expression

in Nb2 T lymphoma cells: molecular cloning of rat p38 MAP kinase. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 1, p. 151–156, 1998.

NISHIZUKA, M., et al. Ultrastructural characterization of prolactin-like immunoreactivity in rat medial basal hypothalamus. **Neuroendocrinology**, v. 51, n. 3, p. 249-254, 1990.

NOEL, G. L., et al. Human prolactin and growth hormone release during surgery and other conditions of stress. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 35, n. 6, p. 840-51, 1972.

NOHARA, A., et al. Prolactin stimulates mitogen-activated protein kinase in human leiomyoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 238, n. 2, p. 473–477, 1997.

NOLIN, J. M.; WITORSCH, R. J. Detection of endogenous immunoreactive prolactin in rat mammary epithelial cells during lactation. **Endocrinology**, v. 99, n. 4, p. 949-958, 1976.

NORENG, M. F.; JENSEN, P.; TJELLDEN, N. U. Per- and postoperative changes in the concentration of serum thyrotropin under general anaesthesia, compared to general anaesthesia with epidural analgesia. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 31, n. 4, p. 292–294, 1987.

NORFLEET, A. M., et al. Antibodies to the estrogen receptor-alpha modulate rapid prolactin release from rat pituitary tumor cells through plasma membrane estrogen receptors. **FASEB Journal**, v. 14, n. 1, p. 157-165, 2000.

O'LONE, R., et al. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 8, p. 1859–1875, 2004.

O'MALLEY, B. W. A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 6, p. 1402–1411, 2005.

O'NEAL, K. D., et al. Prolactin gene expression in human thymocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 87, n. 1-3, p. R19-23, 1992.

OLMOS-ORTIZ, A., et al. Prolactin decreases LPS-induced inflammatory cytokines by inhibiting TLR-4/NF κ B signaling in the human placenta. **Molecular Human Reproduction**, v. 25, n. 10, p. 660–667, 2019.

ORBACH, H., et al. Novel biomarkers in autoimmune diseases: prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1109, p. 385-400, 2007.

OWERBACH, D., et al. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. **Science**, v. 212, n. 4496, p. 815–816, 1981.

PAIGE, C., et al. Neuroendocrine mechanisms governing sex differences in hyperalgesic priming involve prolactin receptor sensory neuron signaling. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 37, p. 7080-7090, 2020.

PATERNI, I., et al. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. **Steroids**, v. 90, p. 13-29, 2014.

PATIL, M. J., et al. Prolactin regulates TRPV1, TRPA1, and TRPM8 in sensory neurons in a sex-dependent manner: contribution of prolactin receptor to inflammatory pain. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 9, p. E1154-E1164, 2013a.

PATIL, M. J., et al. Sex-dependent roles of prolactin and prolactin receptor in postoperative pain and hyperalgesia in mice. **Neuroscience**, v. 253, p. 132-141, 2013b.

PATIL, M. J.; HENRY, M. A.; AKOPIAN, A. N. Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. **Channels (Austin)**, v. 8, n. 3, p. 193-202, 2014.

PATIL, M. J., et al. Prolactin regulates pain responses via a female-selective nociceptor-specific mechanism. **iScience**, v. 20, p. 449-465, 2019a.

PATIL, M. J., et al. Prolactin receptor expression in mouse dorsal root ganglia neuronal subtypes is sex-dependent. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 31, n. 8, p. e12759, 2019b.

PAUS, R. Does prolactin play a role in skin biology and pathology? **Medical Hypotheses**, v. 36, n. 1, p. 33-42, 1991.

PAUT-PAGANO, L., et al. Anatomical distribution of prolactin-like immunoreactivity in the rat brain. **Neuroendocrinology**, v. 58, n. 6, p. 682-695, 1993.

PEEVA, E., et al. Prolactin modulates the naive B cell repertoire. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 275-283, 2003.

PEEVA, E., & ZOUALI, M. Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. **Immunology Letters**, v. 101, n. 2, p. 123-143, 2005.

PERROT, S., et al. Correlates of pain intensity in men and women with hip and knee osteoarthritis. Results of a national survey: The French ARTHRIX study. **The Clinical Journal of Pain**, v. 25, n. 9, p. 767-772, 2009.

PETTY, L. E., et al. Genome-wide association study identifies novel risk loci for apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 49, n. 10, p. 1276-1288, 2023.

PI, X., et al. Promoter usage and estrogen regulation of prolactin receptor gene in the brain of the female rat. **Neuroendocrinology**, v. 77, n. 3, p. 187-197, 2003.

PICCOLETTI, R., et al. Rapid stimulation of mitogen-activated protein kinase of rat liver by prolactin. **Biochemical Journal**, v. 303, p. 429-433, 1994.

PIRAS, V., et al. Prevalence of apical periodontitis in patients with inflammatory bowel diseases: a retrospective clinical study. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 3, p. 389-394, 2017.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 12, p. 715-726, 2011.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 389, n. 1-2, p. 71-83, 2014.

POLYCARPOU, N., et al. Prevalence of persistent pain after endodontic treatment and factors affecting its occurrence in cases with complete radiographic healing. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 3, p. 169-178, 2005.

RAJA, S. N., et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976-1982, 2020.

RASMUSSEN, B. K., et al. Epidemiology of headache in a general population--a prevalence study. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 44, n. 11, p. 1147-1157, 1991.

RAY, P. R., et al. Transcriptome analysis of the human tibial nerve identifies sexually dimorphic expression of genes involved in pain, inflammation, and neuro-immunity. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 1-15, 2019.

RAZANDI, M., et al. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 12, p. 2854–2865, 2004.

RICHARDS, S. M., et al. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. **Cellular Immunology**, v. 184, n. 2, p. 85–91, 1998.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA JR, J. F. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 8, p. 1277–1288, 2010.

RIDDLE, O.; BATES, R. W.; DYKSHORN, S. W. The preparation, identification and assay of prolactin—a hormone of anterior pituitary. **American Journal of Physiology**, v. 105, n. 1, p. 191-216, 1933.

ROBERTSON, M. T., et al. Modulation of the chloride concentration of human sweat by prolactin. **Endocrinology**, v. 119, n. 6, p. 2439-2444, 1986.

ROBERTSON, M. C., et al. Molecular cloning and expression of rat placental lactogen-I complementary deoxyribonucleic acid. **Endocrinology**, v. 127, n. 2, p. 702-710, 1990.

ROBERTSON, M. C.; SCHROEDTER, I. C.; FRIESEN, H. G. Molecular cloning and expression of rat placental lactogen-Iv, a variant of rPL-I present in late pregnant rat placenta. **Endocrinology**, v. 129, n. 5, p. 2746-2756, 1991.

ROBINSON, J. L., et al. Estrogen signaling impacts temporomandibular joint and periodontal disease pathology. **Odontology**, v. 108, n. 2, p. 153-165, 2020.

ROLKE, R., et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. **Pain**, v. 123, n. 3, p. 231-243, 2006.

ROMUALDO, P. C., et al. Ovariectomy exacerbates apical periodontitis in rats with an increase in expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 5, p. 780-785, 2018.

ROSSETTI, B. R., et al. Effects of estrogen deficiency on the progression of apical periodontitis. A systematic review of preclinical studies. **Archives of Oral Biology**, v. 142, p. 1-10, 2022.

ROWAN, M. P., et al. Activation of estrogen receptor α enhances bradykinin signaling in peripheral sensory neurons of female rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 349, n. 3, p. 526-532, 2014.

RUSMAN, T.; VOLLENHOVEN, R. F.; HORST-BRUIINSMA, E. Gender differences in axial spondyloarthritis: women are not so lucky. **Current Rheumatology Reports**, v. 20, n. 6, p. 1-12, 2018.

RWIN, R. A., et al. Prolactin activates Ras via signaling proteins SHC, growth factor receptor bound 2, and son of sevenless. **Endocrinology**, v. 136, n. 8, p. 3512–3518, 1995.

SABHARWAL, P., et al. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7713-7716, 1992.

SAHA, S., et al. Prolactin alters the mechanisms of B cell tolerance induction. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 6, p. 1743-1752, 2009.

SAKAGUCHI, K., et al. Differential regulation of prolactin receptor mRNA expression in rat liver and kidney by testosterone and oestradiol. **The Journal of Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 383-392, 1994.

SAKALLIOĞLU, E. E., et al. Local peptidergic innervation of gingiva in smoking and non-smoking periodontitis patients. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1451–1456, 2008.

SAKELLARIS, G., et al. Effects of ropivacaine infiltration on cortisol and prolactin responses to postoperative pain after inguinal hernioraphy in children. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 39, n. 9, p. 1400-1403, 2004.

SANNAJUST, S., et al. Females have greater susceptibility to develop ongoing pain and central sensitization in a rat model of temporomandibular joint pain. **Pain**, v. 160, n. 9, p. 2036-2049, 2019.

SARLANI, E., et al. Gender and laterality differences in thermosensation throughout the perceptible range. **Pain**, v. 106, n. 1-2; p. 9-18, 2003.

SARLANI, E., et al. Sex differences in temporal summation of pain and aftersensations following repetitive noxious mechanical stimulation. **Pain**, v. 109, n. 1-2, p. 115-123, 2004.

SARLANI, E., et al. Temporal summation of pain characterizes women but not men with temporomandibular disorders. **Journal of Orofacial Pain**, v. 21, n. 4, p. 309-317, 2007.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCOTLAND, P. E., et al. Endogenous prolactin generated during peripheral inflammation contributes to thermal hyperalgesia. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 5, p. 745-754, 2011.

SEILLET, C., et al. The TLR-mediated response of plasmacytoid dendritic cells is positively regulated by estradiol in vivo through cell-intrinsic estrogen receptor alpha signaling. **Blood**, v. 119, n. 2, p. 454–464, 2012.

SELLIX, M. T.; FREEMAN, M. E. Circadian rhythms of neuroendocrine dopaminergic neuronal activity in ovariectomized rats. **Neuroendocrinology**, v. 77, n. 1, p. 59-70, 2003.

SERIWATANACHAI, D., et al. Prolactin directly enhances bone turnover by raising osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoprotegerin ratio. **Bone**, v. 42, n. 3, p. 535–546, 2008.

SERIWATANACHAI, D.; KRISHNAMRA, N.; VAN LEEUWEN, J. P. Evidence for direct effects of prolactin on human osteoblasts: inhibition of cell growth and mineralization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 677–685, 2009.

SHOME, B.; PARLOW, A. F. Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 45, n. 5, p. 1112–1115, 1977.

SIAUD, P., et al. The organization of prolactin-like-immunoreactive neurons in the rat central nervous system. Light- and electron-microscopic immunocytochemical studies. **Cell and Tissue Research**, v. 255, n. 1, p. 107-115, 1989.

SINHA, Y. N., et al. Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 60, n. 2, p. 239–243, 1985.

SINHA, Y. N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 3, p. 354–369, 1995.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. **Brazilian Dental Journal**, v. 18, n. 4, p. 267-280, 2007.

SODHI, A.; TRIPATHI, A. Prolactin and growth hormone induce differential cytokine and chemokine profile in murine peritoneal macrophages in vitro: involvement of p-38 MAP kinase, STAT3 and NF- κ B. **Cytokine**, v. 41, n. 2, p. 162–173, 2008.

SOMERS, W., et al. The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 478-481. 1994.

SONG, R. X.; ZHANG, Z.; SANTEN, R. J. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ER α and Src. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 1, n. 8, p. 347–353, 2005.

SONG, R. X., et al. Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor I receptor, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 148, n. 8, p. 4091–4101, 2007.

SONG, R. X., et al. Estrogen utilization of IGF-1-R and EGF-R to signal in breast cancer cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, n 4–5, p. 219–230, 2010.

SORGE, R. E., et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 1081-1083, 2015.

STASHENKO, P.; YU, S. M.; WANG, C. Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 9, p. 422-426, 1992.

STRAUB, R. H., et al. In polymyalgia rheumatica serum prolactin is positively correlated with the number of typical symptoms but not with typical inflammatory markers. **Rheumatology (Oxford)**, v. 41, n. 4, p. 423-429, 2002.

STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 5, p. 521–574, 2007.

SUN, R., et al. Expression of prolactin receptor and response to prolactin stimulation of human NK cell lines. **Cell Research**, v. 14, n. 1, p. 67–73, 2004.

SWAMINATHAN, G., et al. Prolactin stimulates ubiquitination, initial internalization, and degradation of its receptor via catalytic activation of Janus kinase 2. **The Journal of Endocrinology**, v. 196, n. 2, p. R1-R7, 2008.

SWENNEN, L.; DENEFF, C. Physiological concentrations of dopamine decrease adenosine 3',5'-monophosphate levels in cultured rat anterior pituitary cells and enriched populations of lactotrophs: evidence for a causal relationship to inhibition of prolactin release. **Endocrinology**, v. 111, n. 2, p. 398-405, 1982.

SZAWKA, R. E.; ANSELMO-FRANCI, J. A. A secondary surge of prolactin on the estrus afternoon. **Life Sciences**, v. 75, n. 8, p. 911-922, 2004.

SZYPER-KRAVITZ, M., et al. The neuroendocrine-immune interactions in systemic lupus erythematosus: a basis for understanding disease pathogenesis and complexity. **Rheumatic Diseases Clinic of North America**, v. 31, n. 1, p. 161-175, 2005.

TAKAHASHI, H., et al. Prolactin inhibits osteoclastic activity in the goldfish scale: A novel direct action of prolactin in teleosts. **Zoological Science**, v. 25, n. 7, p. 739–745, 2008.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Current Protocols in Immunology**, 2007.

THOMPSON, S. A. Localization of immunoreactive prolactin in ependyma and circumventricular organs of rat brain. **Cell and Tissue Research**, v. 225, n. 1, p. 79-93, 1982.

TIBÚRCIO-MACHADO, C. S., et al. The global prevalence of apical periodontitis: A systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 5, p. 712–735, 2021.

TOMIO, A., et al. Prolactin can modulate CD4+ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. **Immunology and Cell Biology**, v. 86, n. 7, p. 616-621, 2008.

TORNER, L., et al. 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. **Endocrinology**, v. 136, n. 12, p. 5454–5460, 1995.

TREBEC-REYNOLDS DP, et al. IL-1alpha and IL-1beta have different effects on formation and activity of large osteoclasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.109, n. 5, p. 975-982, 2010.

TREEDE, R-D., et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). **Pain**, v. 160, n. 1, p. 19-27, 2019.

TRUONG, A. T., et al. Isolation and characterization of the human prolactina gene. **The EMBO Journal**, v. 3, n. 2, p. 429–437, 1984.

TSENG, Y-H.; KESSLER, M. A.; SCHULER, L. A. Regulation of interleukin (IL)-1a, IL-1b, and IL-6 expression by growth hormone and prolactin in bovine thymic stromal cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 128, n. 1-2, p. 117-127, 1997.

TSENG, L.; ZHU, H. H. Progestin, estrogen, and insulin-like growth factor-I stimulate the prolactin receptor mRNA in human endometrial stromal cells. **Journal of the Society for Gynecology Investigation**, v. 5, n. 3, p. 149-155, 1998.

VALERIO, M. S., et al. 2017. Sex-based differential regulation of bacterial-induced bone resorption. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, n. 3, p. 377–387, 2017.

VERA-LASTRA, O.; JARA, L. J.; ESPINOZA, L. R. Prolactin and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 1, n. 6, p. 360-364, 2002.

VISELLI, S. M., et al. Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 129, n. 2, p. 983-990, 1991.

VOGEL, K., et al. Sex differences in pain and quantitative sensory testing in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Care & Research**, v. 75, n. 12, p. 2472-2480, 2023.

WANG, Y-F.; WALKER, A. M. Dephosphorylation of standard prolactina produces a more biologically active molecule: evidence for antagonism between nonphosphorylated and phosphorylated prolactina in the stimulation of Nb2 cell proliferation. **Endocrinology**, v. 133, n. 5, p. 2156–2160, 1993.

WANG, Z.; MCCAULEY, L. K. Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. **Oral Diseases**, v. 17, n. 2, p. 129-142, 2011.

WATAD. A., et al. Prolactin: another important player in the mosaic of autoimmunity. **Israel Medical Association Journal**, v. 18, n. 9, p. 542-543, 2016.

WATSON, C. S., et al. Rapid actions of estrogens in GH3/B6 pituitary tumor cells via a plasma membrane version of estrogen receptor-alpha. **Steroids**, v. 64, n. 1-2, p. 5-13, 1999.

WELLS, J. A.; DEVOS, A. M. Hematopoietic receptor complexes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 609–634, 1996

WILSON, D. M., et al. Prolactin message in brain and pituitary of adult male rats is identical: PCR cloning and sequencing of hypothalamic prolactin cDNA from intact and hypophysectomized adult male rats. **Endocrinology**, v. 131, n. 5, 2488–2490, 1992.

WOLFE, F., et al. Fibromyalgia diagnosis and biased assessment: Sex, prevalence and bias. **PLoS One**, v. 13, n. 9, p. e0203755, 2018.

WONGDEE, K.; et al. Prolactin alters the mRNA expression of osteoblast-derived osteoclastogenic factors in osteoblast-like UMR106 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 349, n. 1-2, p. 195–204, 2011.

WU, H.; DEVI, R.; MALARKEY, W. B. Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 349-353, 1996.

WU, W., et al. Prolactin mediates psychological stress-induced dysfunction of regulatory T cells to facilitate intestinal inflammation. **Gut**, v. 63, n. 12, p. 1883–1892, 2014.

XU, S., et al. 17beta-estradiol activates estrogen receptor β -signalling and inhibits transient receptor potential vanilloid receptor 1 activation by capsaicin in adult rat nociceptor neurons. **Endocrinology**, v. 149, n. 11, p. 5540–5548, 2008.

YAMAMOTO, I.; WAKITA, M.; TANAKA, M. Tissue distribution of prolactin receptor mRNA during late stage embryogenesis of the chick. **Poultry Science**, v. 82, n. 1, p. 155-157, 2003.

YARDENI, I. Z., et al. Comparison of postoperative pain management techniques on endocrine response to surgery: a randomised controlled trial. **International Journal of Surgery**, v. 5, n. 4, p. 239–243, 2007.

YIP, S. H., et al. Prolactin signalling in the mouse hypothalamus is primarily mediated by signal transducerz and activator of transcription factor 5b but not 5a. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 12, p. 1484–1491, 2012.

ZAGA-CLAVELLINA, V., et al. The potential role of prolactin as a modulator of the secretion of proinflammatory mediators in chorioamniotic membranes in term human

gestation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 211, n. 1, p. 48.e1-e6, 2014.