



## **Cellule umane e tessuti negli studi preclinici: cellule staminali pluripotenti indotte**

Angelika Lampert, *Institute of Physiology, Uniklinik RWTH Aachen University, Germany*

David L. Bennett, *Rehabilitation Research Center, Veterans Administration Connecticut Healthcare System, West Haven, Connecticut, USA*

Nurcan Üçeyler, *Department of Neurology, University of Würzburg, Germany*

and Sulayman D. Dib-Hajj, *Department of Neurology and Center for Neuroscience and Regeneration Research, Yale University, New Haven, Connecticut*

*Il dolore è adattivo, perché ci avverte di un danno imminente, ma il dolore cronico è disadattivo e costituisce una necessità medica globale non sufficientemente trattata.*

I nocicettori sono quei neuroni sensoriali specializzati nella rilevazione di stimoli nocivi (quegli stimoli che possono causare lesioni tissutali). Normalmente presentano una soglia alta di attivazione, ma le lesioni nervose, l'infiammazione dei tessuti o le malattie genetiche causano la sensibilizzazione di questi nocicettori che possono portare a dolore cronico. Comprendere le basi molecolari dell'eccitabilità di questi neuroni e il modo in cui rispondono a malattie o lesioni è fondamentale per lo sviluppo di farmaci nuovi e più efficaci per il trattamento del dolore. I test preclinici delle terapie sperimentali sui loro bersagli affini nel tessuto nervoso umano sono ugualmente importanti poiché possono esistere delle differenze specie-specifiche nelle proprietà di questi target.

### **Attuali approcci sperimentali per lo studio del dolore**

Lo sviluppo di nuovi trattamenti efficaci per il dolore è stato ostacolato da molteplici fattori, che devono essere affrontati per colmare il divario tra la conoscenza preclinica di base e la sua traduzione nella clinica. Gli studi sugli animali sono stati preziosi per chiarire il ruolo di molecole e circuiti specifici nella trasduzione e trasmissione di stimoli nocicettivi e per studi farmacologici preclinici in vivo [27], ma i test paradigmatici di rilevazione del dolore sono riconosciuti come un impedimento per il successo dello sviluppo di un farmaco clinicamente utile [36]. Sono stati sviluppati nuovi paradigmi per testare negli animali il comportamento relativo al dolore al fine di ottenere risultati più rilevanti dal punto di vista traslazionale [31; 40]. Un altro ostacolo sono le differenze specie-specifiche a livello molecolare e funzionale di diversi bersagli di nuovi farmaci sperimentali [5; 11-13; 16; 29; 33; 41]. Pertanto, la sperimentazione di farmaci sperimentali in modelli cellulari umani è un "ponte" verso il trasferimento nella pratica clinica [28].

### **Neuroni sensoriali derivati da cellule staminali pluripotenti indotte**

L'uso di cellule umane, inclusi i neuroni dei DRG (gangli delle radici dorsali), negli studi preclinici su farmaci sperimentali ha il vantaggio di valutare il coinvolgimento del bersaglio e l'efficacia dei farmaci nel background cellulare nativo. Sebbene vi sia un crescente interesse nell'adottare l'utilizzo di neuroni DRG umani nei test cellulari, è ancora difficile ottenere neuroni DRG nativi su larga scala per un uso diffuso negli studi preclinici [28] e poiché questi sono post mitotici non sono suscettibili di ingegneria genetica, o espansione del genoma, su larga scala. Lo sviluppo di un approccio per differenziare i neuroni sensoriali da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC-SN) [2] ha fornito una piattaforma tecnologica per la comprensione della fisiopatologia della malattia, inclusi i meccanismi del danno neuronale e dell'ipereccitabilità, lo sviluppo di analisi su base cellulare per lo screening e la convalida di nuovi farmaci, prima di intraprendere costose sperimentazioni cliniche, e per l'identificazione e la convalida di biomarcatori, o per le iPSC-SN perché fungano da biomarcatori di malattia di per sé [22; 32].

### **iPSC-SN per studiare i meccanismi della malattia**

Le iPSC conservano il background genetico e il meccanismo trascrizionale nativo degli individui [14; 30; 39], consentendo così studi meccanicistici di malattie che non sono soggetti a potenziali artefatti che potrebbero derivare da sistemi di sovraespressione o da studi su animali transgenici. L'iPSC-SN specifico per il paziente fornisce un modello di dolore cosiddetto "*disease-in-a-dish*", i cui migliori esempi provengono dagli studi sulle sindromi dolorose correlate ai canali Nav1.7 nell'eritromelalgia ereditaria (IEM) e sull'insensibilità congenita al dolore (CIP) [1; 19; 21; 23; 38]. Alcuni studi hanno dimostrato che gli iPSC-SN specifici del paziente che trasportano mutazioni del guadagno di funzione nel canale Nav1.7 sono più eccitabili rispetto a quelle dei soggetti di controllo [1; 21; 23], risultato coerente con l'aumento del dolore sperimentato dai portatori di queste mutazioni. Al contrario, gli iPSC-SN di pazienti con CIP correlata a Nav1.7 hanno mostrato un'eccitabilità inferiore rispetto a quella delle linee di controllo. È importante sottolineare che l'eccitabilità è stata normalizzata quando una delle mutazioni è stata corretta utilizzando l'editing genomico CRISPR-Cas9 [19]. Altri esempi di iPSC-SN paziente-specifici utilizzati per studiare i meccanismi del dolore includono l'emicrania [26] e una serie di diversi tipi di neuropatia, come la neuropatia delle piccole fibre (NPF) e la malattia di Fabry [15].

La NPF è frequentemente associata all'esordio, nell'età adulta, di una riduzione del numero di fibre nervose intraepidermiche nella pelle e ai sintomi clinici di dolore cronico di natura bruciante. È stata collegata a varianti nei canali del sodio voltaggio-dipendenti [9] e gli iPSC-SN sono un modello utile per studiare gli effetti di queste varianti sull'eccitabilità neuronale [25] e studiare, potenzialmente, il legame tra la funzione cellulare e la perdita anatomica delle fibre nervose. La neuropatia sensoriale ereditaria di tipo-1 (HSN-1) è una neuropatia dolorosa che colpisce in particolare le piccole fibre ed è dovuta a mutazioni eterozigote nel gene SPTLC1. Ciò porta a un alterato metabolismo degli sfingolipidi e alla produzione di desossisfingobasi tossiche (DSB). DSB elevate sono rilevabili negli iPSCd-SN umani da pazienti con HSN1 insieme a una ridotta produzione di gangliosidi complessi, degenerazione degli assoni e ipereccitabilità. Questi sono stati quindi utilizzati per testare la terapia modificante la malattia e l'aggiunta di serina, che riduce la produzione di DSB, potrebbe prevenire molti di questi cambiamenti [3].

### **iPSC-SN per la medicina personalizzata**

Lo sviluppo di iPSC-SN paziente-specifici offre l'opportunità di testare la risposta di questi neuroni a trattamenti farmacologici particolari. L'attenuazione dell'eccitabilità degli iPSC-SN del paziente in risposta al test con un farmaco specifico suggerirebbe il coinvolgimento

del bersaglio in vivo e l'aspettativa che un paziente possa trarre beneficio da tale trattamento, mentre una scarsa risposta dei neuroni in vitro suggerirebbe che il trattamento del paziente con questo farmaco potrebbe non essere efficace. Questa è l'essenza della medicina personalizzata che riduce la necessità di un approccio al trattamento per tentativi ed errori. C'è un piccolo numero di casi che utilizzano iPSC-SN specifici per il paziente in cui i principi di questo approccio di medicina personalizzata sembrano essere stati soddisfatti [1; 25]. Sebbene questo approccio possa essere utile in piccoli studi clinici, la generazione e la manutenzione degli iPSC-SN è laboriosa e costosa e quindi deve essere ampliata e automatizzata al meglio prima che questi possano essere utili per un'applicazione diffusa in clinica.

### **iPSC-SN: substrato genetico per identificare nuovi bersagli per lo sviluppo di farmaci**

Fatta eccezione per i casi di CIP, la risposta al dolore a uno stimolo nocivo è universale, tuttavia l'esperienza a livello individuale è variabile. Questa variabilità interindividuale in risposta allo stesso stimolo è correlata a fattori genetici ed epigenetici [4; 6; 17; 24; 42].

I parallelismi tra dolore e ipereccitabilità degli iPSC-SN specifici per il paziente potrebbero fornire l'opportunità di scoprire i geni modificatori che contribuiscono all'esperienza del dolore individuale. Studi recenti hanno sfruttato la disponibilità di membri ben fenotipizzati della stessa famiglia con disturbo doloroso da eritromelalgia ereditaria dovuto alle stesse mutazioni S241T o F1449V del guadagno di funzione Nav1.7, che manifestano differenze distinte nelle caratteristiche salienti del dolore [10; 20; 38] per stabilire e validare il modello "*pain-resilience-in-a-dish*", che sta iniziando a identificare i geni modificatori che conferiscono differenze interindividuali nell'eccitabilità neuronale, che in questi soggetti possono contribuire alle differenze nella percezione del dolore [38] 23; 38]. Lo screening imparziale dell'intero esoma e le analisi *in silico* hanno identificato varianti in Kv7.2 e Kv7.3 nel soggetto resiliente, e i test funzionali hanno fornito prove del ruolo di queste varianti nella regolazione dell'eccitabilità degli iPSC-SN, a sostegno della presenza di una componente periferica per la resilienza al dolore e suggerendo che il targeting dei canali Kv7 può essere una strada efficace per il trattamento del dolore. Sebbene i canali Kv7 siano bersagli stabiliti negli studi sul dolore e gli attivatori del canale Kv7.2/Kv7.3 attenuano le risposte nocicettive nei modelli animali di dolore [7; 35], ulteriori geni modificatori sono senza dubbio coinvolti nella risposta integrata di questi soggetti allo stimolo doloroso. Questo approccio cellulare autonomo può portare all'identificazione di ulteriori geni modificatori e quindi a nuovi bersagli per lo sviluppo di farmaci.

### **Conclusioni**

Gli iPSC-SN specifici del paziente hanno fornito un potente sistema cellulare autonomo per correlare l'eccitabilità di questi neuroni con il fenotipo del dolore nei pazienti e per testare la risposta a farmaci o ad altri approcci terapeutici, il che aumenta il valore di questi dati preclinici per ulteriori sviluppi clinici reagenti sperimentali. Tuttavia, gli iPSC-SN non riflettono completamente l'eterogeneità dei neuroni DRG umani [8; 22], nonostante un rapporto secondo il quale condividono l'80% delle trascrizioni trovate nei neuroni DRG umani adulti [37]. Inoltre, gli attuali protocolli di differenziazione non hanno avuto successo nel generare in modo riproducibile l'intero complemento di componenti dell'elettrogenosoma che è presente nei neuroni nativi [8]. Nonostante queste limitazioni, gli studi in vitro su iPSC-SN e sui neuroni DRG umani (quando disponibili) hanno già fatto avanzare la nostra comprensione delle basi cellulari della fisiopatologia del dolore e promettono di migliorare le possibilità di tradurre con successo i dati preclinici sui farmaci sperimentali nell'uso clinico.

Esistono approcci promettenti per affrontare queste limitazioni e migliorare l'utilità delle iPSC negli studi preclinici. Le co-culture di iPSC-SN e del tessuto cutaneo derivato da iPSC porteranno a un sistema sperimentale "organ-in-a-dish". Altri interessanti progressi includono il trapianto di iPSC umane nei DRG di roditori *in vivo* [34] e la crescita di organoidi DRG [18], entrambi per sfruttare l'ambiente micronico al fine di differenziare i neuroni sensoriali umani in un ambiente più nativo. Pertanto, prevediamo che l'uso di iPSC specifiche del paziente rappresenti un progresso significativo nel campo, che aiuterà a colmare il divario traslazionale tra la conoscenza preclinica e lo sviluppo di analgesici efficaci.

*Traduzione a cura di:*

*Lorenza Saini, Associazione Italiana per lo Studio del Dolore*

*Daniele Battelli, EDPM, MD Specialist in Anesthesia, Intensive Care and Pain Medicine, Ospedale di Stato della Repubblica di San Marino*



## Bibliografia

- [1] Cao L, McDonnell A, Nitzsche A, Alexandrou A, Saintot PP, Loucif AJ, Brown AR, Young G, Mis M, Randall A, Waxman SG, Stanley P, Kirby S, Tarabar S, Gutteridge A, Butt R, McKernan RM, Whiting P, Ali Z, Bilsland J, Stevens EB. Pharmacological reversal of a pain phenotype in iPSC-derived sensory neurons and patients with inherited erythromelalgia. *Sci Transl Med* 2016;8(335):335ra356.
- [2] Chambers SM, Qi Y, Mica Y, Lee G, Zhang XJ, Niu L, Bilsland J, Cao L, Stevens E, Whiting P, Shi SH, Studer L. Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nat Biotechnol* 2012;30(7):715-720.
- [3] Clark AJ, Kugathasan U, Baskozos G, Priestman DA, Fugger N, Lone MA, Othman A, Chu KH, Blesneac I, Wilson ER, Laura M, Kalmar B, Greensmith L, Hornemann T, Platt FM, Reilly MM, Bennett DL. An iPSC model of hereditary sensory neuropathy-1 reveals L-serine-responsive deficits in neuronal ganglioside composition and axoglial interactions. *Cell Rep Med* 2021;2(7):100345.
- [4] Denk F, McMahon SB, Tracey I. Pain vulnerability: a neurobiological perspective. *Nat Neurosci* 2014;17(2):192-200.
- [5] Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Cummins TR, Black JA, Wood PM, Waxman SG. Two tetrodotoxin-resistant sodium channels in human dorsal root ganglion neurons. *FEBS Lett* 1999;462(1-2):117-120.
- [6] Dib-Hajj SD, Waxman SG. Translational pain research: Lessons from genetics and genomics. *Sci Transl Med* 2014;6(249):249sr244.
- [7] Du X, Gao H, Jaffe D, Zhang H, Gamper N. M-type K(+) channels in peripheral nociceptive pathways. *Br J Pharmacol* 2018;175(12):2158-2172.
- [8] Eberhardt E, Havlicek S, Schmidt D, Link AS, Neacsu C, Kohl Z, Hampf M, Kist AM, Klinger A, Nau C, Schuttler J, Alzheimer C, Winkler J, Namer B, Winner B, Lampert A. Pattern of Functional TTX-Resistant Sodium Channels Reveals a Developmental Stage of Human iPSC- and ESC-Derived Nociceptors. *Stem Cell Reports* 2015;5(3):305-313.
- [9] Eijkenboom I, Sopacua M, Hoeijmakers JGJ, de Greef BTA, Lindsey P, Almomani R, Marchi M, Vanoevelen J, Smeets HJM, Waxman SG, Lauria G, Merkies ISJ, Faber CG, Gerrits MM. Yield of

- peripheral sodium channels gene screening in pure small fibre neuropathy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2019;90(3):342-352.
- [10] Geha P, Yang Y, Estacion M, Schulman BR, Tokuno H, Apkarian AV, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Pharmacotherapy for Pain in a Family With Inherited Erythromelalgia Guided by Genomic Analysis and Functional Profiling. *JAMA Neurol* 2016;73(6):659-667.
- [11] Giblin JP, Etayo I, Castellanos A, Andres-Bilbe A, Gasull X. Anionic Phospholipids Bind to and Modulate the Activity of Human TRESK Background K(+) Channel. *Mol Neurobiol* 2019;56(4):2524-2541.
- [12] Han C, Estacion M, Huang J, Vasylyev DV, Zhao P, Dib-Hajj S, Waxman SG. Human Nav1.8: enhanced persistent and ramp currents contribute to distinct firing properties of human DRG neurons. *J Neurophysiol* 2015;113(9):3172-3185.
- [13] Hartung JE, Moy JK, Loeza-Alcocer E, Nagarajan V, Jostock R, Christoph T, Schroeder W, Gold MS. Voltage gated calcium channels in human dorsal root ganglion neurons. *Pain* 2021(doi: 10.1097/j.pain.0000000000002465.).
- [14] Inoue S, Murata K, Tanaka A, Kakuta E, Tanemura S, Hatakeyama S, Nakamura A, Yamamoto C, Kosakai K, Yoshino M. Ionic channel mechanisms mediating the intrinsic excitability of Kenyon cells in the mushroom body of the cricket brain. *J Insect Physiol* 2014.
- [15] Klein T, Gunther K, Sommer CL, Edenhofer F, Uceyler N. Generation of patient-derived sensory neurons using iPSCs & smNPCs obtained from patients with Fabry disease. <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/4376/presentation/19713> 2017.
- [16] Liu C, Au JD, Zou HL, Cotten JF, Yost CS. Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth Analg* 2004;99(6):1715-1722.
- [17] Lotsch J, Doehring A, Mogil JS, Arndt T, Geisslinger G, Ultsch A. Functional genomics of pain in analgesic drug development and therapy. *Pharmacol Ther* 2013;139(1):60-70.
- [18] Mazzara PG, Muggeo S, Luoni M, Massimino L, Zaghi M, Valverde PT, Brusco S, Marzi MJ, Palma C, Colasante G, Iannielli A, Paulis M, Cordiglieri C, Giannelli SG, Podini P, Gellera C, Taroni F, Nicassio F, Rasponi M, Broccoli V. Frataxin gene editing rescues Friedreich's ataxia pathology in dorsal root ganglia organoid-derived sensory neurons. *Nat Commun* 2020;11(1):4178.
- [19] McDermott LA, Weir GA, Themistocleous AC, Segerdahl AR, Blesneac I, Baskozos G, Clark AJ, Millar V, Peck LJ, Ebner D, Tracey I, Serra J, Bennett DL. Defining the Functional Role of Nav1.7 in Human Nociception. *Neuron* 2019;101(5):905-919
- [20] McDonnell A, Schulman B, Ali Z, Dib-Hajj SD, Brock F, Cobain S, Mainka T, Vollert J, Tarabar S, Waxman SG. Inherited erythromelalgia due to mutations in SCN9A: natural history, clinical phenotype and somatosensory profile. *Brain* 2016;139((Pt 4)):1052-1065.
- [21] Meents JE, Bressan E, Sontag S, Foerster A, Hautvast P, Rosseler C, Hampl M, Schuler H, Goetzke R, Chi Le TK, Kleggetveit IP, Le Cann K, Kerth C, Rush AM, Rogers M, Kohl Z, Schmelz M, Wagner W, Jorum E, Namer B, Winner B, Zenke M, Lampert A. The role of Nav1.7 in human nociceptors: insights from human iPS cell-derived sensory neurons of erythromelalgia patients. *Pain* 2019.
- [22] Middleton SJ, Barry AM, Comini M, Li Y, Ray PR, Shiers S, Themistocleous AC, Uhelski ML, Yang X, Dougherty PM, Price TJ, Bennett DL. Studying human nociceptors: from fundamentals to clinic. *Brain* 2021;144(5):1312-1335.
- [23] Mis MA, Yang Y, Tanaka BS, Gomis-Perez C, Liu S, Dib-Hajj F, Adi T, Garcia-Milian R, Schulman BR, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Resilience to Pain: A Peripheral Component Identified Using Induced Pluripotent Stem Cells and Dynamic Clamp. *J Neurosci* 2019;39(3):382-392.
- [24] Mogil JS. Sources of Individual Differences in Pain. *Annu Rev Neurosci* 2021;44:1-25.
- [25] Namer B, Schmidt D, Eberhardt E, Maroni M, Dorfmeister E, Kleggetveit IP, Kaluza L, Meents J, Gerlach A, Lin Z, Winterpacht A, Dragicevic E, Kohl Z, Schuttler J, Kurth I, Warncke T, Jorum E, Winner B, Lampert A. Pain relief in a neuropathy patient by lacosamide: Proof of principle of clinical translation from patient-specific iPS cell-derived nociceptors. *EBioMedicine* 2019;39:401-408.
- [26] Pettingill P, Weir GA, Wei T, Wu Y, Flower G, Lalic T, Handel A, Duggal G, Chintawar S, Cheung J, Arunasalam K, Couper E, Haupt LM, Griffiths LR, Bassett A, Cowley SA, Cader MZ. A causal role for TRESK loss of function in migraine mechanisms. *Brain* 2019;142(12):3852-3867.

- [27] Price TJ, Basbaum AI, Bresnahan J, Chambers JF, De Koninck Y, Edwards RR, Ji RR, Katz J, Kavelaars A, Levine JD, Porter L, Schechter N, Sluka KA, Terman GW, Wager TD, Yaksh TL, Dworkin RH. Transition to chronic pain: opportunities for novel therapeutics. *Nat Rev Neurosci* 2018;19(7):383-384.
- [28] Renthal W, Chamesian A, Curatolo M, Davidson S, Burton M, Dib-Hajj S, Dougherty PM, Ebert AD, Gereau RWt, Ghetti A, Gold MS, Hoben G, Menichella DM, Mercier P, Ray WZ, Salvemini D, Seal RP, Waxman S, Woolf CJ, Stucky CL, Price TJ. Human cells and networks of pain: Transforming pain target identification and therapeutic development. *Neuron* 2021;109(9):1426-1429.
- [29] Serrano A, Mo G, Grant R, Pare M, O'Donnell D, Yu XH, Tomaszewski MJ, Perkins MN, Seguela P, Cao CQ. Differential expression and pharmacology of native P2X receptors in rat and primate sensory neurons. *J Neurosci* 2012;32(34):11890-11896.
- [30] Soliman MA, Aboharb F, Zeltner N, Studer L. Pluripotent stem cells in neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 2017;22(9):1241-1249.
- [31] Tappe-Theodor A, King T, Morgan MM. Pros and Cons of Clinically Relevant Methods to Assess Pain in Rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2019;100:335-343.
- [32] Tracey I, Woolf CJ, Andrews NA. Composite Pain Biomarker Signatures for Objective Assessment and Effective Treatment. *Neuron* 2019;101(5):783-800.
- [33] Valeyev AY, Hackman JC, Wood PM, Davidoff RA. Pharmacologically novel GABA receptor in human dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 1996;76(5):3555-3558.
- [34] Viventi S, Frausin S, Howden SE, Lim SY, Finol-Urdaneta RK, McArthur JR, Abu-Bonsrah KD, Ng W, Ivanusic J, Thompson L, Dottori M. In vivo survival and differentiation of Friedreich ataxia iPSC-derived sensory neurons transplanted in the adult dorsal root ganglia. *Stem Cells Transl Med* 2021;10(8):1157-1169.
- [35] Wu Z, Li L, Xie F, Du J, Zuo Y, Frost JA, Carlton SM, Walters ET, Yang Q. Activation of KCNQ Channels Suppresses Spontaneous Activity in Dorsal Root Ganglion Neurons and Reduces Chronic Pain after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 2017;34(6):1260-1270.
- [36] Yezierski RP, Hansson P. Inflammatory and Neuropathic Pain From Bench to Bedside: What Went Wrong? *J Pain* 2018;19(6):571-588.
- [37] Young GT, Gutteridge A, Fox HD, Wilbrey AL, Cao L, Cho LT, Brown AR, Benn CL, Kammonen LR, Friedman JH, Bictash M, Whiting P, Bilsland JG, Stevens EB. Characterizing Human Stem Cell-derived Sensory Neurons at the Single-cell Level Reveals Their Ion Channel Expression and Utility in Pain Research. *Mol Ther* 2014;22(8):1530-1543.
- [38] Yuan JH, Estacion M, Mis MA, Tanaka BS, Schulman BR, Chen L, Liu S, Dib-Hajj FB, Dib-Hajj SD, Waxman SG. KCNQ variants and pain modulation: a missense variant in Kv7.3 contributes to pain resilience. *Brain Commun* 2021;3(3):fcab212.
- [39] Zeltner N, Studer L. Pluripotent stem cell-based disease modeling: current hurdles and future promise. *Curr Opin Cell Biol* 2015;37:102-110.
- [40] Zhang H, Lecker I, Collymore C, Dokova A, Pham MC, Rosen SF, Crawhall-Duk H, Zain M, Valencia M, Filippini HF, Li J, D'Souza AJ, Cho C, Michailidis V, Whissell PD, Patel I, Steenland HW, Virginia Lee WJ, Moayedi M, Sterley TL, Bains JS, Stratton JA, Matyas JR, Biernaskie J, Dubins D, Vukobradovic I, Bezginov A, Flenniken AM, Martin LJ, Mogil JS, Bonin RP. Cage-lid hanging behavior as a translationally relevant measure of pain in mice. *Pain* 2021;162(5):1416-1425.
- [41] Zhang X, Priest BT, Belfer I, Gold MS. Voltage-gated Na<sup>+</sup> currents in human dorsal root ganglion neurons. *Elife* 2017;6.
- [42] Zorina-Lichtenwalter K, Meloto CB, Khoury S, Diatchenko L. Genetic predictors of human chronic pain conditions. *Neuroscience* 2016;338:36-62.