



Células y tejido humano en estudios pre-clínicos: Inducción de células madre pluripotenciales.

Sulayman D. Dib-Hajj^{1,2}, David L. Bennett³, Angelika Lampert⁴, Nurcan Üçeyler⁵

¹Department of Neurology and ²Center for Neuroscience and Regeneration Research, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06510; and Rehabilitation Research Center, Veterans Administration Connecticut Healthcare System, West Haven, Connecticut.

³Nuffield Department of Clinical Neuroscience, University of Oxford, Oxford, UK

⁴Institute of Physiology, Uniklinik RWTH Aachen University, Pauwelsstrasse 30, 52074 Aachen, Germany

⁵Department of Neurology, University of Würzburg, Würzburg, Germany

Address for correspondence

Sulayman D. Dib-Hajj, PhD
The Center for Neuroscience and Regeneration Research
127A, Bldg. 34
VA Connecticut Healthcare System
950 Campbell Ave.
West Haven, CT 06516
Tel: (203) 937 3802
Fax: (203) 937 3801
E-mail: sulayman.dib-hajj@yale.edu



El dolor es adaptativo porque nos advierte de un daño inminente, sin embargo, el dolor crónico es maladaptativo y sigue siendo una necesidad médica global no cubierta. Los nociceptores son aquellas neuronas sensoriales especializadas en la detección de estímulos nocivos (aquellos estímulos que pueden causar una lesión tisular). Normalmente tienen un alto umbral de disparo, pero las lesiones nerviosas, la inflamación de los tejidos o los trastornos genéticos provocan la sensibilización de estos nociceptores, lo que puede dar lugar a la aparición de dolor crónico. Comprender las bases moleculares de la excitabilidad de estas neuronas y cómo responden a la enfermedad o lesiones es fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos, así como para el alcance de una mayor eficacia en el tratamiento del dolor. Igualmente importante es la comprobación preclínica de las terapias en investigación en sus objetivos humanos, ya que pueden existir diferencias específicas entre especies en las propiedades de estos objetivos.

Enfoques experimentales actuales para estudiar el dolor

El desarrollo exitoso de tratamientos novedosos para el dolor se ha visto obstaculizado por múltiples factores, que deberán abordarse para salvar la brecha entre los conocimientos preclínicos básicos y su traslación a la clínica. Los estudios con animales han sido muy valiosos para dilucidar el papel de moléculas y circuitos específicos en la transducción y transmisión de estímulos nocivos, así como, para los estudios preclínicos de farmacología in vivo [27]. Sin embargo, se ha reconocido que los paradigmas de testeo del dolor son un impedimento para el desarrollo satisfactorio de fármacos clínicamente útiles [36]. Se han desarrollado nuevos paradigmas para probar el comportamiento al dolor en animales con el fin de obtener resultados más relevantes desde el punto de vista de la traslación inter especie [31; 40]. Otro impedimento son las diferencias específicas de cada especie a nivel molecular y funcional de varias dianas farmacológicas en investigación [5; 11-13; 16; 29; 33; 41]. Por lo tanto, el ensayo de los fármacos en investigación en modelos celulares humanos es un "puente" hacia la traslación [28].

Neuronas sensoriales derivadas de células madre pluripotentes inducidas

El uso de células humanas, incluidas las neuronas del GRD (ganglio de la raíz dorsal), en los estudios preclínicos de fármacos en investigación tiene la ventaja de evaluar la participación de la diana y la eficacia de los fármacos en el entorno celular nativo. Aunque el interés por el uso de neuronas humanas del GRD en ensayos celulares es cada vez mayor, sigue siendo difícil obtener neuronas nativas del GRD a gran escala para su uso generalizado en estudios preclínicos [28] y, al



ser posmitóticas, no son susceptibles de ingeniería genómica o expansión a gran escala. El desarrollo de un enfoque para diferenciar las neuronas sensoriales a partir de iPSC (iPSC-SN) [2] ha proporcionado una plataforma tecnológica para comprender la fisiopatología de las enfermedades, incluidos los mecanismos de lesión neuronal e hiperexcitabilidad, el desarrollo de ensayos basados en células para examinar y validar nuevos fármacos antes de embarcarse en costosos ensayos clínicos. También se ha avanzado gracias a esta tecnología en la identificación y validación de biomarcadores, e incluso en el uso de las iPSC-SN como biomarcadores de la enfermedad per se [22; 32].

iPSC-SN para estudiar los mecanismos patológicos

Las iPSCs conservan el fondo genético y la maquinaria transcripcional nativa de los individuos [14; 30; 39], permitiendo así estudios mecanísticos de la enfermedad que no están sujetos a los potenciales artefactos que podrían surgir de los sistemas de sobreexpresión o de los estudios con animales transgénicos. Las iPSC-SN específicas de pacientes proporcionan un modelo de dolor "*in a dish*", con los mejores ejemplos procedentes de los estudios de los trastornos de dolor relacionados con Nav1.7, la eritromelalgia heredada (IEM) y la insensibilidad congénita al dolor (CIP) [1; 19; 21; 23; 38]. Los estudios han demostrado que las iPSC-SN de pacientes específicos que portan mutaciones de ganancia de función en Nav1.7 son más excitables que las de los sujetos de control [1; 21; 23], lo que concuerda con el aumento del dolor que experimentan los portadores de estas mutaciones. Por el contrario, las iPSC-SN de pacientes con CIP relacionada con Nav1.7 mostraron una excitabilidad menor que la de las líneas de control. Es importante destacar que la excitabilidad se normalizó cuando se corrigió una de las mutaciones utilizando la edición genómica CRISPR-Cas9 [19]. Otros ejemplos de iPSC-SN específicas para pacientes que se utilizan para estudiar los mecanismos del dolor incluyen la migraña [26] y varios tipos diferentes de neuropatía, como la neuropatía de fibras pequeñas (SFN) y la enfermedad de Fabry [15].

La SFN se asocia con frecuencia a la aparición en la edad adulta de una reducción del número de fibras nerviosas intraepidérmicas en la piel y a síntomas clínicos de dolor crónico de naturaleza quemante. Se ha relacionado con variantes en los canales de sodio voltaje dependientes [9]. Las iPSC-SN son un modelo útil para estudiar los efectos de estas variantes en la excitabilidad neuronal [25] y potencialmente estudiar el vínculo entre la función celular y la pérdida anatómica de fibras nerviosas. La neuropatía sensorial hereditaria tipo 1 (HSN-1) es una neuropatía dolorosa que afecta especialmente a las fibras pequeñas y que se debe a mutaciones heterocigotas en el gen SPTLC1.



Esto conduce a una alteración del metabolismo de los esfingolípidos y a la producción de desoxisfingobases (DSB) tóxicas.

Niveles de DSBs elevados son detectables en iPSCd-SN humanas de pacientes con HSN1 junto con una producción reducida de gangliósidos complejos, degeneración de axones e hiperexcitabilidad. Esto se utilizó para probar la terapia modificadora de la enfermedad que junto con la adición de Serina, que reduce la producción de DSB, podría prevenir muchos de estos cambios [3].

iPSC-SN para la medicina personalizada

El desarrollo de iPSC-SN específicas para cada paciente ofrece la oportunidad de probar la respuesta de estas neuronas a tratamientos farmacológicos específicos. La atenuación de la excitabilidad de las iPSC-SN específicas del paciente a un fármaco específico sugeriría la participación de la diana in vivo y la expectativa de que un paciente puede beneficiarse de dicho tratamiento, mientras que una respuesta pobre de las neuronas in vitro sugeriría que el tratamiento del paciente con este fármaco puede no ser eficaz. Esta es la esencia de la medicina personalizada, que reduce la necesidad de un enfoque de prueba y error para el tratamiento. Hay un pequeño número de casos en los que se han utilizado iPSC-SN específicas para el paciente en los que parece que se han cumplido los principios de este enfoque de medicina personalizada [1; 25]. Si bien este enfoque podría ser útil en pequeños estudios clínicos, la generación y el mantenimiento de las iPSC-SN requiere mucha mano de obra y es costoso, por lo que es necesario profundizar en el y, en el mejor de los casos, automatizarlo antes de que pueda ser útil para su aplicación generalizada en la clínica.

iPSC-SN: sustrato genético para identificar nuevas dianas para el desarrollo de fármacos

Salvo en los casos de CIP, la respuesta al dolor ante un estímulo nocivo es universal, sin embargo, la experiencia a nivel individual es variable. Esta variabilidad interindividual en la respuesta al mismo estímulo está relacionada con factores genéticos y epigenéticos [4; 6; 17; 24; 42]. El paralelismo entre el dolor y la hiperexcitabilidad de las iPSC-SN específicas de cada paciente podría ofrecer la oportunidad de descubrir genes modificadores que contribuyan a la experiencia individual del dolor. Estudios recientes han aprovechado la disponibilidad de miembros bien



fenotipados de una misma familia con el trastorno doloroso IEM, debido a las mismas mutaciones de ganancia de función de Nav1.7 S241T o F1449V, que manifiestan diferencias distintas en las características más destacadas del dolor [10; 20; 38] para establecer y validar un modelo de "resistencia al dolor *in a dish*" que está empezando a identificar genes modificadores que confieren diferencias interindividuales en la excitabilidad neuronal que posiblemente contribuyen a las diferencias interindividuales en los síntomas de dolor en estos sujetos [23; 38]. El cribado no sesgado del exoma completo y los análisis *en silico* identificaron variantes en Kv7.2 y Kv7.3 en el sujeto resistente, y las pruebas funcionales proporcionaron pruebas de un papel de estas variantes en la regulación de la excitabilidad de las iPSC-SN, lo que apoya la presencia de un componente periférico en la resistencia al dolor. Esto sugiere que dirigirse a los canales Kv7 puede ser una vía eficaz para el tratamiento del dolor. Aunque los canales Kv7 son dianas establecidas en los estudios sobre el dolor y los abridores de los canales Kv7.2/Kv7.3 atenúan los comportamientos nociceptivos en modelos animales de dolor [7; 35], es indudable que otros genes modificadores están implicados en la respuesta integrada de estos sujetos al estímulo doloroso. Este enfoque celular autónomo puede conducir a la identificación de genes modificadores adicionales y, por tanto, de nuevas dianas para el desarrollo de fármacos.

Conclusión

Las iPSC-SN específicas del paciente han proporcionado un potente sistema autónomo de células para correlacionar la excitabilidad de estas neuronas con el fenotipo del dolor en los pacientes, y para probar la respuesta a los fármacos u otros enfoques terapéuticos, lo que aumenta el valor de estos datos preclínicos para el desarrollo clínico posterior de los reactivos de investigación. Sin embargo, las iPSC-SN no captan totalmente la heterogeneidad de las neuronas humanas del GRD [8; 22] a pesar de que se ha informado de que comparten el 80% de la información transcrita encontrada en las neuronas humanas del GRD adultas [37]. Además, los protocolos de diferenciación actuales no han conseguido generar de forma reproducible el complemento completo de componentes del electrogenosoma que está presente en las neuronas nativas [8]. A pesar de estas limitaciones, los estudios *in vitro* de iPSC-SN y de neuronas humanas de DRG (cuando están disponibles) ya han hecho avanzar nuestra comprensión de las bases celulares de la fisiopatología del dolor y prometen mejorar las posibilidades de trasladar con éxito los datos preclínicos de los fármacos en investigación al uso clínico. Existen enfoques prometedores para abordar estas limitaciones y mejorar la utilidad de las iPSC en los estudios preclínicos. Los cultivos conjuntos de iPSC-SN y tejido cutáneo derivado de iPSC darán lugar a un sistema experimental



"*órgano in a dish*". Otros avances interesantes son el trasplante de iPSC humanas en GRD de roedores in vivo [34] y el cultivo de organoides de GRD [18], ambos para aprovechar el entorno del micronicho para diferenciar las neuronas sensoriales humanas en un entorno más parecido al nativo. Por lo tanto, predecimos que el uso de iPSC específicas para cada sujeto representa avances significativos en el campo y ayudará a cerrar la brecha traslacional entre el conocimiento preclínico y el desarrollo de analgésicos eficaces.

Bibliografía

- [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, Bilslund 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, Bilslund 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, Hampl 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, Menicella 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⁺ 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.

Traducción:

Dolores Mesa M.D, Alex Barroso PhD.

Hospital Regional Universitario de Málaga