



Células e tecidos humanos em estudos pré-clínicos: gânglios raquidianos humanos

Sulayman D. Dib-Hajj^{1,2,3}, Steve Davidson⁴, Robert W. Gereau 4th⁵, Michael S. Gold⁶, Theodore J. Price⁷

¹Department of Neurology and ²Center for Neuroscience and Regeneration Research, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06510; ³Rehabilitation Research Center, Veterans Administration Connecticut Healthcare System, West Haven, Connecticut 06516; ⁴Department of Anesthesiology, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH 45267; ⁵Washington University Pain Center and Department of Anesthesiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110; ⁶Pittsburgh Center for Pain Research and Department of Neurobiology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh PA 15213; ⁷Department of Neuroscience and Center for Advanced Pain Studies, University of Texas at Dallas, Richardson, TX 75080

Morada para correspondência:

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



A dor é uma experiência sensorial e emocional, comumente iniciada em resposta a um estímulo nódico. Um grupo de neurónios sensoriais periféricos, conhecidos como nociceptores, são os primeiros neurónios a serem ativados pelo estímulo nódico. Os corpos celulares dos neurónios sensoriais estão alojados no gânglio do trigêmeo (TG) ou no gânglio raquidiano dorsal (DRG), situados bilateralmente e adjacentes ao tronco cerebral ou coluna vertebral. Estes neurónios pseudounipolares dão origem a um ramo periférico que inerva órgãos-alvo, por exemplo a pele e as vísceras, e um ramo central que termina no tronco cerebral ou no corno dorsal da medula espinhal [4]. Os neurónios sensoriais são altamente heterogéneos, com múltiplas subpopulações cada uma possuindo uma constelação de propriedades de resposta a estímulos não nociceptivos e nociceptivos. Os neurónios nociceptivos não são apenas responsáveis por sinalizar a presença de uma lesão aguda no tecido, mas parecem desempenhar um papel essencial na dor persistente e na hipersensibilidade associada a muitos estados de dor crónica. Assim, entender os fundamentos moleculares e celulares da transmissão de sinal em e através dos nociceptores é essencial para o desenvolvimento de tratamentos eficazes e seguros para a dor.

Plataformas experimentais para estudar dor

Embora seja eticamente possível realizar alguns estudos de dor em voluntários humanos, esses estudos são de alcance limitado, geralmente envolvem indivíduos saudáveis e raramente são passíveis de intervenções experimentais projetadas para revelar mecanismos. Como resultado, a compreensão dos mecanismos de nociceção e da dor foi em grande parte obtida do estudo de modelos animais em geral, murganhos e ratos em particular [23]. Embora muitos mecanismos fisiopatológicos estejam conservados entre roedores e humanos, diferenças importantes nos níveis anatómicos, moleculares e celulares muito provavelmente contribuíram para a falha translacional de alguns fármacos para dor. Essas lacunas fundamentais estão a começar a ser colmatadas usando tecido nervoso humano. O uso de tecidos nervoso humano tem potencial para melhorar a nossa compreensão da base molecular e celular da nociceção e sua modulação em humanos. Também servirão como uma plataforma celular para interrogar o valor



translacional de alvos e fármacos antes de embarcar em ensaios clínicos caros em humanos [26]. Assim, vamos concentrar-nos em estudos com neurónios DRG humanos nesta ficha técnica.

Nociceptores, receptores, canais iónicos e dor

Por necessidade, os nociceptores são normalmente quiescentes e limitam as respostas a estímulos nódicos. No entanto, esses neurónios podem ficar sensibilizados. A sensibilização é caracterizada pelo surgimento de atividade espontânea, um limiar para ativação reduzido e/ou uma resposta aumentada aos mesmos estímulos sob uma variedade de condições, incluindo lesão nervosa, inflamação dos tecidos, e distúrbios metabólicos ou genéticos, contribuindo e provavelmente causando dor crónica [5]. Os receptores especializados encontrados nas terminações nervosas dos nociceptores são ativados por estímulos nódicos, levando a potenciais geradores que iniciam impulsos nervosos na forma de potenciais de ação, que são gerados por um conjunto de canais iónicos dependentes da voltagem. Esses potenciais de ação propagam-se da periferia para a medula espinhal, onde os neurotransmissores são liberados das extremidades axonais. Posteriormente, o sinal é transmitido para os neurónios da medula espinhal e depois para os centros cerebrais, onde o sinal é interpretado como dor [4]. Evidência abundante suporta a noção de que a sensibilização pode ser devido a mudanças em qualquer uma destas etapas, desde a transdução do sinal até a liberação do transmissor. Um obstáculo ao tratamento direcionado é que os processos celulares subjacentes à sensibilização parecem variar dependendo do tipo de lesão, local da lesão, tempo após a lesão, sexo, história prévia e genética – incluindo possíveis diferenças de espécies entre modelos animais e humanos. Compreender a base molecular da excitabilidade dos nociceptores humanos e a sua sensibilização é, portanto, fundamental para o desenvolvimento de novos e mais eficazes fármacos para o tratamento da dor.

Neurónios humanos dos DRG na busca para elucidar os mecanismos de dor

Muito do que sabemos sobre os fundamentos moleculares e celulares da nocicepção foi obtido a partir do estudo de neurónios de DRG de roedores. Estudos anteriores com neurónios de DRG humanos



normalmente envolveram um número limitado de neurónios devido à escassez de tecido humano viável [2; 8; 36]. Isto está a mudar com o aumento da recuperação de tecidos humanos de doadores de órgãos ou autópsias rápidas, e melhorias nos métodos de isolamento e manutenção de neurónios em cultura para estudos moleculares e funcionais [6; 12; 37]. O uso de DRG humano tem confirmado a conservação de mecanismos básicos de resposta do nociceptor a estímulos em modelos de roedores. No entanto, também se descobriram diferenças importantes que desafiam alguns conceitos estabelecidos em estudos com roedores, como será discutido a seguir.

Diferenças específicas de espécie no transcriptoma e na composição celular dos neurónios dos DRG

Usando análises morfológicas e funcionais elegantes, várias subpopulações de neurónios de DRG de roedores têm sido associadas a modalidades sensoriais específicas. Mais recentemente, o advento das novas tecnologias de sequenciação tem permitido estudos a nível da célula, e a interrogação detalhada do transcriptoma dos DRG confirmou a identidade de subgrupos de neurónios de DRG que são responsáveis por modalidades sensoriais específicas em murganhos e primatas [14; 30; 35; 41]. No entanto, a demarcação de subgrupos de neurónios sensoriais específicos de modalidade em neurónios de DRG humanos não está alinhado com espécies modelo de várias maneiras potencialmente importantes [18; 20; 25; 27; 31; 32]. Por exemplo, os nociceptores humanos não possuem a separação distinta de nociceptores peptidérgicos e não peptidérgicos, que foram reportados em neurónios de murganho, e a expressão do receptor térmico TRPV1, que também é ativado pela capsaicina (o picante da malagueta), é mais difundido em humanos do que em neurónios de DRG de roedores [31-33]. Estas descobertas exigem que pensemos, cuidadosamente, sobre a interpretação de experiências funcionais que dependem da manipulação de subpopulações, geneticamente definidas, de neurónios de DRG em murganhos, pois as mesmas demarcações do tipo celular não são totalmente conservadas no DRG humano. À medida que as informações continuam a surgir dos tais estudos de perfil no DRG humano, estas informações precisam de ser integradas com dados de outras espécies para avançar a nossa capacidade de translação dos alvos em terapêuticas.



Diferenças específicas das espécies no canal iónico e nas propriedades do receptor.

Relevantes para o desenvolvimento de novos tratamentos para a dor, os estudos com DRG humanos estão a mostrar propriedades distintas dos canais iónicos e receptores que são alvos para o desenvolvimento de analgésicos. Embora a expressão de canais iónicos e receptores que regulam o disparo neuronal em neurónios de DRG de roedores e humanos seja altamente conservada, existem diferenças específicas de espécie notáveis nas propriedades biofísicas e farmacológicas dos canais e receptores [8; 10; 12; 13; 16; 29; 36; 40].

Os neurónios de DRG de roedores têm limiares mais baixos para gerar potencial de ação em comparação com os neurónios de DRG humanos [6; 12], o que sugere uma divergência na abundância relativa ou propriedades biofísicas dos canais iónicos das duas espécies. Hartung et al [13] notaram diferenças específicas de espécies na magnitude e nas propriedades biofísicas dos canais de cálcio de alta voltagem ativados, que desempenham um papel essencial na libertação de neurotransmissores na primeira sinapse no corno dorsal da medula espinhal. Zhang et al [40] observaram que a sensibilidade das correntes de sódio em neurónios de DRG humanos para a tetrodotoxina, bloqueador selectivo de canais de sódio, é menor do que em neurónios de DRG de roedores. Embora esses estudos de DRG humanos sejam valiosos para estabelecer uma base de conhecimento, há exemplos em que os resultados gerados por diferentes laboratórios que estudam neurónios de DRG humanos não são totalmente consistentes, por exemplo, nas propriedades biofísicas da corrente de sódio que é resistente à tetrodotoxina [12; 40]. Curiosamente, as diferenças mais marcantes nos resultados reportados nesses dois estudos foram associadas às propriedades biofísicas das correntes resistentes à tetrodotoxina em neurónios de DRG de ratos, destacando o potencial impacto da heterogeneidade dos neurónios sensoriais que foram registados nos resultados gerados. Outro exemplo é a diferença nas propriedades biofísicas e farmacológicas dos receptores ionotrópicos da acetilcolina em neurónios de DRG humanos, que são diferentes daqueles encontrados em murganho ou ratos [39]. Estas diferenças específicas de espécies podem explicar porque



é que os agonistas desses receptores falharam nos ensaios clínicos para o tratamento da dor [9; 11; 24; 28].

Além de canais dependentes de voltagem e receptores ionotrópicos, os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) também têm sido explorados para potenciais analgésicos. Vários estudos demonstraram algumas diferenças funcionais e anatômicas de opióides, canabinóides e outros receptores metabotrópicos entre os DRG de roedores e humanos [1; 3; 7; 18; 19]. Após a ativação dos GPCRs controlada por ligando, investigar o grau de conservação nos mecanismos de sinalização intracelular do segundo mensageiro e a expressão génica induzida por sinal podem ser um caminho importante para validar a translação funcional de novos analgésicos ou descobrir novos mecanismos para a modulação do nociceptor entre espécies.

À medida que a disponibilidade e o uso de neurónios de DRG humanos se expandem e mais dados são recolhidos por grupos independentes, surgirá uma imagem mais clara do espectro de diferenças. Já é aparente, porém, que as diferenças específicas de espécie, na expressão e propriedades de canais e receptores, estão a reformular as nossas perspetivas sobre a base molecular e celular da nocicepção [17].

Limitações e oportunidades para a translação deste conhecimento para a prática clínica

O conjunto de dados dos estudos de neurónios de DRG humanos ainda é limitado em número, e o acesso a esse tecido ainda não está amplamente disponível. O tecido disponível é principalmente de doadores de órgãos, que por definição sofreram um evento catastrófico, ou de ressecções cirúrgicas ou de autópsias rápidas, e, portanto, catalogar esses neurónios como “normais” é discutível. De facto, os doadores de órgãos são selecionados para que estejam livres de doenças infecciosas, distúrbios e cancro que, muitas vezes, são responsáveis pela dor crónica e podem comprometer os transplantes. Contudo, estudos de neurónios de DRG de pacientes com condições de dor crónica estão a surgir [15; 21], e a comparação com dados de neurónios recolhidos de indivíduos sem diagnóstico de dor será informativa. É importante salientar que os conjuntos de dados existentes não são abrangentes o suficiente para abordar a heterogeneidade entre os doadores com base em vários fatores (alguns facilmente



identificáveis e alguns desconhecidos, incluindo diferenças biológicas e históricas), que, provavelmente, contribuem para a variabilidade interindividual em resposta a estímulos nócicos entre os humanos. Assim, há a necessidade de estudos adicionais e mais extensos usando neurónios de DRG humanos, incluindo a recolha extensa de informações sobre o histórico dos doadores. Isto só pode ser feito à medida que mais tecido for, rotineiramente, recuperado e amplamente disseminado.

As diferenças específicas de espécie nas propriedades e na farmacologia dos canais iónicos também podem ser informativas para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da dor. Por exemplo, Walker et al [38] determinaram que o canal Nav1.7 humano, que é um alvo importante para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da dor, é >200 vezes mais resistente do que o previsto ao bloqueio pela neurotoxina saxitoxina. Identificaram dois resíduos no vestíbulo externo do canal que são diferentes entre os canais Nav de primatas e não primatas, e que estão subjacentes à resistência à toxina. Com base nestas informações, um derivado da saxitoxina foi desenvolvido como um bloqueador seletivo dos Nav1.7 para testes clínicos como uma terapêutica para a dor [22; 34].

No geral, as diferenças de espécies nas propriedades dos canais e receptores iónicos devem conferir diferentes propriedades de disparo desses neurónios e sua resposta a fármacos, tornando imperativo que sejam testados nos seus alvos, nas células humanas apropriadas. Além disso, a associação baseada na função de subconjuntos de neurónios de DRG humanos com modalidades sensoriais específicas, será necessária na busca para desenvolver tratamentos baseados em mecanismos para a dor. Com o crescente acesso a neurónios humanos e melhorias contínuas na sua caracterização, podemos compreender como melhorar a eficiência na translação de descobertas em modelos animais e a identificação de novos alvos que não poderiam ser previstos pelos estudos de modelos animais.

Versão Portuguesa

APED – Associação Portuguesa para o Estudo da Dor



José Tiago Pereira, Departamento de Biomedicina – Unidade de Biologia Experimental, Faculdade de Medicina Universidade do Porto; Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto; i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto

REFERÊNCIAS

[1] Anand P, Yiangou Y, Anand U, Mukerji G, Sinisi M, Fox M, McQuillan A, Quick T, Korchev YE, Hein P. Nociceptin/orphanin FQ receptor expression in clinical pain disorders and functional effects in cultured neurons. *Pain* 2016;157(9):1960-1969.

[2] Anand U, Otto WR, Casula MA, Day NC, Davis JB, Bountra C, Birch R, Anand P. The effect of neurotrophic factors on morphology, TRPV1 expression and capsaicin responses of cultured human DRG sensory neurons. *Neurosci Lett* 2006;399(1-2):51-56.

[3] Anand U, Otto WR, Sanchez-Herrera D, Facer P, Yiangou Y, Korchev Y, Birch R, Benham C, Bountra C, Chessell IP, Anand P. Cannabinoid receptor CB2 localisation and agonist-mediated inhibition of capsaicin responses in human sensory neurons. *Pain* 2008;138(3):667-680.

[4] Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139(2):267-284.

[5] Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annu Rev Neurosci* 2009;32:1-32.

[6] Davidson S, Copits BA, Zhang J, Page G, Ghetti A, Gereau RWt. Human sensory neurons: Membrane properties and sensitization by inflammatory mediators. *Pain* 2014;155(9):1861-1870.

[7] Davidson S, Golden JP, Copits BA, Ray PR, Vogt SK, Valtcheva MV, Schmidt RE, Ghetti A, Price TJ, Gereau RWt. Group II mGluRs suppress hyperexcitability in mouse and human nociceptors. *Pain* 2016;157(9):2081-2088.



- [8] 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.
- [9] Dutta S, Hosmane BS, Awni WM. Population analyses of efficacy and safety of ABT-594 in subjects with diabetic peripheral neuropathic pain. *AAPS J* 2012;14(2):168-175.
- [10] 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.
- [11] Gilron I, Coderre TJ. Emerging drugs in neuropathic pain. *Expert Opin Emerg Drugs* 2007;12(1):113-126.
- [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] Kupari J, Usoskin D, Parisien M, Lou D, Hu Y, Fatt M, Lonnerberg P, Spangberg M, Eriksson B, Barkas N, Kharchenko PV, Lore K, Khoury S, Diatchenko L, Ernfors P. Single cell transcriptomics of primate sensory neurons identifies cell types associated with chronic pain. *Nat Commun* 2021;12(1):1510.
- [15] Li Y, North RY, Rhines LD, Tatsui CE, Rao G, Edwards DD, Cassidy RM, Harrison DS, Johansson CA, Zhang H, Dougherty PM. DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 Is Upregulated in Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats and in Humans with Neuropathic Pain. *J Neurosci* 2018;38(5):1124-1136.
- [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] 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.



[18] Moy JK, Hartung JE, Duque MG, Friedman R, Nagarajan V, Loeza-Alcocer E, Koerber HR, Christoph T, Schroder W, Gold MS. Distribution of functional opioid receptors in human dorsal root ganglion neurons. *Pain* 2020;161(7):1636-1649.

[19] Nadeau SE. Opioids for chronic noncancer pain: To prescribe or not to prescribe-What is the question? *Neurology* 2015;85(7):646-651.

[20] Nguyen NQ, von Buchholtz LJ, Reker AN, Ryba NJP, Davidson S. Single-nucleus transcriptomic analysis of human dorsal root ganglion neurons. *eLife* 2021;10:e71752.

[21] North RY, Li Y, Ray P, Rhines LD, Tatsui CE, Rao G, Johansson CA, Zhang H, Kim YH, Zhang B, Dussor G, Kim TH, Price TJ, Dougherty PM. Electrophysiological and transcriptomic correlates of neuropathic pain in human dorsal root ganglion neurons. *Brain* 2019;142(5):1215-1226.

[22] Pajouhesh H, Beckley JT, Delwig A, Hajare HS, Luu G, Monteleone D, Zhou X, Ligutti J, Amagasu S, Moyer BD, Yeomans DC, Du Bois J, Mulcahy JV. Discovery of a selective, state-independent inhibitor of Nav1.7 by modification of guanidinium toxins. *Sci Rep* 2020;10(1):14791.

[23] 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.

[24] Radbruch L, Elsner F. Emerging analgesics in cancer pain management. *Expert Opin Emerg Drugs* 2005;10(1):151-171.

[25] Ray P, Torck A, Quigley L, Wangzhou A, Neiman M, Rao C, Lam T, Kim JY, Kim TH, Zhang MQ, Dussor G, Price TJ. Comparative transcriptome profiling of the human and mouse dorsal root ganglia: an RNA-seq-based resource for pain and sensory neuroscience research. *Pain* 2018;159(7):1325-1345.

[26] 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.



[27] Rostock C, Schrenk-Siemens K, Pohle J, Siemens J. Human vs. Mouse Nociceptors - Similarities and Differences. *Neuroscience* 2018;387:13-27.

[28] Rowbotham MC, Duan RW, Thomas J, Nothaft W, Backonja MM. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial evaluating the efficacy and safety of ABT-594 in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain* 2009;146(3):245-252.

[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] Sharma N, Flaherty K, Lezgiyeva K, Wagner DE, Klein AM, Ginty DD. The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons. *Nature* 2020;577(7790):392-398.

[31] Shiers S, Klein RM, Price TJ. Quantitative differences in neuronal subpopulations between mouse and human dorsal root ganglia demonstrated with RNAscope in situ hybridization. *Pain* 2020;161(10):2410-2424.

[32] Shiers SI, Sankaranarayanan I, Jeevakumar V, Cervantes A, Reese JC, Price TJ. Convergence of peptidergic and non-peptidergic protein markers in the human dorsal root ganglion and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 2021;529(10):2771-2788.

[33] Tavares-Ferreira D, Shiers S, Ray PR, Wangzhou A, Jeevakumar V, Sankaranarayanan I, Cervantes A, Reese JC, Chamesian A, Copits BA, Dougherty PM, Gereau RW, Burton MD, Dussor G, Price TJ. Spatial transcriptomics reveals unique molecular fingerprints of human nociceptors. *bioRxiv* 2021:2021.2002.2006.430065.

[34] Thomas-Tran R, Du Bois J. Mutant cycle analysis with modified saxitoxins reveals specific interactions critical to attaining high-affinity inhibition of hNav1.7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113(21):5856-5861.

[35] Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lonnerberg P, Lou D, Hjerling-Leffler J, Haeggstrom J, Kharchenko O, Kharchenko PV, Linnarsson S, Ernfors P. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* 2015;18(1):145-153.



[36] 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.

[37] Valtcheva MV, Copits BA, Davidson S, Sheahan TD, Pullen MY, McCall JG, Dikranian K, Gereau RWt. Surgical extraction of human dorsal root ganglia from organ donors and preparation of primary sensory neuron cultures. *Nat Protoc* 2016;11(10):1877-1888.

[38] Walker JR, Novick PA, Parsons WH, McGregor M, Zablocki J, Pande VS, Du Bois J. Marked difference in saxitoxin and tetrodotoxin affinity for the human nociceptive voltage-gated sodium channel (Nav1.7) [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(44):18102-18107.

[39] Zhang X, Hartung JE, Friedman RL, Koerber HR, Belfer I, Gold MS. Nicotine Evoked Currents in Human Primary Sensory Neurons. *J Pain* 2019;20(7):810-818.

[40] Zhang X, Priest BT, Belfer I, Gold MS. Voltage-gated Na⁺ currents in human dorsal root ganglion neurons. *Elife* 2017;6.

[41] Zheng Y, Liu P, Bai L, Trimmer JS, Bean BP, Ginty DD. Deep Sequencing of Somatosensory Neurons Reveals Molecular Determinants of Intrinsic Physiological Properties. *Neuron* 2019;103(4):598-616 e597.