

Trabajo de fin de grado

Diferenciación de la línea celular MED17.11 a nociceptores

Marta García Fuster

Grado en Biotecnología

Universidad Miguel Hernández de Elche

Curso 2015-2016

Director:

Dr. Antonio Ferrer Montiel

Tutora:

Maite Artero Morales

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Índice

Resumen	5
Summary	5
Introducción	7
Antecedentes y objetivos	11
Materiales y métodos	13
Resultados	18
Diferencias morfológicas.....	18
Expresión de marcadores de nociceptores.....	19
Respuesta funcional de la línea celular MED17.11.....	26
Discusión	29
Conclusión y proyecciones futuras	32
Referencias	33

Abreviaturas y acrónimos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CGRP: Gen relacionado con el péptido de la calcitonina

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco.

DRG: Ganglios de la raíz dorsal

HBSS: Solución salina equilibrada de Hank

IBMC: Instituto de Biología Molecular y Celular

Kv: Canales de potasio dependientes de voltaje

MED17.11: *Mouse Embryonic DRG*

NaV: Canales de sodio dependientes de voltaje

NGF: Factor de crecimiento nervioso

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: Retrotranscripción reversa seguida de PCR

SNP: Sistema nervioso periférico

SNC: Sistema nervioso central

TRP: Receptor de potencial transitorio

TRPV1: Receptor de potencial transitorio de la subfamilia valinoide, miembro 1

TrkA: Tropomiosina-quinasa

Resumen

El dolor es una sensación sensorial y emocional desagradable que alerta al organismo frente a algún problema. Las neuronas nociceptoras son las encargadas de obtener información sobre el peligro o posible daño. La excitabilidad de las mismas se encuentra regulada por la actividad de diversos canales iónicos. Los nociceptores en general y determinados canales iónicos en particular se han convertido en los últimos años en las dianas para la creación de nuevos fármacos analgésicos. Debido a las dificultades de experimentación con DRG se trabaja en crear nuevos sistemas que permitan los estudios *in vitro*.

Durante el trabajo se ha diferenciado la línea celular MED17.11 a nociceptores mediante protocolos de diferenciación. Se ha observado la expresión de ARNm y de proteína de los marcadores neuronales tales como TRPV1, TrkA, CGRP, canales de sodio y de potasio mediante técnicas de RT-PCR y *Western blot*. Además, se han localizado los marcadores TRPV1 y TrkA en la célula a lo largo de la diferenciación de las mismas y también se ha mirado la funcionalidad de los canales de TRPV1 mediante técnicas de calcio.

Se ha observado expresión de los marcadores neuronales tanto del ARNm como de la proteína. No obstante, no se ha observado funcionalidad en TRPV1. Además en cuanto a morfología de las células a los distintos días de diferenciación no se ha observado homogeneidad. Esto sugiere que la diferenciación de las mismas no ha sido la correcta o solo parcial y que se deberán cambiar los protocolos de diferenciación para obtener resultados favorables.

Summary

Pain is an unpleasant sensory and emotional feeling that alerts the organism against harmful stimuli. Nociceptors are neurons that respond to noxious stimuli and their activation can result in pain. The excitability of nociceptors is regulated by the activity of different ion channels. In the past few years, nociceptors and the ion channels they express have become targets for the development of new analgesic drugs. Due to the difficulties in the experimentation with primary cultures of dorsal root ganglia (DRG), new systems are being developed that allow *in vitro* studies.

In this work, MED17.11 cells have been differentiated to nociceptors through differentiation protocols. The expression of mRNA and its protein product of neuronal targets like TRPV1, TRKA, CGRP, sodium and potassium channels have been observed through RT-PCR and *Western blot* techniques. Furthermore, TRPV1 and TrkA were observed in the cells along their differentiation. The functional expression of TRPV1 in MED17.11 cells has been studied through fluorescent calcium imaging techniques.

The mRNA and protein products of several neuronal targets have been successfully observed. However, calcium imaging studies have shown that the TRPV1 as expressed by the MED17.11 cells was not functional. Furthermore, the cells were not morphologically homogeneous during the different differentiation days. These results suggest that the cells did not differentiate correctly and the differentiation protocol needs to be changed in order to obtain successfully differentiated MED17.11 cells.

Keywords: nociceptors, differentiation, TRPV1 channel, neuronal targets.

Introducción

El dolor se entiende como una experiencia sensorial localizada o difusa y subjetiva que puede ser más o menos intensa, molesta, no placentera o desagradable con un posible o ya producido daño tisular¹.

El dolor tiene muchas formas de expresión, pero lo podemos clasificar en dos tipos: el dolor agudo que advierte sobre el inminente o subsiguiente peligro, pudiendo desaparecer rápidamente (dolor post-operatorio, post-traumático, o asociado a diferentes procedimientos médicos) y el dolor crónico donde la respuesta al dolor se puede activar independientemente de la estimulación, causando un dolor más duradero y nada beneficioso, incluso tratándose de dolor moderado (1/3 de la población mundial padece de dolor crónico)². Se trata de estímulos repetitivos en el tiempo que causan cambios adaptativos en el sistema nervioso central (SNC). Esto puede ocurrir a través de daño en las fibras nerviosas, lo que aumenta la activación espontánea o alteraciones en sus propiedades de conducción o de neurotransmisores no cumpliendo de esta manera con el papel de alerta ni de defensa³.

La percepción del dolor alerta al organismo sobre la presencia de algún problema. Gracias a ello, nuestro cuerpo es capaz de reaccionar activando respuestas para protegernos del dolor y de un posible daño mayor². Podríamos pensar que vivir sin dolor sería lo mejor, sin embargo, es necesario. Por ejemplo, las personas que no sienten dolor tienen un índice de supervivencia inferior al de la media⁴.

Los nociceptores son neuronas sensoriales periféricas. Son receptores polimodales los cuales responden a estímulos de naturaleza heterogénea: mecánica, térmica (altas y bajas temperaturas) y química⁵. Las neuronas nociceptoras, que constituyen parte del sistema nervioso periférico (SNP) son las encargadas de obtener información sobre el peligro o posible daño, representando la primera línea de defensa contra cualquier agente potencialmente peligroso o dañino. Tras la detección de estos estímulos nocivos, el individuo es capaz de reaccionar frente a ellos para evitar la sensación desagradable o intensamente dolorosa⁶. Los estímulos nocivos son transducidos a señales eléctricas en estas terminaciones nerviosas⁷. Estos potenciales de acción se transportan a áreas específicas de la médula espinal y del cerebro. Se sabe que son las fibras sensoriales pequeñas las que responden frente a estímulos nociceptivos⁸.

Los nociceptores deben de estar preparados para percibir información muy variable, lo consiguen con los distintos tipos de canales iónicos que presentan. Estos canales iónicos se

expresan tanto en terminales de los axones como en el soma celular. Cuando se activan, se generan corrientes, lo que conduce a la despolarización o hiperpolarización de la membrana causando un aumento o disminución de la excitabilidad de las neuronas sensoriales⁸.

Dentro de la gran variedad de canales iónicos, la activación de canales catiónicos responsables de la excitación en las neuronas sensoriales es evidentemente crítica para la generación de señales nociceptivas. Los principales canales responsables de corrientes de membrana de los nociceptores son los canales de sodio y de calcio activados por voltaje, además de los canales de potasio⁸ tales como Nav 1.7 cuya expresión se ve aumentada en episodios de dolor agudo e inflamación⁹, Nav1.8 que presenta déficits en procesos inflamatorios de dolor¹⁰ y Nav1.9 que aumenta su expresión en procesos de inflamación¹¹. Además Kv7.2 y Kv7.3 son necesarios para la excitabilidad subumbral de las neuronas¹². Sin embargo, la activación de los canales de cationes no selectivos resultan igualmente responsables de la excitación de las neuronas sensoriales. Por lo tanto, la excitabilidad de las neuronas se puede controlar mediante la regulación de la expresión o mediante la modulación de la actividad de estos canales⁸.

TRPV1, es un canal iónico presente en nociceptores y uno de los más estudiados^{13, 14}. Corresponde a la familia de los TRP los cuales presentan características similares como es la tipología transmembrana que está compuesta por seis dominios (S1-S6), encontrándose entre los dominios S5 y S6 la región que constituye el poro y permite el paso de iones¹⁵.

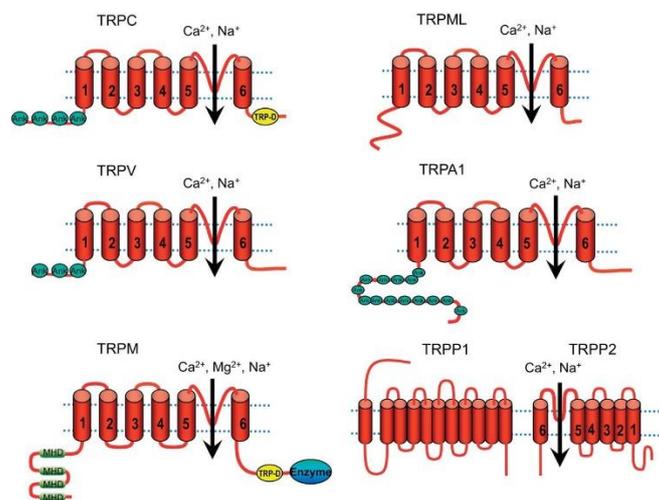


Figura 2: Diferencias de estructura entre los miembros pertenecientes a la familia de los TRP¹⁶.

Dentro de los TRP, la subfamilia TRPV o Receptores de potencial transitorio sensibles a vaniloides son canales por los cuales pueden pasar diferentes cationes, no obstante, presentan una gran selectividad frente a iones de calcio (Ca^{2+}). Los agonistas y antagonistas de estos receptores activan tanto a neuronas nociceptoras como a neuronas adyacentes, lo cual dificulta la

experimentación *In vivo*. Esta subfamilia se compone de seis canales: TRPV1-TRV4 los cuales presentan una actividad nociceptora, aunque no son exclusivos de neuronas y TRPV5 y TRPV6 que son canales de calcio epiteliales, no presentes en neuronas¹³.

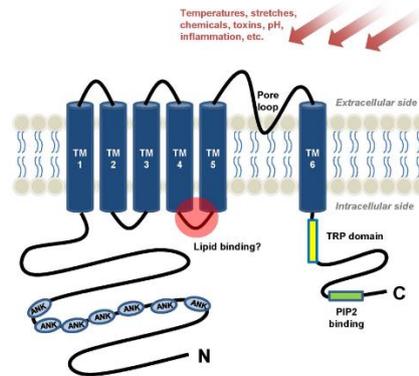


Figura 3: Estructura de los canales TRPV. Compuesta por seis subunidades, entre las regiones S5-S6 se produce el paso de los iones y los extremos N- y C- terminal quedan en el citoplasma¹⁷.

TRPV1 es activado por diversos estímulos, entre ellos el calor moderado (≥ 43 ° C), los compuestos vaniloides como la capsaicina¹⁸ o un pH ácido¹⁹. También se activa por los mediadores inflamatorios como el ATP extracelular, el NGF, el glutamato, y la bradiquinina²⁰. Los mediadores inflamatorios sensibilizan TRPV1 ya sea por la proteína quinasa que induce la fosforilación de TRPV1, por un aumento de la expresión de los receptores TRPV1 o la inhibición de los mismos¹³.

Los canales de TRPV1 están presentes principalmente en las fibras nerviosas de mielina, en los nociceptores sin mielina, que tienen cuerpos neuronales en los ganglios de la espina dorsal (DRG), ganglios trigéminos y ganglios nodosos. Además, se ha encontrado la expresión de TRPV1 en el nervio vago y en los núcleos del cerebro, además de en el hipotálamo, los músculos esqueléticos y otros tejidos periféricos, incluyendo el tracto gastrointestinal, células endoteliales, del músculo liso y arterias²¹. Junto a TRPV1 se encuentra localizado el neuropéptido CGRP²², fundamental para el desarrollo y el mantenimiento del dolor neurogénico y la inflamación²³.

El NGF o factor de crecimiento nervioso necesita de la interacción con un receptor para poder realizar su función. Se han caracterizado dos tipos de receptores, uno de baja afinidad conocido como p75 y otro de alta afinidad perteneciente a la familia Tirosina Quinasa (TRK del inglés tropomyosin-related kinase). Dentro de esta familia se encuentran diferentes subtipos de receptores como son el TrkA, TrkB y TrkC. Es a través de ellos como se produce la transducción de la señal²⁴. El NGF se une a TrkA con el que forma el complejo NGF-TrkA y es interiorizado. Después se transporta desde los terminales periféricos a los órganos sensoriales de células en el ganglio de la espina dorsal²⁵. Al igual que en las DRG, el NGF también facilita la expresión de

canales TRPV1. Estudios anteriores demuestran que en las células neuronales, el NGF se une a su receptor de alta afinidad como es el TrkA, el cual conduce a la vía de las PI3K la cual se conoce que facilita el tráfico de canales TRPV1²⁶.

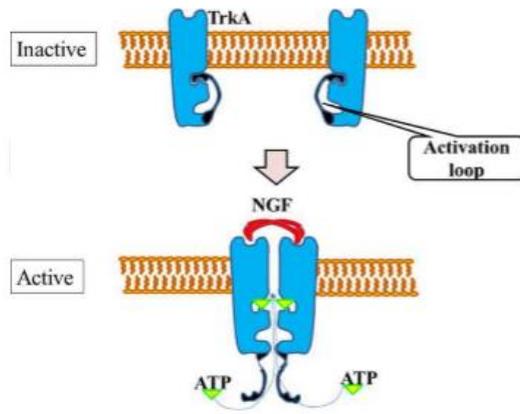


Figura: Activación del TrkA mediante el NGF²⁵.

Antecedentes y objetivos

Un número cada vez mayor de dianas terapéuticas han sido identificados en los últimos años para el tratamiento de fisiopatologías neuronales incluyendo dolor y epilepsia, entre otros. Las líneas celulares de neuronas inmortalizadas son ampliamente utilizadas como modelos para el estudio de neurofarmacología. No obstante, la caracterización farmacológica de muchos de los receptores y canales iónicos expresados en estas líneas celulares es muy deficiente, a excepción de los canales de calcio que han servido como diana para tratamientos terapéuticos²⁷.

Sin embargo, todos ellos están basados en neuronas DRG, las cuales están extraídas de animales experimentales como el ratón o la rata (4-8 semanas de vida)²⁴. Este tipo de cultivo presenta inconvenientes ya que para poder estudiar terapias analgésicas se deben de sacrificar un gran número de animales para la experimentación, y el proceso de diferenciación de neuronas DRG es muy lento y laborioso²⁸.

Las DRG's en cultivo primario son utilizadas, entre otras cosas, para estudiar el mecanismo molecular de activación de los nociceptores. Para ello se ha visto aumentado el número de modelos animales para estudiar el mecanismo de regulación de las señales del dolor y el desarrollo del sistema nervioso periférico (SNP). La búsqueda de sistemas de estudio *in vitro* ha llevado al grupo del Dr. Nassar del departamento de Ciencia Biomédica de la Universidad de Sheffield de Inglaterra, a desarrollar una línea celular denominada MED17.11 (*Mouse Embryonic DRG*) usando la cepa de ratón Inmortomouse. Estas células son capaces de expresar marcadores maduros de neuronas DRG incluidos numerosos canales iónicos, llegando a observar respuestas a compuestos nocivos y mediadores de la inflamación tales como la capsaicina o el ATP²⁸.

Es por ello por lo que la línea celular MED 17.11 se plantea como un modelo para estudiar el dolor agudo, el desarrollo específico de las neuronas DRG y el mecanismo potencial de la sensibilización periférica. El uso de MED17.11 puede ayudar a la investigación básica y farmacéutica, proporcionando un modelo *in vitro* para estudiar los mecanismos moleculares de desarrollo neuronal que subyacen a la nocicepción y la especificación del fenotipo, mientras que al mismo tiempo, permitía reducir el número de animales utilizados para obtener cultivos primarios²⁸.

También, se han hecho estudios con células con propiedades nociceptoras obtenidas de humanos, sin embargo, los protocolos de mantenimiento y manipulación de éstas requieren ser muy minuciosos y cuidadosos y requieren de unas siete semanas para evidenciar algún tipo de marcador nociceptor^{29, 30}.

En este contexto se fijan los objetivos del trabajo que son:

- Reproducción de la diferenciación a nociceptores de la línea celular MED 17.11 cedida por el laboratorio del Dr. Nassar
 - Cambio de morfología de las células no diferenciadas y diferenciadas.
 - Caracterización de la línea celular MED 17.11
 - Obtención de nociceptores maduros capaces de expresar el canal iónico TRPV1.

Materiales y métodos

○ Cultivo celular

El trabajo se ha fundamentado en el uso de la línea celular MED17.11. Esta línea celular, originaria del laboratorio dirigido por el Dr. Nassar en el departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sheffield²⁸, fue muy amablemente cedida al laboratorio de Antonio Ferrer.

Una vez obtenidos las primeras unidades de la línea celular MED17.11 se procedió a su siembra y mantenimiento creando una reserva de cultivo estable. La línea celular MED17.11 requiere para su siembra y mantenimiento la siguiente composición de medio de cultivo: DMEM/F12 enriquecido con Glutamax (Gibco), 10% de FBS (Suero bovino fetal, Gibco), penicilina /estreptomicina al 1% (Gibco), 5ng/ml de Interferón Gamma (PeproTech) y 0.5% de *Chicken Embryonic Extract* (Seralab). Las células crecen y se mantienen a 33°C a 5% de CO₂ para optimizar su crecimiento en flask T25 (25cm²). Cada 48 horas se les renueva el medio de cultivo. Una vez que los cultivos alcanzan el punto de confluencia del 100% en el flask (70-100%) se tripsinizan para continuar su cultivo o bien para sembrarlas en placa para experimentación. Éstas se tratan previamente con Poly-Ornitina (1mg/ml) durante dos horas seguidas de 3 lavados con PBS 1X.

Para el protocolo de diferenciación:

A día 0 se realiza lo que denominamos lavado de interferón (incubación de las células durante 24 horas sin la presencia de interferón en el medio de mantenimiento) a 37°C y 5% de CO₂.

Transcurridas esas 24 horas, se retira el medio presente en las células y se añade lo que denominamos medio de diferenciación que está compuesto por medio basal y una mezcla de los siguientes agentes de diferenciación: Forskolina (25µM, Sigma), diButrylylcAMP (0,5mM, Sigma), FGF2-basic (10ng/ml, Peprotech), Murine B-NGF (100ng/ml, Peprotech), Murine GDNF (10ng/ml, Peprotec) e Y-67632 (5µg/ml, Tocris).

Durante la diferenciación, se retira el 50% de medio y se añade 50% de medio de diferenciación fresco cada 48-72 horas incubando a 37°C y 5% de CO₂.

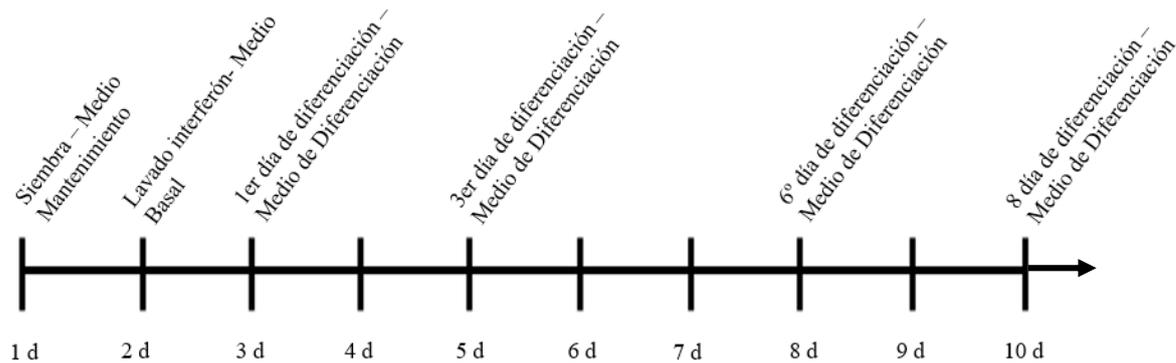


Figura 4: Protocolo de diferenciación de las células MED17.11 desde el día de la siembra y los medios utilizados para llevarlo a cabo. Se señalan los cambios de medio realizados así como el tipo de medio empleado en cada caso.

- **Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)**

En primer lugar, se aisló el ARN empleando el kit E.Z.N.A HP Total RNA KIT (Omega Bio-tek, Inc, Norcross, GA, EEUU). A partir de placas de 12 pocillos sembradas a una concentración de 20.000 células por pocillo se tomaron muestras de células sin diferenciar y diferenciadas en la placa a diferentes días.

Se realizó la retro-transcripción a una concentración de 1 µg de RNA molde por cada 50 µL de reacción total mediante el kit de Applied Biosistem compuesto por tampón PCR 10x, 25mM MgCl₂, mezcla de dNTPs 10mM, cebadores aleatorios para retro-transcripción 10x, inhibidores de la ribonucleasa, 20 U/µL y transcriptasa inversa MuLV 500 U/ µL).

En tercer lugar, se empleó la polimerasa Go Taq (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) siguiendo el protocolo de la casa comercial. El ADN recombinante (ADNc) sintetizado se utilizó como molde para la RT-PCR, utilizando unos 40ng para cada reacción. El protocolo del termociclador fue: desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, la amplificación del ADNc durante 35 ciclos usando el resto de parámetros: 95°C durante 45 segundos, 57°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos, una extensión final de 10 minutos a 72°C.

La Tabla 2 muestra las secuencias de los cebadores empleados para cada marcador genético. La mayoría de estas secuencias fueron extraídas del artículo del que se basa este trabajo²⁸. Adicionalmente, se diseñaron otras dos parejas de cebadores para los canales de potasio Kv7.2 y Kv7.3. Para el diseño se empleó la herramienta para el diseño de cebadores específicos del Centro Estadounidense de Información Tecnológica (NCBI, Bethesda, MD, EEUU).

Marcador	Cebador en sentido (5' – 3')	Cebador en contrasentido (3' – 5')	Número Acceso	Tamaño (pb)
TrkA	GGGAGTTGAGAAGCCTAACCATCG	CAGAGTCATTGGGCATCTGGATCT	NM_001033124.1	348
TRPV1	ACATCTGGAAGCTGCAGCGAG	TTGCGTCCCTCAGAAGGGGA	NM_001001445.1	500
CGRP	CGCTCACCAGGAAGGCATCAT	GTTGTCCTTACCACACCTCCTG	NM_001033954.3	343
Nav1.9	ATCCCAAGGCCCTGAACAAA	GTGTGGGCGGGAAGACGTTG	NM_011887.3	334
	ATTCCAGAGGGAAAGATGAGCAGC	TCAAAGACCTGGCTTGTGACCAA		304
Nav1.8	AACAATACTGGCCACTTCTTCTGGG	CATGAAGATGTCCTGGCCCC	NM_009134.3	300
Nav1.7	AGCAGGAAGAAGCCGAGGTAGTAT	AATGCTGAGTGGTGA CTGGTTGG	NM_018852.2	317
	TTCCGAGGCCAGGGAACAAAT	GCGAATGACTCGGAACAGGGT		350
Kv7.2	ACATTGGCTTCTCTGCCTC	GGAGGCCCATAGTTTGTAG	NM_001302888	437
Kv7.3	ATGCTACCAACCCCAACAGG	GAAAGGCGAACCCGATCCAA	NM_152923.2	143

Tabla 2: Secuencias de cebadores en 5'-3' para los genes analizados. Se especifica la secuencia en la base de datos empleada para su diseño, así como el tamaño de la banda esperado en pares de bases (pb).

- **Western Blot**

En primer lugar, se sembraron las células a concentraciones de 20 000, 30 000 y 40 000 células por pocillo en placas de 12 pocillos. En segundo lugar se separaron las células de la superficie mediante la técnica de raspado con PBS 1X, y se centrifugaron durante 3 minutos a 7 000rpm. En tercer lugar, el precipitado de células se lisó con 100 µl de RIPA (tampón de lisis: 50mM Tris-HCl pH 7.4; 150mM NaCl; 1% Np-40; 0.1% SDS; 0.5% ácido deoxicólico) con inhibidor de proteasa a una concentración 1:100. Tras una incubación de 15 minutos en hielo, se mantuvieron los eppendorf en noria a 4°C otros 15 minutos para finalmente centrifugarlos durante 15 minutos más a 4°C a 14 000g. Una vez extraídas las proteínas totales, se procedió a cuantificar la concentración de las mismas mediante el método Bradford usando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y un medidor de absorbancias PolaStart (OMEGA)

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 9% para la separación por tamaño de las proteínas cargando de 5 a 50 ng de proteína total y aplicando un voltaje entre 80-90V.

Las proteínas separadas en el gel, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad), empleando el aparato Trans-Blot Turbo Transfer System de Bio-Rad. El protocolo fijado fue de 25V, 2.5A durante 30 min en una transferencia semiseca.

Las uniones inespecíficas en membrana se bloquearon con la incubación de la misma con solución de bloqueo, leche desnatada al 5% en PBS-T (PBS 1X con 0.05% de Tween 20), en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras ello, la membrana se incubó (con solución

de bloqueo al 3%) con el anticuerpo primario rabbit anti-TRPV1 (Alomone N°cat: ACC-030) en agitación toda la noche a 4°C a una concentración de 1:5000. Tras esta incubación se realizaron 3 lavados con Buffer de PBS-T de 15, 10 y 10 minutos cada uno en agitación suave a temperatura ambiente. Seguidamente, la membrana se incubó con solución de bloqueo al 3% con el anticuerpo secundario Anti-Rabbit Ig G Goat Peroxidase (Sigma A6154) el cual se preparó a una dilución 1:20000. La incubación se realizó durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. Tras ésta, se volvió a lavar la membrana con el tampón PBS-T durante 15, 10 y 10 minutos en agitación suave a temperatura ambiente.

El revelado se realizó empleando los agentes quimioluminiscentes ECL (Termo fisher) y película fotográfica con una exposición mínima de 10 segundos.

○ **Inmunocitoquímica**

Se utilizaron células MED17.11 sembradas en placas de 12 pocillos con cristales a una concentración de 10.000 células por pocillo y en diferentes días de diferenciación.

Para poder visualizar la distribución tanto de TRPV1 como de TrkA, las células MED17.11 se lavaron 3 veces con tampón PBS 1X frío para retirar el medio y posibles residuos. Se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 15 minutos en hielo. Las células se permeabilizaron y bloquearon durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente con una solución Triton X-100 0,1% y 5% de NGS (Normal Goat Serum). Se emplea éste por ser suero procedente de la especie en la que fue obtenido el anticuerpo secundario que se utilizará más adelante. Tras permeabilizar y bloquear se incubaron los cristales con el anticuerpo primario (1:200 Rb TrkA Millipore y 1:500 Rbα TRPV1 Alomone) correspondiente a 4°C durante toda la noche. A continuación se realizaron 3 lavados de unos 5 minutos cada uno con PBS-T para pasar a incubar el anticuerpo secundario 1:200 (GTAcRb_Alexa 488 Molecular Probes) durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se realizaron otros 3 lavados con PBS-T y se procedió a marcar los núcleos celulares con 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) durante dos minutos a temperatura ambiente. Se finalizó el protocolo haciendo el montaje de los portas con Mowiol y se conservó a 4°C. Para analizar los resultados, se utilizó el microscopio confocal en Zeiss LSM 5 Pascal de microscopía de fluorescencia invertida, usando objetivos de 40x con aceite de inmersión.

- **Imágenes de Calcio**

Las células MED17.11 fueron preparadas a una densidad de 10000 células por pocillo en placas de 24 pocillos. En cada uno de los pocillos que la componen, se insertó previamente un cristal y se trató con Poly-Ornitina (1mg/ml) durante dos horas para ayudar a la fijación de las mismas. En función de las necesidades, se analizaron cristales con células a diferentes días de diferenciación.

Las células se incubaron a 37°C durante 30-60 minutos con Fluo4 (6µM) el cual fue previamente resuspendido en tampón de ensayo HBSS 1X y 25µl de ácido plurónico al 20%. Tras la incubación, los cristales se acoplaron en una pletina, la cual se fijó en el microscopio donde era perfundida con un flujo de 5mL/min de HBSS 1X a temperatura ambiente. La activación de las células se obtuvo gracias a la aplicación de pulsos de capsaicina (10µM), de cloruro potásico (40Mm) y de Ionomicina (10 µM) con la ayuda de un sistema de perfusión automático. Los protocolos fueron ajustados a lo largo de los experimentos. Las medidas de fluorescencia se realizaron con un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 equipado con una cámara ORCA-ER CCD. La excitación de Fluo-4 se produjo a 500nm, y la fluorescencia emitida se filtró con un filtro de paso largo a 535nm.

Resultados

1. *Diferencias morfológicas*

A lo largo de los meses de experimentación, hemos ido comprobando cómo la línea celular MED 17.11 ha ido variando en lo que a morfología se refiere, en función de los medios que tenían, así como con la adición del medio de diferenciación.

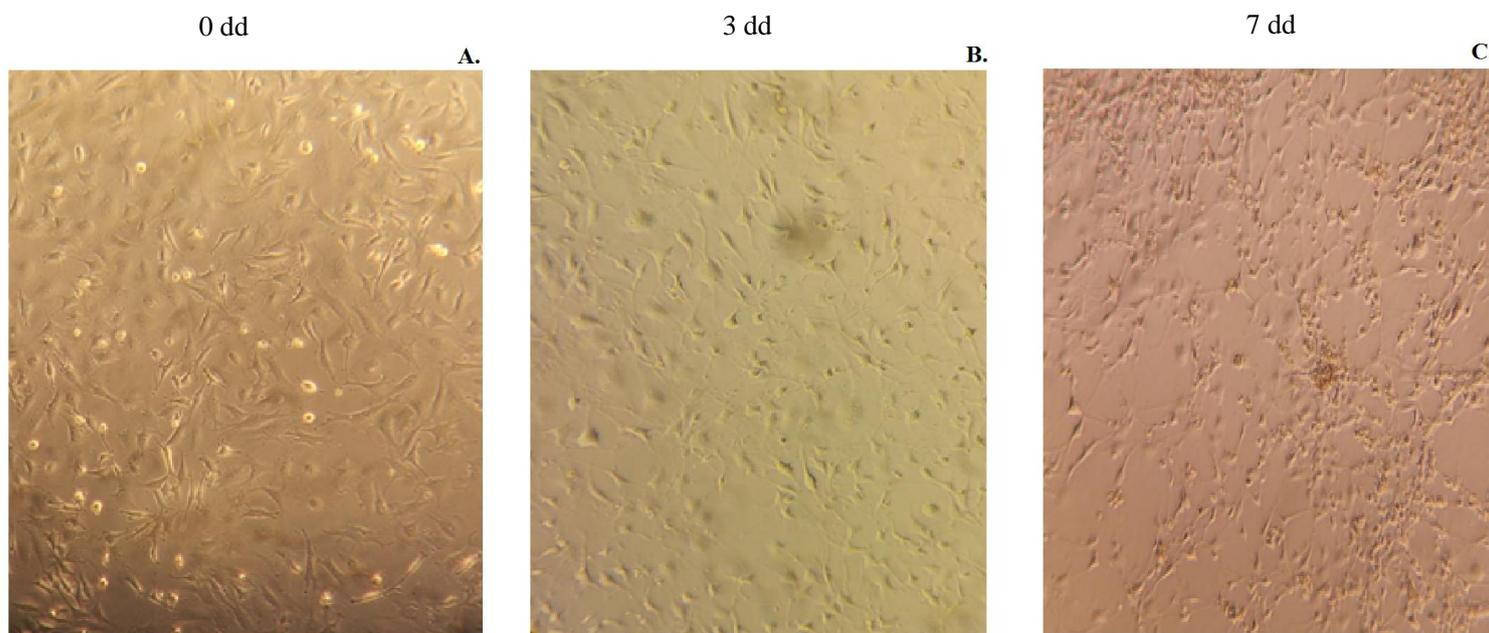


Figura 11: Cambios morfológicos a diferentes días de diferenciación. A: Cultivo celular de la línea MED 17.11 a día de diferenciación 0. Fotografías tomadas desde el microscopio Zeiss con un objetivo de 20x. B: Cultivo celular de la línea MED 17.11 a día de diferenciación 3. Fotografías tomadas desde el microscopio con un objetivo de 10x. C: Cultivo celular de la línea MED 17.11 a día de diferenciación 7. Fotografías tomadas desde el microscopio con un objetivo de 10x.

En primer lugar observamos la línea celular MED 17.11 a día de diferenciación cero (Figura 11A). Se aprecia cómo la morfología de las células es un tanto alargada, no específica y sin prolongaciones axiónicas en su mayoría, de tipo casi fibroblasto.

A día de diferenciación tres (Figura 11B) ya se puede comprobar cómo buena parte de las células presentan una morfología diferente a la de día de diferenciación cero. En la mayoría de células se observa una morfología más neuronal, con el inicio de prolongaciones axiónicas y

dendríticas, aunque existe una elevada variabilidad en el número de las mismas así como en tamaño de las células. El número de células además suele seguir creciendo en esta etapa.

A día de diferenciación 7 (Figura 11C) casi en su totalidad, las células presentan una morfología con soma redondeado y prolongaciones axiónicas y dendríticas que establecen una red compleja de conexiones entre ellas. Sigue existiendo una elevada variabilidad en el tamaño de las células.

2. *Expresión de marcadores de nociceptores.*

A través de la retrotranscripción reversa seguida de PCR (RT-PCR) se analizó la existencia de diferentes marcadores de nociceptores (Tabla 3) a diferentes días de diferenciación. Se empleó como control de la técnica RNA procedente de DRG de ratón C57BL/6J (resultados no mostrados).

<i>Marcador</i>	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 8
<i>TRPV1</i>	-	+	+	+	+
<i>TrkA</i>	-	+	+	+	+
<i>CGRP</i>	-	+	+	+	+
<i>Nav 1.9-1</i>	+	-	+	+	
<i>Nav 1.9-2</i>	-	-	+	+	
<i>Nav 1.8</i>	-	+	+	+	
<i>Nav 1.7-1</i>	-	+	+	+	
<i>Nav 1.7-2</i>	-	+	+	+	
<i>Kv 7.2</i>	+	+	+	+	
<i>Kv 7.3</i>	+	+	+	+	

Tabla 3: Expresión de mRNA de diferentes marcadores de nociceptores. Análisis sobre 1µg de RNA a los días de diferenciación 0, 3, 6, 8 y 9. “+” = presencia del marcador, “-“= ausencia del marcador.

Con el análisis de ARN se obtuvieron resultados positivos para la gran mayoría de marcadores estudiados una vez diferenciadas las células. Así ocurre tanto con TRPV1, como con TrkA, como con CGRP en los que no se obtiene banda en la PCR a día de diferenciación 0 mientras sí que se observa a días 3, 6, 8 y 9 (Figura 5). Todos los canales de Sodio a excepción del 1.9-1 muestran banda a los diferentes días de diferenciación pero no en la muestra sin diferenciar. En los canales de potasio analizados no ocurre lo mismo. Independientemente de si se encontraban la células diferenciados o no, siempre se obtuvo banda.

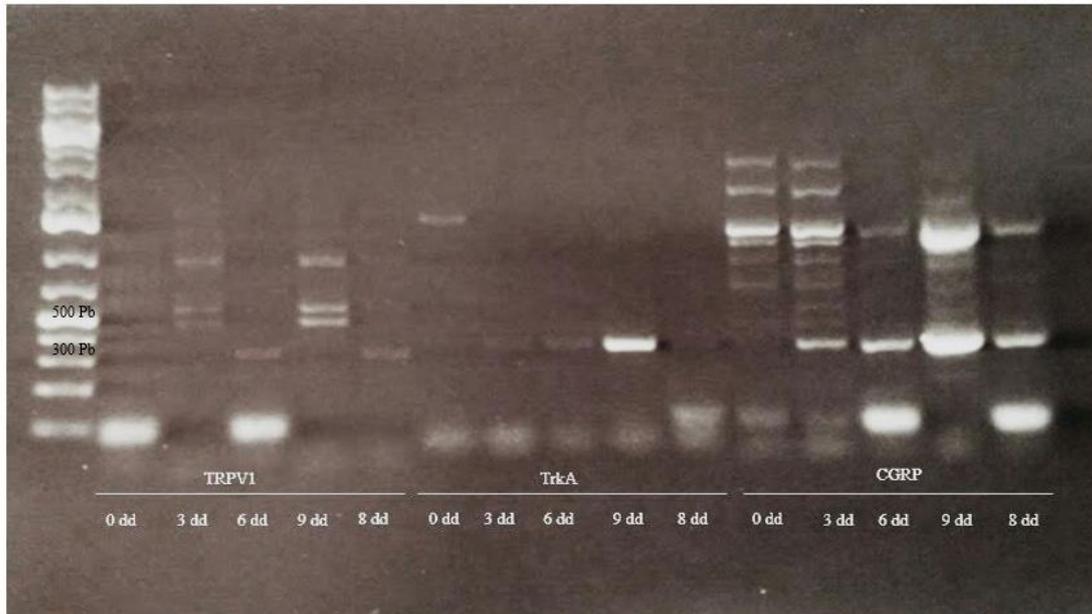


Figura 5: Expresión de marcadores de nociceptores peptidérgicos. Electroforesis de PCR realizada para TRPV1 (500pb); TrkA (348pb) y CGRP (343pb) a los días de diferenciación 0, 3, 6, 8 y 9.

Demostración de la presencia de proteína TRPV1 mediante ensayos de *Western blot*.

Los resultados obtenidos mediante *Western blot* respecto al control del anticuerpo frente a TRPV1 en células HEK transfectadas, son los descritos en la figura 6. Se observa que el anticuerpo empleado detecta proteína TRPV1 a las diferentes concentraciones propuestas (1ng, 1.5ng, 2ng, 2.5ng, 3ng, 4ng y 5ng de extracto de proteína total) ya que se observa banda en 95 kDa aproximadamente, que se corresponde con el tamaño de la proteína de TRPV1.

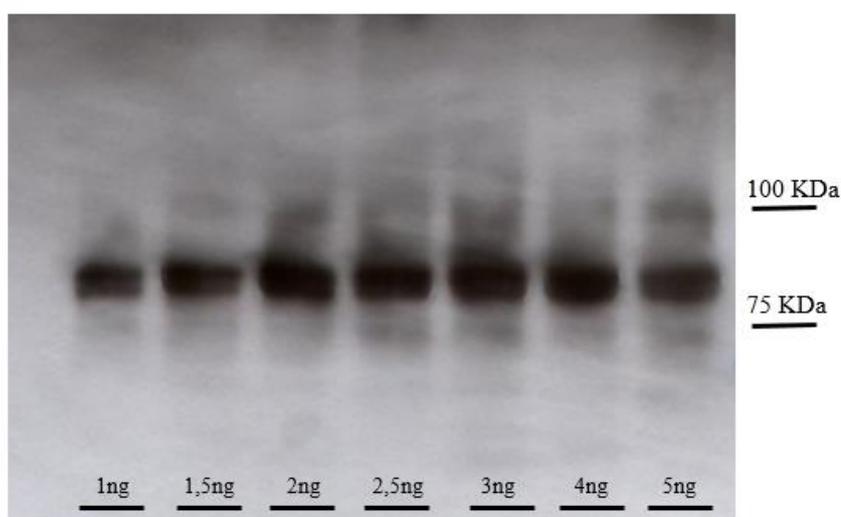


Figura 6: *Western blot* control para TRPV1. Extracto de proteína total desde células HEK transfectadas (1-5ng).

Con 5ng de extracto total de proteína cargada, existen bandas (Figura 7) a día de diferenciación 6 y 9 para TRPV1 que se encuentran a la misma altura que la banda control, de 95 KDa. Sin embargo, no obtenemos resultados en los pocillos cargados con proteínas de células sin diferenciar y tampoco con 3 días de diferenciación. En relación al control, debido a que se cargó una concentración demasiado elevada, no se obtiene una banda como tal. Además se ven bandas inespecíficas con peso inferior a 75 KDa.

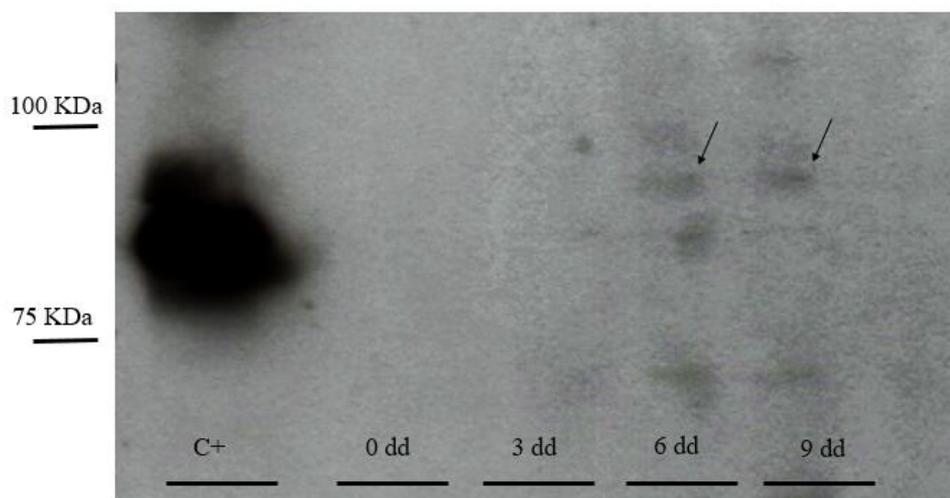


Figura 7: *Western blot* a diferentes días de diferenciación (0-9). Las flechas indican las bandas a 95 KDa a 6 y 9 días de diferenciación.

Se trató de repetir el experimento, sin embargo, debido a la falta de muestra, en todos los pocillos no se pudo cargar la misma concentración de extracto de proteína (50ng). A día de diferenciación 3 se cargó 5 ng aproximadamente de extracto total de proteína, a día de diferenciación 6 se cargó 31 ng aproximadamente de extracto total de proteína, y a día 9 de diferenciación se cargaron los 50 ng de extracto total de proteína.

Existen bandas que corresponden a 6 y 9 días de diferenciación de 95 KDa. Sin embargo, la nitidez de las mismas es demasiado baja como para poder observarlas claramente (Figura 8). En la muestra de células no diferenciadas y con tres días de diferenciación, no se observan resultados positivos.

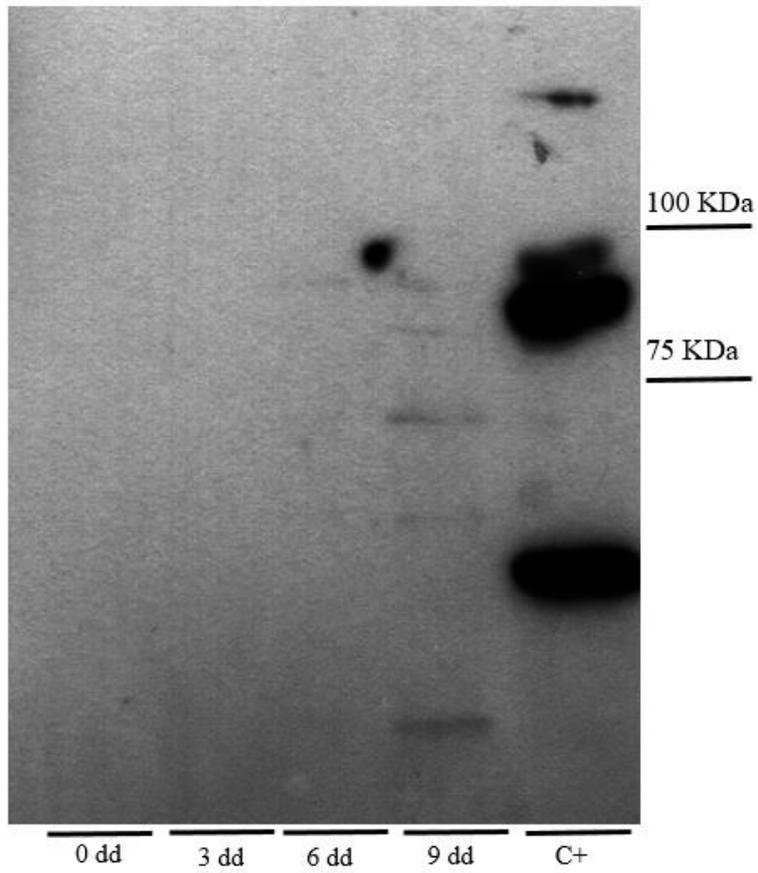


Figura 8: *Western blot* de 5-50ng de extracto de proteína cargada de muestras a diferentes días de diferenciación (0-9).

Localización de los antígenos específicos para α TRPV1 y α TrkA mediante Inmunicitoquímica (IC).

Siguiendo los pasos del protocolo ya señalado, se analizó la presencia y localización de antígenos específicos para TRPV1 y TrkA.

En las imágenes de los controles (Figura 9) de TRPV1 y de TrkA, se observa que bajo las mismas condiciones de exposición y de resolución no es posible detectar señal de fluorescencia.

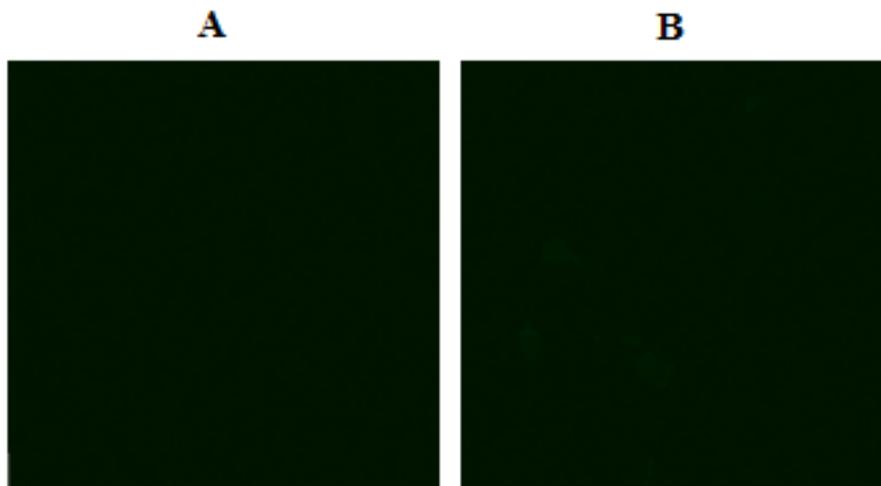


Figura 9: IC de los controles de los anticuerpos secundarios de TRPV1 (A) 1:500 y TrkA 1:200 (B).

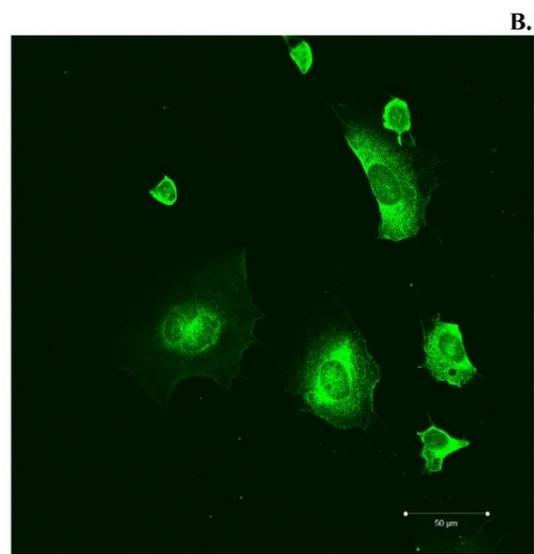
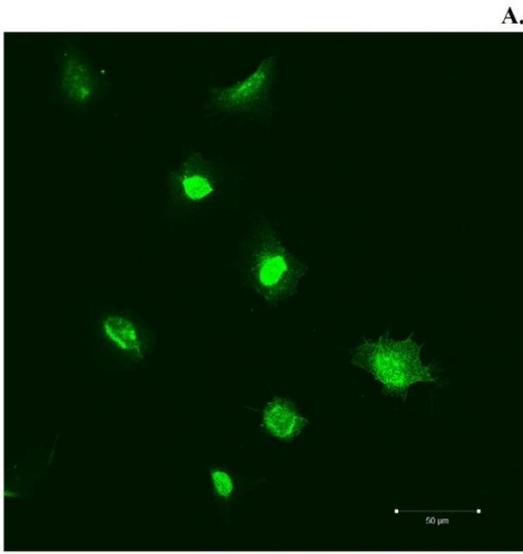
En todos los días que se han analizado para las diferentes proteínas se observa un marcaje de las células, indicativo de la presencia de dichas proteínas en las MED17.11.

Tanto para TRPV1 como para TrkA se observan diferencias en cuanto a la localización de los mismos entre las células no diferenciadas y las diferenciadas. En las células no diferenciadas, en TRPV1, el núcleo está muy cargado, con mucha fluorescencia a diferencia del citosol. Sin embargo, en TrkA es el núcleo el que presenta menor fluorescencia con respecto al citosol. En las células diferenciadas, se aprecia el axón de las neuronas marcado con fluorescencia para ambos marcadores, en cuanto a la marcación del núcleo y la membrana, se vuelve a repetir el mismo patrón expuesto anteriormente para TrkA y TRPV1.

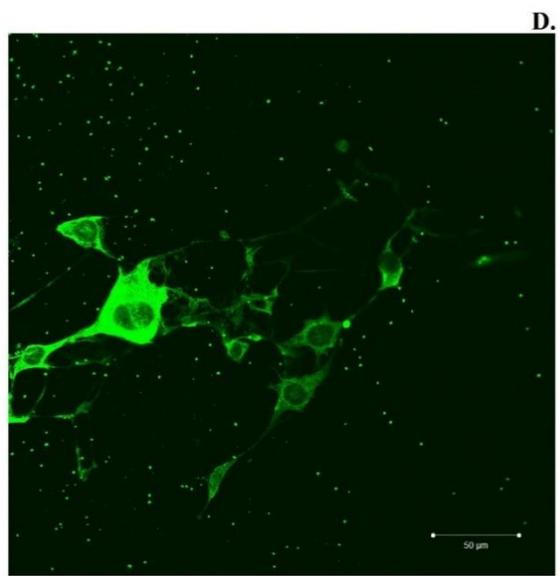
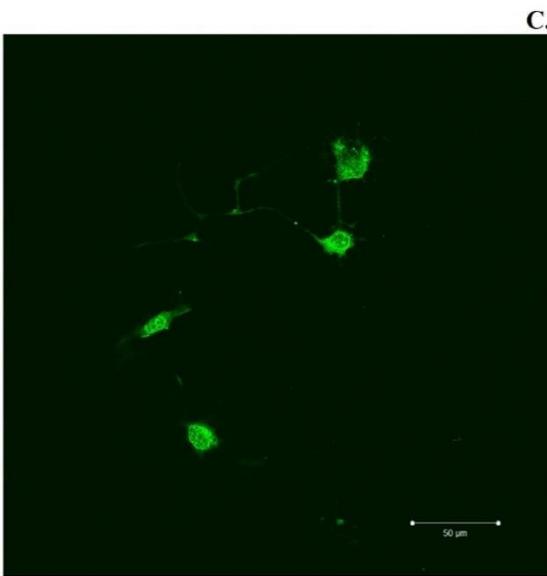
TRPV1

TrkA

0 dd



3 dd



7 dd

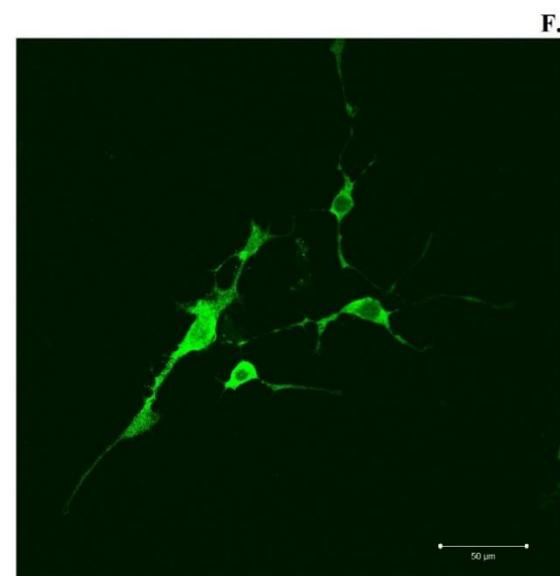
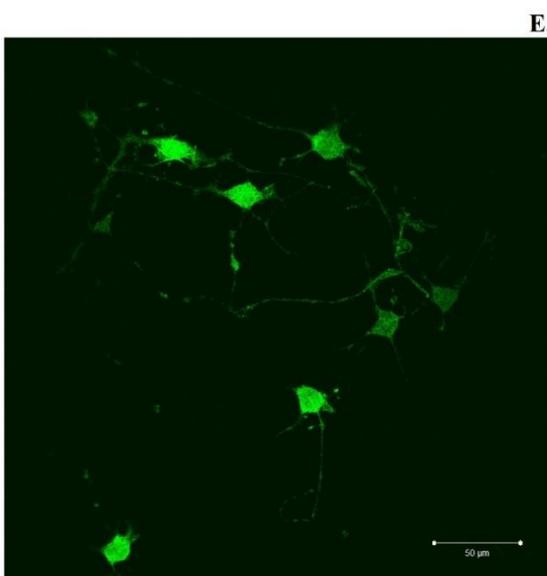


Figura 10: Inmunocitoquímica realizada en cultivos de MED17.11. A. Proteína TRPV1 a día de diferenciación 0. B. Proteína TrkA a día de diferenciación 0. C. Proteína TRPV1 a día de diferenciación 3. D. Proteína TrkA a día de diferenciación 3. E. Proteína TRPV1 a día de diferenciación 7. F. Proteína TrkA a día de diferenciación 7.

3. Respuesta funcional de la línea celular MED 17.11.

Para poder observar el funcionamiento del canal TRPV1 se utilizó la microfluorimetría de imágenes de calcio. Los protocolos que se utilizaron se fueron modificando en función de los resultados obtenidos.

Se iniciaron los experimentos con imagen de Ca^{2+} aplicando un protocolo base de dos pulsos de capsaicina ($10 \mu M$) y un último pulso de cloruro potásico ($40 mM$) como 100% de respuesta. La perfusión se mantenía continua utilizando como base el Buffer HBSS 1x dejando el tiempo suficiente para observar alguna respuesta.

En la figura 12 B podemos observar que, a los diferentes días de diferenciación planteados no aparece aumento de fluorescencia frente a los pulsos de capsaicina, solo ruido de fondo.

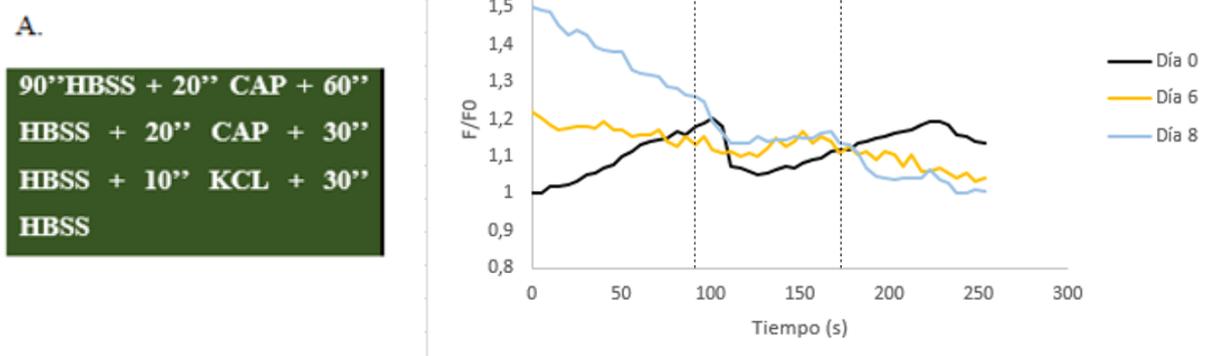


Figura 12: Imágenes de calcio en la línea celular MED17.11. A: Protocolo seguido durante el experimento aplicando dos pulsos de capsaicina de 20 segundos cada uno y un pulso de KCl de 10 segundos. CAP: capsaicina. KCl: cloruro potásico. B: Resultados obtenidos en muestras de día de diferenciación "0" (negro), a día de diferenciación "6" (amarillo), y a día de diferenciación 8 (azul). Las líneas verticales discontinuas corresponden con los pulsos de Capsaicina ($10 \mu M$). $n=5$.

El segundo estudio que se realizó fue con la misma línea celular, MED 17.11, pero siguiendo un protocolo de actuación distinto con dos pulsos de cloruro potásico (40 mM) y uno de ionomicina (10 μ M) como 100% de respuesta.

No se observa respuesta (Figura 13B) por parte de las células a la aplicación de ninguno de los dos estímulos de KCl (40mM). Mientras que las células no diferenciadas no alteran su patrón de fluorescencia en ningún momento, las células diferenciadas a día 6 muestran una variación en la fluorescencia no relacionada con la aplicación del KCl si no que parece más relacionado con errores inherentes al procedimiento provocados por la propia perfusión.

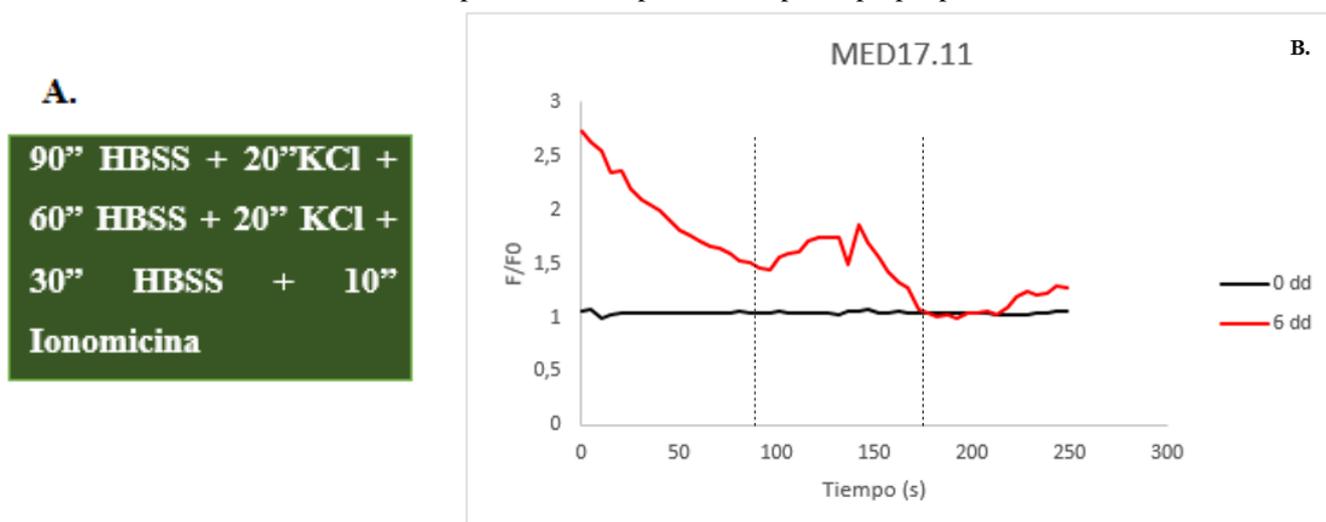


Figura 13: Imágenes de calcio en la línea celular MED17.11. A. Protocolo seguido durante el experimento aplicando dos pulsos de KCl (40mM) de 20 segundos cada uno y un pulso de Ionomicina (10 μ M). B. Resultados obtenidos en muestras de día de diferenciación "0" (negro) y a día de diferenciación "6" (rojo). Las líneas verticales discontinuas corresponden con los pulsos de KCl. n= 4.

Por último, se hizo un tercer protocolo que unía a los dos anteriores con dos pulsos de capsaicina (10 μ M) en primer lugar, otros dos de cloruro potásico (40 mM) y por último uno de Ionomicina (10 μ M).

En la figura 14 B, no se observan cambios en la respuesta de las células MED17.11 a la aplicación de ninguno de los estímulos. Tanto las células diferenciadas como las no diferenciadas no presentan ningún cambio en cuanto al patrón de fluorescencia. Sólo hay ruido de fondo.

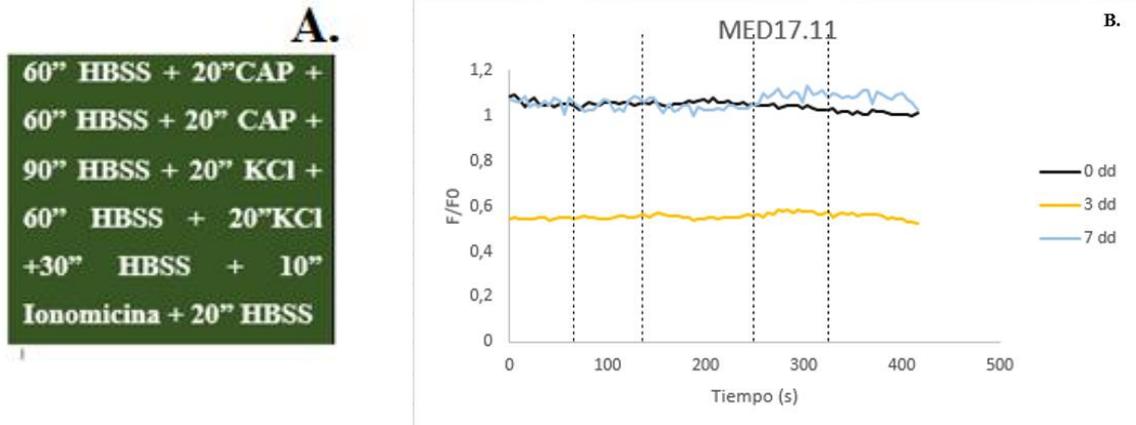


Figura 14: Imágenes de calcio en la línea celular MED17.11. A. Protocolo seguido durante el experimento aplicando dos pulsos de capsaicina ($40 \mu\text{M}$) de 20 segundos cada uno, otros dos pulsos de KCl (40mM) y un último pulso de Ionomicina ($10 \mu\text{M}$). B. Resultados obtenidos en muestras de día de diferenciación "0" (negro), a día de diferenciación "3" (amarillo) y a día de diferenciación 7 (azul). Las líneas verticales discontinuas corresponden con los pulsos de Capsaicina y KCl. $n=13$.

Discusión

En este estudio se ha intentado obtener nociceptores a partir de la línea celular MED17.11. Con el fin de comprobar que los protocolos para la diferenciación eran los correctos, se realizaron diferentes experimentos. Se analizó tanto la expresión de los marcadores neuronales y nociceptores como la funcionalidad de los mismos.

En cuanto a la morfología, se observan cambios de las células diferenciadas a las no diferenciadas, pero también se aprecia diversidad morfológica en las distintas fases. Esto sugiere que aunque sea de carácter morfológico sí que se produce una diferenciación ya que la mayoría de las diferenciadas recuerdan a las neuronas DRG maduras. Sin embargo, que no se encuentre el mismo tipo celular podría explicar los resultados negativos en funcionalidad y la baja expresión obtenida. Podría ser que la diferenciación haya sido incorrecta y que por ello no encontremos sólo un tipo celular sino varios subtipos de posibles neuronas inmaduras.

Además, también se observa un aumento considerable en cuanto a número de células según el paso de los días de diferenciación, esto no debería ocurrir debido a que las neuronas maduras no siguen dividiéndose²⁸. De esta forma se explicaría que no exista funcionalidad debido a que siguen siendo inmaduras y también que podamos ser capaces de obtener más extracto en las muestras a día de diferenciación 6 y 9 y no a 0 y 3 en los resultados de *Western blot*.

Los resultados obtenidos en los ensayos de RT-PCR para el marcador 1.7 son los que se presentan para la línea celular MED17.11²⁸. Esto se explicaría por la expresión del mismo en nociceptores durante episodios de dolor agudo e inflamación⁹. Por ello se obtienen resultados positivos en los diferentes días de diferenciación para este marcador. Con lo que respecta a Nav 1.9, su expresión se puede ver aumentada en la última fase del proceso embrionario²⁸, además de que también aumenta en procesos de inflamación¹¹. Esto explicaría que en Nav1.9-1 se observe banda a día de diferenciación cero donde la neurona no está madura. El no expresarse banda a días de diferenciación cero y tres en Nav 1.9-2 puede ser debido a que a día tres no haya madurado del todo la célula como para poder expresarlo y que tanto a día 6 como a día 9 la maduración de la misma sea la óptima como para poder hacerlo. Por último los Nav1.8, muestran expresión de ARNm para todos los días de diferenciación contradiciendo así los resultados expuestos en otros artículos²⁸ donde no se encuentra expresión a ningún día de diferenciación debido a que se encuentran déficits de Nav 1.8 en procesos inflamatorios y de dolor¹⁰. Esto podría deberse a un fallo en la diferenciación, es decir, las células podrían no haberse diferenciado del todo o encontrarse en un estado de diferenciación previo al estado maduro, como precursores.

Por otra parte, los estudios de análisis de ARN demostraron que las células no diferenciadas o de día de diferenciación cero, no expresaban los marcadores de diferenciación CGRP o TrkA ni tampoco el canal TRPV1. Sin embargo, sí que lo hacían una vez diferenciadas. Sugiriendo una buena diferenciación. Estos marcadores fueron elegidos debido a que, por ejemplo, en el caso de CGRP se ha demostrado que están presentes en nociceptores peptidérgicos²³ y además es a través de TrkA por donde se produce la transducción de la señal del dolor^{24,25}.

La expresión del ARNm no necesariamente implica la traducción a proteína o que ésta sea funcional es por ello que se decidió analizar la expresión de TRPV1 tanto por *Western blot* como por inmunocitoquímica.

En *Western blot* se observó que con poca carga de extracto total se obtenía banda de 95KDa correspondientes a TRPV1. Sin embargo, la intensidad de las mismas era demasiado tenue. Esto podría deberse a que la concentración de la proteína era demasiado pequeña con lo que sería necesario cargar más cantidad de extracto total de proteína. Aumentando la concentración del extracto de proteína continuamos sin observar una banda definida. Esto podría deberse a que hay falta de muestra, ya que no en todos los pocillos/ días de diferenciación no se pudo cargar la cantidad de 50ng del extracto total.

No obstante, en IC se observa que TRPV1 se encuentra presente. Esto sugiere que la proteína en cuestión se encuentra en la célula pero tal vez no a niveles funcionales. Por otra parte, a día de diferenciación cero se encuentran tanto para TRPV1 como para TrkA la existencia de dichos marcadores en las células. Estos resultados son contradictorios con los de ARNm. Esto podría deberse a posibles fallos en la técnica de IC debido quizá al marcaje con anticuerpo primario.

A pesar de observar TRPV1 tanto en células diferenciadas como en no diferenciadas en inmunocitoquímica, no se observa la misma respuesta en microfluorografía de calcio a perfusiones de Capsaicina ni KCl. Con ninguno de los distintos protocolos seguidos hemos obtenido respuesta funcional de los canales. No detectamos respuesta a capsaicina, específica de TRPV1, pero tampoco a cloruro potásico tal y como esperaríamos en cualquier neurona con potencial de acción²⁸. Estos resultados nos sugieren de nuevo que la proteína en cuestión (TRPV1) no es funcional.

En resumen, con los experimentos realizados hemos obtenido niveles de ARNm y una mínima expresión de proteína del marcador neuronal TRPV1, además de niveles de ARNm de otros marcadores como CGRP, TrkA, canales de sodio y de potasio importantes para la diferenciación a neuronas. No obstante y tras observar cambios en la morfología de las células que hacían pensar que estaban diferenciándose a neuronas debido a su gran parecido con las

neuronas DRG, observamos que estas proteínas se podrían estar localizando en el interior de la neurona y no en la membrana. Por ello, cuando se hicieron los ensayos de funcionalidad no observamos respuesta. Estos resultados sugieren que el protocolo de diferenciación debería modificarse, una posible solución sería hacer más lavados de interferón ya que éste factor ayuda a la división celular. Además también podrían aumentarse las concentraciones de NGF y GDNF que contribuyen a la diferenciación de nociceptores³¹.

Conclusión y proyecciones futuras

El trabajo se ha basado en la reproducción de la diferenciación a nociceptores de la línea celular MED 17.11²⁸. Se observaron diferencias morfológicas de las células no diferenciadas con respecto a las diferenciadas. Los marcadores fueron identificados mediante técnicas de RT-PCR y *Western blot*, así como mediante inmunocitoquímica. También se comprobó la funcionalidad de TRPV1 frente a pulsos de capsaicina y cloruro potásico. Finalmente, las conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son:

1. Se produce diferenciación celular a nivel morfológico en las células tratadas con el medio de diferenciación con respecto a las no diferenciadas.
2. Se observan los marcadores TRPV1, TrkA y CGRP en las células diferenciadas. Además de en Nav y Kv a nivel de ARNm y de TRPV1 y TrkA en IC.
3. Sin embargo, no se observa respuesta a pulsos de capsaicina ni a cloruro potásico, indicando que estos canales no son funcionales.

A pesar de que los ensayos de *Western blot* muestren bandas que hacen indicar que se encuentra la proteína TRPV1 éstas son demasiado tenues. Sería necesario que se realizaran más ensayos con diferentes concentraciones de extracto de proteína para poder esclarecer mejor los resultados.

Los diferentes tipos morfológicos observados en los distintos días de diferenciación hacen indicar que ésta no se produce de forma adecuada, corroborándose esto con los resultados obtenidos en funcionalidad. Cabe pensar que ajustando los parámetros del protocolo de diferenciación, por ejemplo aumentando el periodo de lavado con interferón, o aumentando las concentraciones de determinados factores como el GDNF y NFG se consiga una mayor población de nociceptores capaces de responder correctamente.

Referencias

1. Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Devesa I, et al. New strategies to develop novel pain therapies: addressing thermoreceptors from different points of view. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2011;5(1):16-48.
2. Gascon E, Moqrich A. Heterogeneity in primary nociceptive neurons: from molecules to pathology. *Arch Pharm Res*. 2010;33(10):1489-1507.
3. Swieboda P, Filip R, Prystupa A, et al. Assessment of pain: types, mechanism and treatment. *Ann Agric Environ Med*. 2013;Spec no. 1:2-7.
4. Mardy S, Miura Y, Endo F, et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): effect of TRKA (NTRK1) missense mutations on autophosphorylation of the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Hum Mol Genet*. 2001;10(3):179-188.
5. Frias B, Merighi A. Capsaicin, Nociception and Pain. *Molecules*. 2016;21(6).
6. Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*. 2007;55(3):353-364.
7. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010;120(11):3760-3772.
8. Lee Y, Lee CH, Oh U. Painful channels in sensory neurons. *Mol Cells*. 2005;20(3):315-324.
9. Toledo-Aral JJ, Moss BL, He ZJ, et al. Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(4):1527-1532.
10. Akopian AN, Okuse K, Souslova V, et al. Trans-splicing of a voltage-gated sodium channel is regulated by nerve growth factor. *FEBS Lett*. 1999;445(1):177-182.
11. Leo S, D'Hooge R, Meert T. Exploring the role of nociceptor-specific sodium channels in pain transmission using Nav1.8 and Nav1.9 knockout mice. *Behav Brain Res*. 2010;208(1):149-157.
12. Battefeld A, Tran BT, Gavrilis J, et al. Heteromeric Kv7.2/7.3 channels differentially regulate action potential initiation and conduction in neocortical myelinated axons. *J Neurosci*. 2014;34(10):3719-3732.
13. Satheesh NJ, Uehara Y, Fedotova J, et al. TRPV currents and their role in the nociception and neuroplasticity. *Neuropeptides*. 2016;57:1-8.
14. Carnevale V, Rohacs T. TRPV1: A Target for Rational Drug Design. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016;9(3).
15. Wang H, Siemens J. TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. *Temperature (Austin)*. 2015;2(2):178-187.

16. Yue Z, Xie J, Yu AS, et al. Role of TRP channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;308(3):H157-182.
17. Yoo S, Lim JY, Hwang SW. Sensory TRP channel interactions with endogenous lipids and their biological outcomes. *Molecules*. 2014;19(4):4708-4744.
18. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-824.
19. Levine JD, Alessandri-Haber N. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(8):989-1003.
20. Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch*. 2005;451(1):143-150.
21. Hudson AS, Kunstetter AC, Damasceno WC, et al. Involvement of the TRPV1 channel in the modulation of spontaneous locomotor activity, physical performance and physical exercise-induced physiological responses. *Braz J Med Biol Res*. 2016;49(6):e5183.
22. Devesa I, Ferrandiz-Huertas C, Mathivanan S, et al. alphaCGRP is essential for algescic exocytotic mobilization of TRPV1 channels in peptidergic nociceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(51):18345-18350.
23. Stucky NL, Gregory E, Winter MK, et al. Sex differences in behavior and expression of CGRP-related genes in a rodent model of chronic migraine. *Headache*. 2011;51(5):674-692.
24. Lorigados-Pedre L, Bergado-Rosado J. [Nerve growth factor in neurodegeneration and neurorestorative therapy]. *Rev Neurol*. 2004;38(10):957-971.
25. Hirose M, Kuroda Y, Murata E. NGF/TrkA Signaling as a Therapeutic Target for Pain. *Pain Pract*. 2016;16(2):175-182.
26. Coelho A, Wolf-Johnston AS, Shinde S, et al. Urinary bladder inflammation induces changes in urothelial nerve growth factor and TRPV1 channels. *Br J Pharmacol*. 2015;172(7):1691-1699.
27. Vetter I, Lewis RJ. Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines. *Biochem Pharmacol*. 2010;79(6):908-920.
28. Doran C, Chetrit J, Holley MC, et al. Mouse DRG Cell Line with Properties of Nociceptors. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128670.
29. Young GT, Gutteridge A, Fox HD, et al. 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.
30. Chambers SM, Qi Y, Mica Y, et al. Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nat Biotechnol*. 2012;30(7):715-720.
31. Mizumura K, Murase S. Role of nerve growth factor in pain. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;227:57-77.

