

HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DEL DOLOR



MAITE ARTERO MORALES

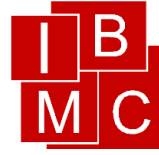
Tesis doctoral

Director: Antonio Ferrer Montiel

Programa de Doctorado en Biología Molecular y
Celular

Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC)

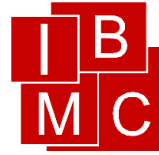
Universidad Miguel Hernández



El presente trabajo es presentado junto con el artículo:

Artero-Morales, M., González-Rodríguez, S., and Ferrer-Montiel, A. (2018). TRP Channels as Potential Targets for Sex-Related Differences in Migraine Pain. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5

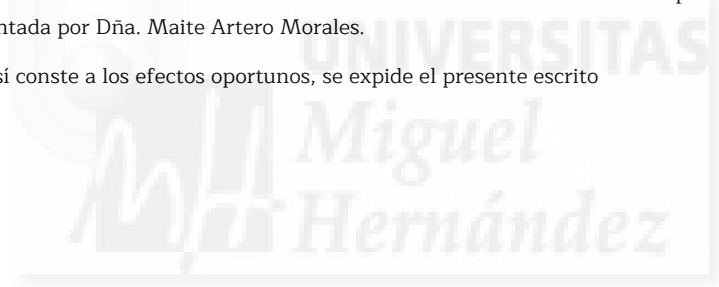
empleado como indicio de calidad para la presentación de la tesis doctoral y cumpliendo así con la normativa del RD99/2011 y en la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández.



Dr. Ricardo Mallavia Marin, Catedrático y Coordinador del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

DA SU CONFORMIDAD a la lectura de tesis doctoral titulada: “Herramientas para el estudio del dolor”, presentada por Dña. Maite Artero Morales.

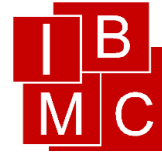
Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente escrito



Elche, Octubre 2018

Fdo: Dr. Ricardo Mallavia Marin

Catedrático Universidad Miguel Hernández



Dr. Antonio Ferrer Montiel, Catedrático de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

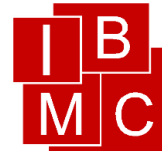
CERTIFICA que el trabajo de investigación que lleva por título “Herramientas para el estudio del dolor”, presentado por Dña. Maite Artero Morales para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Considerando que la presente tesis se halla concluida, **AUTORIZA** su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente escrito.

Elche, Octubre 2018

Fdo: Dr. Antonio Ferrer Montiel

Catedrático Universidad Miguel Hernández



El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC), de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Maite Artero Morales ha sido beneficiaria de una ayuda para contratos predoctorales para la formación de Doctores con referencia BES-2013-063227 del Ministerio de Economía y Competitividad.

Este trabajo se ha desarrollado gracias a la financiación procedente del Ministerio de Economía y Competitividad y de la Generalitat Valenciana.





La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores.

Ruy Pérez Tamayo

No temas a las dificultades, lo mejor surge de ellas.

Rita Levi-Montalcini

ÍNDICE

Índice de Figuras y Tablas	III
Listado de Abreviaturas y Acrónimos	V
Resumen	IX
Summary	XI
INTRODUCCIÓN	13
Dolor	15
La importancia del dolor	16
Clasificación del dolor	17
Nocicepción y nociceptores	18
Desarrollo de los nociceptores	20
Receptores de potencial transitorio (TRP) en la nocicepción	23
TRPV1	26
Modelos animales	28
CRISPR-Cas9	31
Modelos celulares	33
OBJETIVOS	37
RESULTADOS	41
Modelo animal YFP-TRPV1	43
Obtención y análisis de clones recombinantes	43
Generación de quimeras, heterocigotos y homocigotos YFP-TRPV1	47
Caracterización y análisis de la generación F1/N1-2	50
CRISPR-Cas9	55
Modelo celular MED17.11	61
Diferenciación de la línea celular MED17.11 siguiendo el protocolo de (Doran et al., 2015).	61
Análisis del envejecimiento celular de las MED17.11	72
Modificaciones al protocolo de diferenciación de (Doran et al., 2015).	77
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	101
MATERIALES Y MÉTODOS	105
Animales y líneas celulares	107
Plásmidos	109
Creación del modelo animal	109
Vector de recombinación pKO-YFPTRPV1	109

Recombinación homóloga	110
Identificación del clon recombinante	111
Generación de los ratones quimera	114
Inmunocitoquímica (ICC)	116
Extracción de ARN y retro-transcripción (RT)	117
PCR semicuantitativa y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	118
Western Blot	120
Imagen de Calcio	121
CRISPR-Cas9	122
Selección de secuencias diana	122
Test <i>in vitro</i>	123
Generación de vectores	123
Comprobación de efectividad del sistema CRISPR/Cas9 en línea celular.	125
Análisis estadísticos	125
BIBLIOGRAFÍA	127
ANEXO I	149
ANEXO II (Indicio de calidad)	167
Agradecimientos	183



Índice de Figuras y Tablas

Figura 1.	16	Tabla 1.	48
Figura 2.	19	Tabla 2.	56
Figura 3.	21	Tabla 3.	71
Figura 4.	25	Tabla 4.	77
Figura 5.	27	Tabla 5.	111
Figura 6.	32	Tabla 6.	113
Figura 7.	44	Tabla 7.	115
Figura 8.	46	Tabla 8.	117
Figura 9.	49	Tabla 9.	119
Figura 10.	51	Tabla 10.	123
Figura 11.	52		
Figura 12.	53	Tabla I.	151
Figura 13.	57	Tabla II.	153
Figura 14.	59		
Figura 15.	61		
Figura 16.	62		
Figura 17.	63		
Figura 18.	65		
Figura 19.	66		
Figura 20.	68		
Figura 21.	69		
Figura 22.	70		
Figura 23.	72		
Figura 24.	74		
Figura 25.	76		
Figura 26.	78		
Figura 27.	79		
Figura 28.	80		
Figura 29.	81		
Figura 30.	82		
Figura 31.	83		
Figura 32.	84		
Figura 33.	110		
Figura I.	166		

Listado de Abreviaturas y Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AmpR	Resistencia a la Ampicilina
ANOVA	Análisis de la varianza
AraC	Arabinósido de citosina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNsg	Ácido ribonucleico guía
ASIC	Canal iónico sensible a ácido
ATP	Adenosin-5'-trifosfato o Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BMP	Proteína morfogénica ósea
BMP4	Proteína morfogénica ósea 4
Brn3a	Factor de transcripción de dominio POU, clase 4
BSA	Albumina de suero bovino
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
Caps	Capsaicina
Cav	Canal de calcio dependiente de voltaje
CBATEG	Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica
CEE	Extracto de embrión de pollo
CFP	Proteína fluorescente azul
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
dFUR	5'-desoxi-5-fluorouridina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DRG	Ganglio de la Raíz Dorsal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ES	Células embrionarias madre
F1	Generación cruce entre quimera y B6

Listado de Abreviaturas y Acrónimos

F1'	Generación cruce entre heterocigotos N2
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
Fluo4 AM	Éster de acetoximetilo Fluo-4
GAFP	Proteína fibrilar acidica de la glia
GCaMP	Indicador de calcio genéticamente modificado
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFP	Proteína fluorescente verde
HR	Recombinación homóloga
IB4	Isolectina B4
ICC	Inmunocitoquímica
IFN- γ	Interferón Gamma
ips cells	Células pluripotenciales inducibles
Islet1	Factor de transcripción del tipo homeodominio LIM
LB	Medio Luria Bertani
MED17.11	Línea celular acrónimo de DRG embrionaria de ratón
N1 / 2	Generación cruce entre F1 heterocigoto y FLPo-10
NCC	Células de la cresta neural
ND	MED17.11 no diferenciadas
NDA	MED17.11 no diferenciadas antiguas
NDj	MED17.11 no diferenciadas jóvenes
NeoR	Resistencia a la Neomicina
NGF	Factor de crecimiento nervioso
Ngn1	Neurogenina 1 o factor de transcripción proneural
Ngn2	Neurogenina 2
NGS	Suero normal de cabra
NHEJ	Non-Homologus End Joining
o/n	Toda la noche
P/S	Penicilina /estreptomycin
P2rx3	Receptor purinérgico P2x3
PAM	Secuencia de motivo adyacente protoespaciadora
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino

Listado de Abreviaturas y Acrónimos

PBS-T	Tampón fosfato salino con Tween 20 al 0.05 %
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PKA	Fosfoquinasa A
PKC	Fosfoquinasa C
PurR	Resistencia a la Puomicina
qPCR	PCR cuantitativa
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
ROI	Región de interés
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
Runx1	Factor de transcripción de genes relacionados con Runt
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido
SP	Sustancia P
SPF	Libre de patógenos específicos
Ta	Temperatura ambiente
TALEN	Nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción
TG	Ganglio del trigémino
TrkA	Receptor de la tropomiosina quinasa o receptor de NGF
TRP	Receptor de potencial transitorio
TRPA1	Receptor de potencial transitorio anquirina 1
TRPM8	Receptor de potencial transitorio melastatina 8
TRPV1	Receptor de potencial transitorio vanilide 1
v/v	Volumen por volumen
wt	Alelo o tipo silvestre
YFP	Proteína fluorescente amarilla
ZFN	Nucleasas con dedos de zinc
α GFP	Anticuerpo contra GFP
α V1	Anticuerpo contra TRPV1

Resumen

El dolor es una de las principales patologías del ser humano cuyo tratamiento, en determinadas condiciones, todavía resulta limitado o ineficaz. La percepción del dolor es el resultado de un complejo procesamiento de señales moleculares y bioquímicas en los diferentes niveles del sistema nervioso. La identificación de diferentes proteínas, canales iónicos y receptores, implicados en la conversión de las señales nocivas a potenciales de acción (transducción), ha permitido establecer nuevas dianas terapéuticas para el control del dolor. Entre los canales iónicos responsables de la transducción, destacan algunos miembros de la familia de receptores de potencial transitorio (TRP). Sin embargo, la caracterización de estas dianas ha derivado en un aún restringido número de nuevas terapias analgésicas. La necesidad de ahondar en los mecanismos de regulación de estos canales iónicos para un desarrollo de terapias más eficientes se encuentra con distintos impedimentos instrumentales y metodológicos. Por ejemplo, la falta de sistemas *in vitro* provoca la dependencia de cultivos celulares primarios. Además, la alta heterogeneidad en las neuronas sensoriales periféricas supone un factor limitante para entender los mecanismos bioquímicos, moleculares y celulares implicados en la sensibilización de los nociceptores por los diferentes compuestos algésicos. En este trabajo se han intentado crear nuevas herramientas *in vivo* e *in vitro* que permitan investigar de forma precisa los mecanismos de sensibilización, potenciación, cronificación y/o respuesta a las terapias analgésicas. Dichas herramientas se corresponden, por un lado, con la generación de un modelo animal transgénico que exprese el canal iónico TRPV1 ligado a la proteína fluorescente amarilla (YFP) por el N-terminal del canal. Por otro lado, se ha trabajado en el desarrollo de un modelo celular que permita la obtención de nociceptores *in vitro*. Se trató de acelerar el desarrollo de ambas herramientas con la implementación del sistema de modificación genética CRISPR/Cas9. Para la generación del modelo animal se llevó a cabo la modificación por recombinación homóloga de células madre microinyectadas en blastocistos. La caracterización de la generación heterocigota se llevó a cabo ante la carencia de una generación homocigota para YFP-TRPV1. Sin embargo, la generación heterocigota no permitió confirmar la expresión de la YFP-TRPV1 ni a través de PCRs en los análisis de transcritos, ni a través de Western Blot e Inmunocitoquímica en los análisis de expresión de proteína. Los resultados obtenidos muestran la necesidad de continuar investigando el papel de TRPV1 en el desarrollo animal, así como la regulación de su expresión génica, la función de los distintos reordenamientos y las modificaciones post transcripcionales que se producen en el canal y que pudieran estar afectando a la creación del modelo homocigoto. La implementación del uso de nuevas herramientas de modificación genética, tales como CRISPR/Cas9 se llevó a cabo para solventar los problemas de generación del modelo animal. En esta tesis se demuestra cómo, al menos en línea celular, es posible la introducción de una proteína fluorescente en el C-terminal de TRPM8 con la transfección de 2 plásmidos y la selección de clones en un periodo relativamente corto de tiempo. En este sentido, la tecnología CRISPR desarrollada hace viable la generación de un modelo celular con las mismas alteraciones que las planteadas para el modelo animal. Para el desarrollo del modelo celular se partió de la línea celular MED17.11, potencialmente diferenciable a nociceptores adultos. En este trabajo se pone en cuestión, por contra, el uso de esta línea celular como modelo *in vitro* en la investigación del dolor. A pesar de los cambios morfológicos observados con los diferentes protocolos de diferenciación llevados a cabo, la línea celular carecía de la expresión de marcadores neuronales maduros así como una casi completa falta de respuesta a estímulos inductores de potenciales de acción. Los resultados obtenidos concluyen que esta línea celular podría ser usada en estudios exclusivamente de neurogénesis.

Summary

Pain is one of the main pathologies in humans, but its treatment, under certain conditions, is still limited or ineffective. The perception of pain is the result of a complex processing of molecular and biochemical signals at different levels of the nervous system. The identification of different proteins, ion channels and receptors, involved in the conversion of harmful signals to action potentials (transduction), has made it possible to establish new therapeutic targets. Among the ion channels responsible for transduction, some members of the transient potential receptors (TRP) family stand out. However, the characterization of these targets has led to a still limited number of new analgesic therapies. However, the need to delve into the mechanisms of regulation of these ion channels for the development of more efficient therapies has different instrumental and methodological restrictions. For example, the lack of *in vitro* systems leads to dependence on primary cell cultures. Furthermore, the high heterogeneity in peripheral sensory neurons is a limiting factor in understanding the biochemical, molecular and cellular mechanisms involved in the sensitization of nociceptors by different algesic compounds. In this work, we have tried to create new *in vivo* and *in vitro* tools that allow us to investigate in a precise way the mechanisms of sensitization, potentiation, chronification and/or response to analgesic therapy. These tools correspond, on the one hand, to the generation of a transgenic animal model, which expresses the TRPV1 ion channel linked to the yellow fluorescent protein (YFP) by the N-terminal of the channel. On the other hand, work has been done on the development of a cellular model that allows obtaining *in vitro* nociceptors. The development of both tools was accelerated with the implementation of the CRISPR / Cas9 system. For the generation of the animal model, the modification was carried out by homologous recombination of microinjected stem cells in blastocysts. The characterization of the heterozygote generation was realised in the absence of a homozygote generation for YFP-TRPV1. However, the heterozygous generation did not confirm the expression of YFP-TRPV1 either through PCRs in transcripts analysis, or through Western Blot and Immunocytochemistry in protein expression analysis. The results obtained point out the need to continue investigating the role of TRPV1 in animal development, as well as the regulation of its gene expression, the function of the different rearrangements and the post-transcriptional modifications that occur in the channel and that could be affecting to the creation of the homozygous model. The use of new tools for genetic modification, such as CRISPR / Cas9, was performed to solve the problems of animal model generation. This thesis demonstrates how, at least on the cell line, it is possible to introduce a fluorescent protein in the C-terminus of TRPM8 with the transfection of two plasmids and the selection of clones in a relatively short period. In this sense, the CRISPR technology developed makes viable the generation of a cellular model with the same alterations as those proposed for the animal model. For the development of the cellular model, was used the cell line MED17.11, which is potentially differentiable to adult nociceptors. Nevertheless, the use of this cell line as an *in vitro* model in pain research is questioned. Despite of the morphological changes observed with the different differentiation protocols applied, the cell line lacked the expression of mature neuronal markers and an almost complete lack of response to stimuli. The results obtained conclude that this cell line could be used in studies exclusively of neurogenesis.

INTRODUCCIÓN



Dolor

El dolor se corresponde con la afección médica más antigua y universal de toda la humanidad. Desde su concepción sobrenatural y mística por las poblaciones prehistóricas a los mecanismos moleculares, celulares y sistémicos que hoy día conocemos el término dolor ha evolucionado y cambiado enormemente (Bonica, 1991; Perl, 2007; Turk and Okifuji, 2009). Actualmente, la definición más aceptada de dolor es la dada por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, del inglés *International Association for the Study of Pain*). En ella el dolor se define como << una experiencia sensorial o emocional desagradable asociada a un daño real o potencial en un tejido, o descrito en términos de dicho daño>> (Merskey and Bogduk, 1994).

A pesar de que las primeras referencias escritas tanto en oriente como occidente datan de hace más de 3000 años, la investigación del dolor y los mayores avances científicos en el campo tienen apenas 250 años de desarrollo (Chen, 2011; Chen et al., 2013). Antes del siglo XIX, las vinculaciones del dolor con el cerebro resultan escasas. Destacan los escritos de Galeno (130-200 d.C.), firme defensor de que el dolor se originaba en el cerebro o Avicenna, médico persa del siglo XI, considerado el primero en establecer el dolor como una entidad sensorial única e independiente del tacto. Es en el Renacimiento cuando la visión aristotélica del corazón como centro del raciocinio y la percepción es desbancada y nuevas corrientes filosóficas comienzan a establecerse. A mediados del siglo XVII el filósofo Descartes (1596-1650) es el primero en esbozar la vía de transmisión del dolor a través del sistema nervioso (Figura 1). Sin embargo, es a partir de 1800 cuando, junto con el desarrollo de las ciencias experimentales, el concepto actual de dolor ha tomado forma (Chen, 2011). Gracias, de una parte, a los estudios de anatomía y de electrofisiología que a lo largo del siglo XIX describieron, por ejemplo, las distintas fibras nerviosas aferentes, la generación de los potenciales de acción o disociaron las estructuras implicadas en la percepción del tacto y del dolor. De otra parte, ya en el siglo XX, los estudios moleculares o de imagen permitieron la identificación de los receptores opioides, del canal iónico transductor de señales nocivas TRPV1 o los estudios de las estructuras cerebrales involucradas en el reconocimiento del dolor, entre otros hitos (Chen, 2011; Keele, 1957; Perl, 2007; Rey, 1995). Todo ello ha permitido perfilar cómo un estímulo nocivo externo o interno es traducido al lenguaje del sistema nervioso, el potencial de acción, por las neuronas sensoriales periféricas a través de canales iónicos y receptores. Esta señal eléctrica es conducida hasta la médula espinal por vías aferentes, donde neuronas intermedias pueden favorecer o silenciar la comunicación hacia el cerebro. Ya en el sistema nervioso central, la información recibida es procesada para dar una respuesta, generalmente de protección (Figura 1).

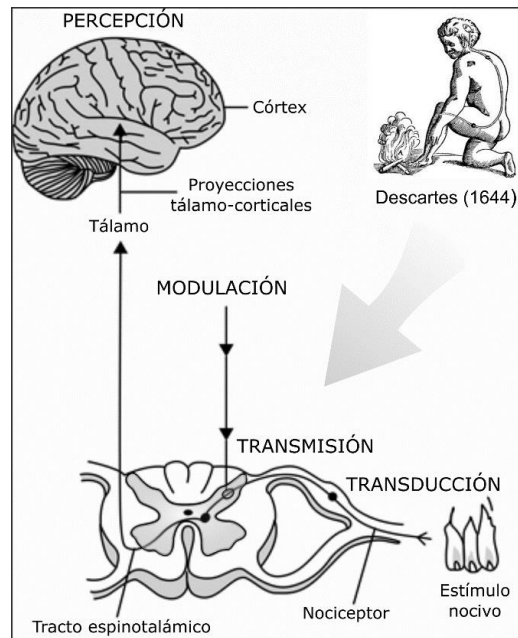


Figura 1. Proceso de comunicación del dolor. En la vía de señalización del dolor se distinguen 4 etapas secuenciales. 1) Transducción: conversión del estímulo nocivo a una señal eléctrica o potencial de acción. 2) Transmisión: conducción del potencial de acción por la fibra primaria aferente, el nociceptor, hasta la médula espinal. 3) Modulación: acoplamiento de circuitos descendentes que estimulan o inhiben la señal eléctrica. 4) Percepción: procesamiento cortical de los potenciales de acción (Das, 2015; Dubin and Patapoutian, 2010) (Imagen modificada de Ferrante and VadeBoncouer, 1993).

La importancia del dolor

El dolor, como modalidad sensorial constituye una parte integral de la vida y resulta indispensable para la supervivencia al tratarse de un sistema de detección y de alarma ante daños en el organismo. Sin embargo, para muchos pacientes el dolor continúa produciendo un grave sufrimiento que interrumpe y condiciona muy negativamente su calidad de vida. A menudo resulta altamente invalidante y compromete la capacidad de trabajo y / o las actividades de la vida cotidiana, incluso en niveles moderados (Scholz and Woolf, 2002). El dolor persistente o crónico es una patología que afecta a más del 20 % de la población mundial (Breivik et al., 2006; Nahin, 2015) y constituye el principal síntoma o patología por el que los pacientes acuden a la consulta médica. Económicamente, el dolor provoca unos costes para la sociedad entre tratamientos, atención médica o bajas laborales que oscila entre los 560.000 y los 600.000 millones de dólares al año sólo en Estados Unidos (Gaskin and Richard, 2012) y se estima que en Europa suponen 300.000 millones de euros al año (Torralba et al., 2014). A pesar de ello, las opciones farmacológicas para prevenirlo, eliminarlo o atenuarlo están bastante limitadas. Para el 38 % de la población europea los tratamientos resultan ineficaces (Torralba et al., 2014) o presentan importantes y graves efectos secundarios si son aplicados de forma crónica. De hecho, se estima que el 14 % de la población europea suspende la terapia analgésica recomendada por estas razones (Breivik et al., 2006).

En las últimas décadas, la búsqueda de nuevas terapias analgésicas más efectivas e individualizadas ha ido inherentemente ligada a una mejor comprensión de los mecanismos responsables del dolor. Un

mayor conocimiento de los mismos aporta nuevas dianas farmacológicas y permite un abordaje mucho más específico de las patologías relacionadas con el dolor (Baron, 2009; Scholz and Woolf, 2002; St John Smith, 2018).

Clasificación del dolor

El dolor puede ser descrito y clasificado atendiendo a muy diversos aspectos: por su duración (agudo o crónico), por su severidad (leve, moderado o intenso), por su localización (cabeza, espalda, articular, etc.). Desde el punto de vista fisiológico o fisiopatológico podemos distinguir entre el dolor nociceptivo, el inflamatorio y el neuropático.

El **dolor nociceptivo** es el dolor que el ser humano percibe ante un daño como, por ejemplo, cortes, quemaduras o golpes. En él los estímulos dañinos o nocivos amenazan el tejido normal siendo generalmente necesarios movimientos mecánicos intensos (presión nociva, movimientos nocivos, etc.) o térmicos (calor nocivo, frío nocivo) para activar el sistema nociceptivo (Schaible, 2015; Scholz and Woolf, 2002). Suele promover respuestas de protección que previenen o limitan el daño evitando lesiones graves que puedan poner en riesgo la supervivencia del organismo (Gascon and Moqrich, 2010). Se corresponde con el dolor puramente fisiológico en el que existe un correcto funcionamiento del sistema nociceptivo (Merskey and Bogduk, 1994).

El **dolor inflamatorio** se corresponde con la otra modalidad de dolor fisiológico. Si bien el sistema nociceptivo experimenta cambios significativos, en general, sus funciones están intactas. En este tipo de dolor la liberación de moléculas y compuestos derivados de la lesión o inflamación de un tejido son los que generan una sensibilización del sistema nociceptivo (Scholz and Woolf, 2002). Por ejemplo, las quemaduras solares producen una sensibilización temporal del área afectada. Como resultado, los estímulos normalmente inocuos, como el tacto ligero o el calor, se perciben como dolorosos (alodinia), o los estímulos normalmente dolorosos provocan dolor de mayor intensidad (hiperalgesia) (Basbaum et al., 2009). La funcionalidad de este tipo de dolor es primordialmente protectora, evitando que el tejido sufra un mayor daño y ayudando a los procesos de curación (Gascon and Moqrich, 2010; Schaible, 2015). En condiciones adecuadas, desaparece con la curación del daño o la desaparición de la inflamación (Schaible, 2015). Generalmente responde bien a tratamientos analgésicos comunes, como anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) u opiodes.

El **dolor neuropático** se corresponde con el dolor que resulta del daño o enfermedad del propio sistema nociceptivo (Merskey and Bogduk, 1994). La presencia de alguna lesión, patología o disfuncionalidad a nivel periférico o nivel central del propio sistema es el responsable de este tipo de dolor. Esta forma de dolor es anormal, a menudo aberrante, ya que no indica inflamación o lesión tisular, y puede combinarse con la pérdida de la función normal del sistema (Schaible, 2015). Generalmente se corresponde con una patología crónica, rara vez limitada en el tiempo, y puede estar asociada a otras patologías como la diabetes, el cáncer, la esclerosis múltiple, etc. La respuesta a tratamientos analgésicos resulta mucho más limitada empleando antidepresivos y anticonvulsivos en gran parte de los casos (Baron, 2009).

Nocicepción y nociceptores

Hace más de un siglo que el neurofisiólogo C. Sherrington propuso la existencia de una tipología de neurona sensorial primaria única, activada por estímulos capaces de causar daño tisular (Sherrington, 1903). La concepción de una entidad propia y distinta de otras modalidades somatosensoriales para la percepción del dolor le llevaron a acuñar los términos de nociceptor o nervio nociceptivo y nocicepción (Sherrington, 1906). Varias décadas después la confirmación de la existencia de neuronas sensoriales primarias excitadas exclusivamente por estímulos nocivos (Bessou and Perl, 1969; Burgess and Perl, 1967; Perl, 2007) rescataron estos términos. Actualmente se define como **nocicepción** el proceso neuronal de codificación de estímulos nocivos (Merskey and Bogduk, 1994). Esta definición refuerza la distinción entre nocicepción y dolor. La nocicepción comprende las primeras fases en la percepción del dolor, la transducción, y la transmisión de los estímulos nocivos traducidos a potenciales de acción. Por el contrario, el dolor requiere además la modulación y la interpretación por parte de centros cerebrales superiores a través de procesos cognitivos y afectivos para ser considerado como tal. Así, la nocicepción no implica necesariamente que se produzca la sensación de dolor (Merskey and Bogduk, 1994).

Una de las unidades primordiales del sistema nociceptivo es el **nociceptor**, definido como un receptor sensorial de alto umbral del sistema nervioso somatosensorial periférico que es capaz de transducir y codificar estímulos nocivos (Merskey and Bogduk, 1994). Desde su concepción y su identificación a principios y a mediados del siglo XX respectivamente, hasta la actualidad se ha realizado un progreso sustancial en la definición y caracterización de estas unidades neuronales asociadas al dolor (Sexton et al., 2018).

Morfológicamente los nociceptores se corresponden con neuronas pseudopolares. Sus cuerpos celulares se ubican de forma agrupada en los distintos ganglios sensoriales, como en los ganglios de la raíz dorsal (DRG, del inglés *Dorsal Root Ganglia*) o los ganglios del trigémino (TG, del inglés *Trigeminal Ganglia*). Las ramas axonales se dividen en una periférica que inerva los distintos órganos diana (piel, músculos y vísceras) y otra central que conecta con la médula espinal (Basbaum et al., 2009; Gascon and Moqrich, 2010). La capacidad de los nociceptores de excitarse y generar potenciales de acción sólo cuando la intensidad del estímulo alcanza el rango nocivo, señalan que poseen propiedades biofísicas y moleculares exclusivas. Éstas les permiten detectar de forma selectiva estímulos potencialmente dañinos (Basbaum et al., 2009).

Por su tamaño, velocidad de conducción, umbral y sensibilidad diferencial a los distintos estímulos nocivos se distinguen las fibras de tamaño medio mielinizadas A δ y las fibras de pequeño diámetro no mielinizadas C (Basbaum et al., 2009; Dubin and Patapoutian, 2010) (Figura 2).

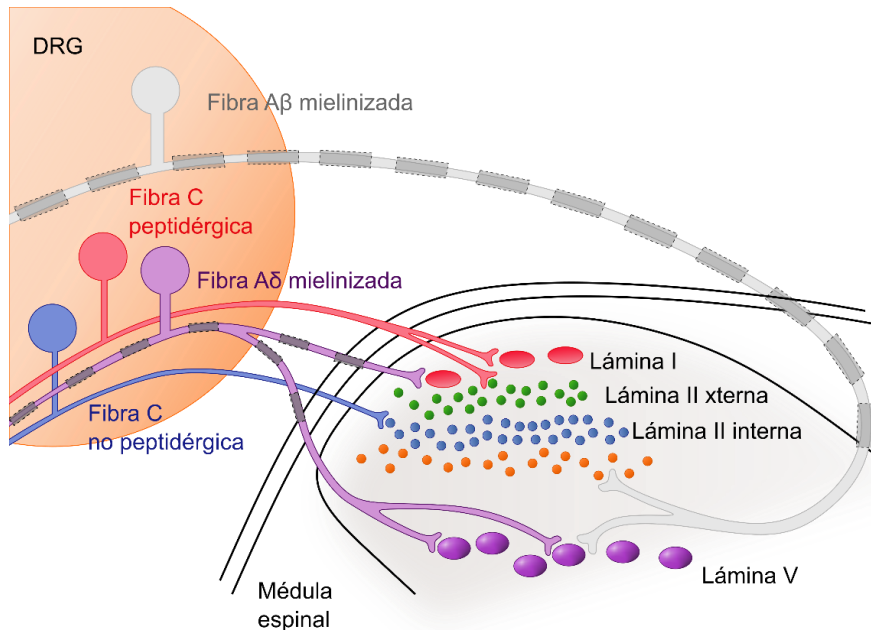


Figura 2. Los nociceptores y su conexión a médula espinal. Los nociceptores, cuyo cuerpo celular se agrupa en los DRG, proyectan su rama axonal central al asta posterior de la médula espinal, organizada laminarmente. Las fibras A δ (en violeta) de tamaño medio y poco mielinizadas conectan con la lámina I y V de la médula espinal. Las fibras C amielínicas peptidérgicas (en rojo) y no peptidérgicas (en azul) conectan con las láminas I y II externa y lámina II interna respectivamente. En gris se señalan las fibras A β mielinizadas que conducen información de estímulos inocuos (Imagen modificada de Basbaum et al., 2009).

Las fibras A δ mielinizadas y de tamaño medio, gracias a su velocidad de conducción de 5-30 m/s, median en el primer dolor o dolor rápido, bien localizado y generalmente descrito como punzante o cortante. Los nociceptores A δ son predominantemente mecanosensibles y/o sensibles al calor. Por su umbral y su sensibilidad a los distintos estímulos nocivos se distinguen: las fibras A δ tipo I, nociceptores mecánicos de alto umbral, con umbrales de calor relativamente altos (> 50°C) y que responden a estímulos mecánicos y químicos. Los nociceptores A δ tipo II tienen un umbral de calor mucho más bajo, pero un umbral mecánico muy alto (Basbaum et al., 2009; Cain et al., 2001; Dubin and Patapoutian, 2010; Lewin and Moshourab, 2004). En algunos casos también se ha observado sensibilidad al frío nocivo por este tipo de fibras (Cain et al., 2001). Las fibras A δ transmiten la información nociva por las láminas I y V del asta dorsal de la médula espinal (Das, 2015; Gascon and Moqrich, 2010) (Figura 2).

Los nociceptores C, con una velocidad de conducción de 0,4-1,4 m/s median en el dolor secundario o lento, sordo y mal localizado. Son fibras heterogéneas con terminaciones libres en la piel y mucho más abundantes que las fibras A δ (Smith and Lewin, 2009). Éstos transmiten la información a las láminas superficiales I / II del asta dorsal de la médula espinal (Das, 2015; Gascon and Moqrich, 2010) (Figura 2). Los más comunes (35 %) responden a estímulos térmicos, mecánicos y químicos, y son por ello clasificados como polimodales (Raja et al., 1988). Recientes estudios con indicadores de Ca²⁺ genéticamente codificados (GCaMP) apuntan, sin embargo, que en condiciones normales (sin lesión o inflamación) este tipo de fibras sensoriales definidas como polimodales por los estudios electrofisiológicos son más específicas (Emery et al., 2016; Kim et al., 2016; Smith-Edwards et al., 2016). Además de los nociceptores C polimodales, también se han descrito fibras C activadas

puramente por estímulos mecánicos nocivos, por calor, por estímulos mecánicos y calor y por estímulos mecánicos y frío (Cain et al., 2001; Lewin and Moshourab, 2004). Por último, también se han descrito los nociceptores C denominados silenciosos. Éstos, insensibles a la estimulación mecánica y térmica en condiciones fisiológicas, se vuelven sensibles a estímulos mecánicos o temperaturas nocivas después de ser sensibilizados por mediadores inflamatorios (Schmidt et al., 1995).

Desde el punto de vista molecular, los nociceptores también presentan una alta heterogeneidad en la expresión de canales iónicos y receptores. Ésta es asociada a funciones específicas por parte de cada nociceptor en la detección de las distintas modalidades de dolor (Basbaum et al., 2009). Un tercio aproximadamente de los nociceptores expresa el receptor de la tropomiosina quinasa A (TrkA, del inglés *Tropomyosin receptor kinase A*) o receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *Neural Growth Factor*). Los dos tercios restantes expresan el receptor del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, del inglés *Glial cell Derived Neurotrophic Factor*) o receptor c-Ret. La mayoría de neuronas adultas TrkA⁺ contienen neuropéptidos, como son la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP, del inglés *Calcitonin Gene-Related Peptide*). Denominadas así, neuronas peptidérgicas, son fibras que inervan principalmente músculos y vísceras. La población no peptidérgica o c-Ret⁺, expresa además receptores acoplados a proteína G de la familia Mrg, así como subtipos de receptores purinérgicos específicos, principalmente P2rx3. Este tipo de nociceptores inervan generalmente dianas cutáneas (Basbaum et al., 2009; Gascon and Moqrich, 2010). Un gran porcentaje de esta población se une a la isolectina B4 (IB4), propiedad que ha permitido su identificación rápida, promoviendo así la división de nociceptores peptidérgicos IB4⁻ y nociceptores no peptidérgicos IB4⁺. Aunque múltiples investigaciones han demostrado que estas distinciones no siempre son tan claras y categóricas. Análisis recientes del transcriptoma de células somatosensoriales describen una alta variabilidad génica y aunque permiten determinar distintos tipos de nociceptores, dichas divisiones no se corresponden siempre con las clasificaciones clásicas anatómicas o moleculares establecidas (Li et al., 2016; Usoskin et al., 2015).

Desarrollo de los nociceptores

La alta heterogeneidad de los nociceptores viene marcada por una específica secuencia transcripcional que conduce a la especificación de cada linaje a lo largo del desarrollo. Al igual que el resto de células somatosensoriales, los nociceptores presentes en DRGs y TG se originan a partir de células madre presentes en la cresta neural o NCC (del inglés *Neural Crest Cells*) (Liu and Ma, 2011; Marmigere and Carroll, 2014; Newbern, 2015). Estas células, generadas en las primeras fases de la embriogénesis, se desarrollan, migran y se especializan de forma altamente regulada por patrones de señalización en los que intervienen factores que incluyen las Wnt/ β -cateninas, los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés *Fibroblast Growth Factor*) o las proteínas morfogénicas óseas (BMP, del inglés *Bone Morphogenetic Protein*) (Newbern, 2015).

En las primeras fases de la neurogénesis de las células somatosensoriales, el factor de transcripción Sox10 es uno de los responsables del mantenimiento del estado multipotencial de las NCC (Kim et al., 2003). Por el contrario, los factores de transcripción proneurales Neurogenina 1 (Ngn1) y Neurogenina 2 (Ngn2) son determinantes en la generación de los linajes neuronales sensoriales (Liu and Ma, 2011; Marmigere and Carroll, 2014; Marmigere and Ernfors, 2007). De hecho, la falta de estos precursores conduce a la carencia de DRG como se demuestra en el estudio con dobles mutantes para estos genes (Ma et al., 1999). Estos dos factores de transcripción marcan las primeras 2 de las 3 oleadas transcripcionales que dan lugar a la formación de las neuronas sensoriales. La expresión de Ngn2

aparece en la primera oleada siendo el precursor de la mayoría de fibras aferentes mielinizadas, en las que se incluyen las poblaciones de propioceptores y mecanorreceptores y las fibras ligeramente mielinizadas nociceptivas A δ . La expresión de Ngn1 en la segunda oleada, por el contrario, da lugar a algunas fibras mielinizadas aferentes y la mayoría de las neuronas amielínicas o fibras C nociceptivas (Liu and Ma, 2011; Ma et al., 1999; Marmigere and Carroll, 2014) (Figura 3). Estas divisiones no son exclusivas y se ha demostrado cierta plasticidad neuronal en esta fase de desarrollo. Así células del linaje Ngn1 derivan a propioceptores y mecanorreceptores ante la supresión de Ngn2 y células del linaje Ngn2 dan lugar a células TrkA⁺ en DRG torácicos y lumbares (Liu and Ma, 2011; Ma et al., 1999).

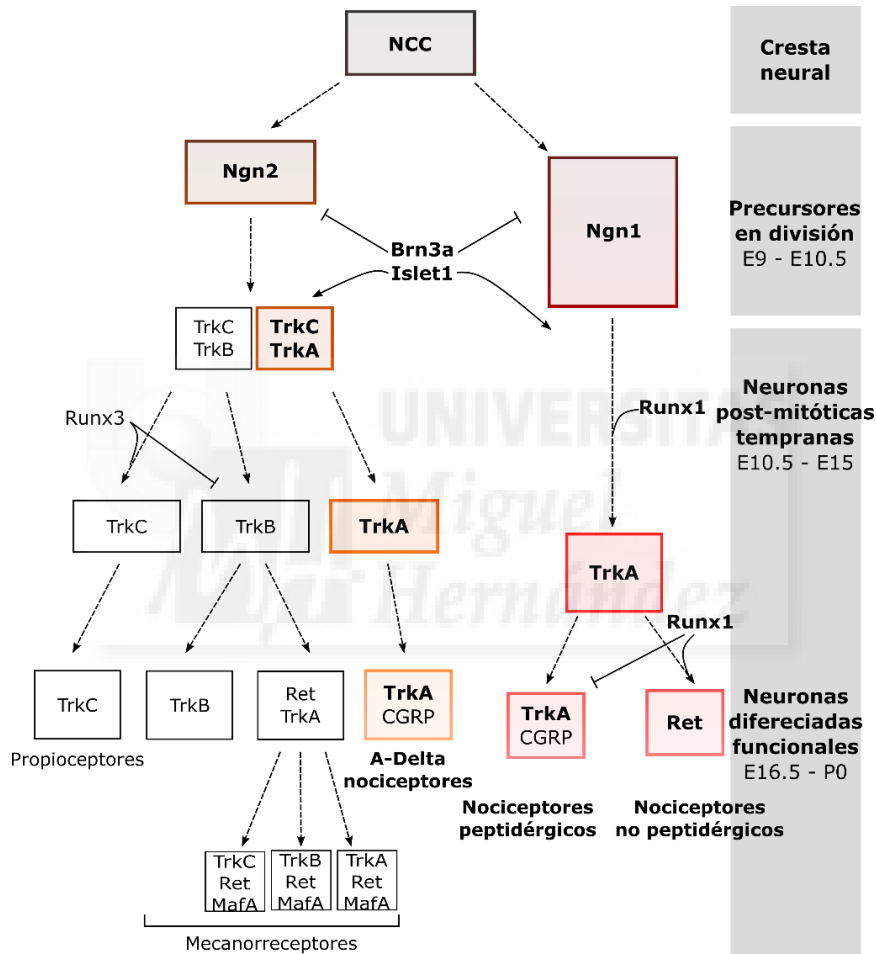


Figura 3. Desarrollo y maduración de neuronas somatosensoriales a partir de las células de la cresta neural (NCC). Las NCC se dividen en dos subpoblaciones principales con la expresión de los factores de transcripción Ngn1 y Ngn2. Los precursores Ngn2 generan la mayoría de los nociceptores mielinizados (fibras aferentes A δ), mientras que los nociceptores no mielinizados (fibras C) se generan a partir de la población precursora Ngn1. Brn3a e Islet1 son los factores que suprimen la expresión de Ngn e impulsan la diferenciación sensorial. La supervivencia y el desarrollo de los nociceptores viene marcado por la expresión y la regulación de la neurotrofina NGF y su receptor el TrkA. En el caso del linaje dependiente de Ngn1, Runx1 dirige la expresión de TrkA en etapas tempranas y en etapas más tardías este mismo factor regula la expresión de TrkA, y promueve la diferenciación de nociceptores peptidérgicos y no peptidérgicos (Imagen modificada de Marmigere and Carroll, 2014).

La transición desde precursores neuronales a neuronas sensoriales post-mitóticas está controlada por la expresión de los factores de transcripción *Islet1* y *Brn3a* (Marmigere and Carroll, 2014). Estos factores parecen actuar juntos para suprimir la expresión de *Ngn1* y *Ngn2* e impulsan la diferenciación sensorial (Liu and Ma, 2011). En ausencia de estas moléculas, los progenitores sensoriales expresan el marcador neuronal general β III-tubulina, pero no logran regular y expresar algunos de los genes característicos de las neuronas sensoriales (Dykes et al., 2011; Eng et al., 2007; Sun et al., 2008). Con la consolidación del fenotipo sensorial, las neuronas post-mitóticas tempranas comienzan a desplegar programas transcripcionales que las especifican en las diferentes subclases funcionales de neuronas presentes en el organismo adulto. Estos programas incluyen señales retrógradas que incluyen neurotrofinas y otros factores neurotróficos. La importancia de las neurotrofinas en el desarrollo armonioso de este sistema se ejemplifica por los efectos nocivos de la pérdida, la sobreexpresión o la mutación de las neurotrofinas o sus receptores (Marmigere and Carroll, 2014).

El factor de crecimiento nervioso o neurotrofina NGF y su receptor TrkA son los marcadores que en la segunda y tercera oleada dan lugar a la formación de los nociceptores (Liu and Ma, 2011; Marmigere and Ernfors, 2007; Newbern, 2015) (Figura 3). Su expresión se puede dividir en dos fases. Una temprana que se inicia en el ratón en el E10.5, originaria del linaje *Ngn2*, y da lugar a la formación de las fibras A δ no siendo dependiente de *Runx1* (factor perteneciente a la familia de factores de transcripción relacionados con Runt) (Lallemend and Ernfors, 2012). Una fase más tardía, alrededor del E13, se produce desde el linaje *Ngn1*, dando lugar a la mayor parte de las fibras C (Lallemend and Ernfors, 2012). A lo largo del desarrollo se observan grandes cambios en la expresión de este receptor. Aunque se inicia en pocas neuronas en E10.5, aumenta y llega hasta el 80 % de las células en los estadios E13-E15, pero queda restringido al 30 % de neuronas adultas (Luo et al., 2007; Marmigere and Carroll, 2014). A pesar de la reducción posnatal del receptor TrkA en favor de la expresión de c-Ret en estadios adultos (Luo et al., 2007; Molliver et al., 1997), tanto NGF como su receptor resultan imprescindibles en el desarrollo de los nociceptores. Así como la falta de TrkA en fase embrionaria conduce a la carencia total de nociceptores en el adulto, estudios con mutantes condicionales han demostrado que NGF y TrkA, más allá de la supervivencia celular, están implicados en la correcta expresión de canales iónicos y neuropéptidos característicos de los nociceptores (Crowley et al., 1994; Luo et al., 2007; Marmigere and Carroll, 2014; Patel et al., 2000).

El factor de transcripción *Runx1* es un factor regulador de la expresión de TrkA en las fibras amielínicas C y resulta crítico en la diferenciación de los nociceptores (Lallemend and Ernfors, 2012; Liu and Ma, 2011) (Figura 3). *Runx1* se expresa en la gran mayoría de neuronas TrkA⁺ (\approx 90 % en E14.5) poco después de la expresión de este receptor (Chen et al., 2006; Liu and Ma, 2011). Diversas investigaciones han demostrado que el factor *Runx1* resulta clave en la distinción de nociceptores peptidérgicos y no peptidérgicos en etapas más avanzadas del desarrollo (Chen et al., 2006; Kobayashi et al., 2012; Kramer et al., 2006; Yoshikawa et al., 2016) (Figura 3). Así, *Runx1* resulta necesario para la expresión de c-Ret y la supresión de la expresión de TrkA y CGRP generando los nociceptores no peptidérgicos (Chen et al., 2006), pero su expresión parece ser también un requisito en el establecimiento de los nociceptores peptidérgicos (Kramer et al., 2006). La expresión del receptor para ATP P2rx3, el canal de sodio Nav1.9 y una docena de canales *Mrg* en las fases finales del desarrollo dependen de *Runx1* (Chen et al., 2006; Marmigere and Ernfors, 2007). Asimismo, se requiere la expresión transitoria de *Runx1* en nociceptores peptidérgicos para la expresión de receptores de potencial transitorio (TRP), entre los que se incluyen TRPM8, TRPA1, TRPV1 y TRPV2 (Marmigere and Carroll, 2014). *Runx1*, sin embargo, es prescindible o suprime la expresión de canales iónicos y receptores como por ejemplo los canales iónicos sensibles al ácido (ASIC1-3), el receptor opioide mu (MOR) y el canal de sodio Nav1.8 (Chen et al., 2006). Esta dual dependencia para la generación de las fibras C peptidérgicas y no

peptidérgicas, que en principio resultaría mutuamente excluyente, promueve la idea de que este factor tiene un papel pivotante a lo largo del desarrollo de los nociceptores (Marmigere and Ernfors, 2007).

La identidad molecular final de cada nociceptor viene definida por la miríada de canales iónicos y receptores presentes en él, que además muestran dos particularidades notables (Basbaum et al., 2009). La primera resulta en la expresión conjunta o mutuamente excluyente de estos canales y receptores. Por ejemplo, mientras que los receptores MrgprD se expresan exclusivamente en nociceptores no peptidérgicos, así como el canal de potencial transitorio TRPA1 sólo en nociceptores peptidérgicos, el canal iónico TRPM8 se expresa en ambos tipos de nociceptores (Dong et al., 2001; Hjerling-Leffler et al., 2007; Liu and Ma, 2011).

La segunda particularidad se corresponde con la expresión de estos canales y receptores siguiendo un complejo control temporal desde las primeras fases de desarrollo embrionario hasta fases postnatales más avanzadas (Liu and Ma, 2011; Woolf and Ma, 2007). Por ejemplo, los canales de calcio dependientes de voltaje aparecen ya en estadios E11.5 y el canal TRPV1 es funcional en E12.5. Mientras, el canal TRPA1 no se expresa hasta estadios posnatales y no se detecta su funcionalidad hasta P7 (Hjerling-Leffler et al., 2007). El fenotipo final de los nociceptores es dependiente de las diferentes combinaciones de factores presentes en cada una de las vías de señalización (Liu and Ma, 2011; Marmigere and Ernfors, 2007). Diversos estudios muestran que los canales y receptores de los nociceptores se pueden dividir entre los dependientes y los no dependientes de Runx1. A su vez, dentro de los dependientes de Runx1 se dividen en (1) los dependientes de c-Ret, (2) los no dependientes de c-Ret y dependientes de TrkA y (3) los no dependientes de c-Ret ni TrkA (Lallemend and Ernfors, 2012; Luo et al., 2007; Woolf and Ma, 2007). Todo ello da muestra del intrincado sistema de señalización temporal y espacial necesario para la correcta formación de las neuronas sensoriales en general y de los nociceptores en particular.

Miguel
Hernández

Receptores de potencial transitorio (TRP) en la nocicepción

Como ya se ha mencionado, la capacidad de respuesta ante la amplia variedad de estímulos nocivos viene dada por la elevada heterogeneidad de transductores. Los canales ASIC 1-3, el receptor P2rx3, los canales de sodio dependiente de voltaje como el Nav1.7, Nav1.8 o el Nav1.9, los canales de calcio dependientes de voltaje o los receptores Mrg son sólo algunos ejemplos responsables de la excitabilidad neuronal y de la generación de los potenciales de acción ante estímulos nocivos.

Dentro de la amplia variedad de detectores identificados, la familia de los canales iónicos TRP (del inglés *Transient Receptor Potential*) constituye uno de los principales grupos de transductores moleculares en el sistema somatosensorial. La identificación del canal TRP fundador de esta gran familia se produjo en *Drosophila melanogaster*, a partir de estudios de fototransducción en los que ejemplares mutantes presentaban cambios de potencial de membrana transitorios en respuesta a luz brillante (Cosens and Manning, 1969; Minke, 2010; Montell and Rubin, 1989). A partir de éste son muchos los miembros que se han descrito de esta familia. Actualmente en mamíferos se han identificado hasta 28 canales iónicos que se han clasificado en seis subfamilias según la homología en su secuencia de aminoácidos: canónico (TRPC), vaniloide (TRPV), anquirina (TRPA), melastatina (TRPM), policistina (TRPP) y mucolipina (TRPML) (Flockerzi and Nilius, 2014; Venkatachalam and Montell, 2007).

Estructuralmente todos presentan una conformación similar donde la unión de 4 subunidades iguales, homotetrámeros, componen el canal iónico, aunque también se han descrito algunos heterotetrámeros. Cada subunidad o monómero, presenta 6 dominios transmembrana, con el segmento entre los segmentos transmembrana 5 y 6 configurando el poro del canal. Los extremos N y C terminal, ambos intracelulares, varían en número de aminoácidos y estructuras funcionales siendo estas estructuras las responsables concretas de la configuración de las distintas subfamilias (Latorre et al., 2009). Por ejemplo, las subfamilias TRPC, TRPA, TRPV y TRPN presentan entre 4 y 30 repeticiones en tándem de dominios de anquirina, implicados en la interacción proteína – proteína. Los miembros de TRPC, TRPM, TRPP y TRPV contienen bien en el N o el C terminal dominios en espiral (*coiled coil*) implicados en el ensamblaje de los complejos homoméricos y heteroméricos. Además, se ha descrito en las subfamilias TRPC, TRPV y TRPM una región altamente conservada en el C-terminal, denominada “TRP box” o dominio TRP implicada en la apertura y cierre del canal así como en el ensamblaje de los homómeros (García-Sanz et al., 2004; García-Sanz et al., 2007).

Los TRP son canales catiónicos no selectivos, pero con una relativamente alta permeabilidad a Ca^{2+} . Se localizan en prácticamente todos los tejidos y tipos celulares, principalmente en membrana plasmática pero también en membrana de organelas intracelulares (Salido et al., 2009; Venkatachalam and Montell, 2007). Por otra parte, muchos de los canales TRP son polimodales, es decir, son activados y modulados por una amplísima variedad de estímulos químicos (endógenos y exógenos) así como físicos (temperatura, voltaje, presión, etc.) (Moran and Szallasi, 2018; Nilius and Szallasi, 2014).

Esta vasta distribución y su carácter polimodal van ligados a la plétora de funciones que estas proteínas de membrana llevan a cabo. Se ha demostrado su vinculación con la secreción de saliva, la regulación cardiovascular, el tono muscular, la regulación de la presión arterial, la homeostasis de Ca^{2+} y Mg^{2+} , la polaridad celular o la adhesión celular (Clapham, 2003; Montell, 2005; Venkatachalam and Montell, 2007). Aunque mayoritariamente estos canales iónicos se han vinculado con la transducción sensorial. Están implicados en la visión, el tacto, el olfato, la detección de feromonas, la osmorregulación, la percepción de la temperatura y la percepción del dolor (Clapham, 2003; Jardin et al., 2017; Julius, 2013; Venkatachalam and Montell, 2007). De hecho, la relación de estos canales con la termorregulación y el dolor ha sido en parte la responsable del creciente interés en los TRPs (Minke, 2010).

Funcionalmente se puede establecer subconjuntos diferentes a los que establece la clasificación estructural de subfamilias. En este sentido, el conjunto de TRP sensibles a temperatura nociva y no nociva ha establecido el subconjunto denominado termoTRPs (Fernández-Carvajal et al., 2011; Mickle et al., 2015; Patapoutian et al., 2003; Vay et al., 2012). En este grupo encontramos miembros de las subfamilias TRPV (TRPV1 – 4), TRPM (TRPM3 y TRPM8) y TRPA1 (único miembro de la subfamilia TRPA) (Figura 4).

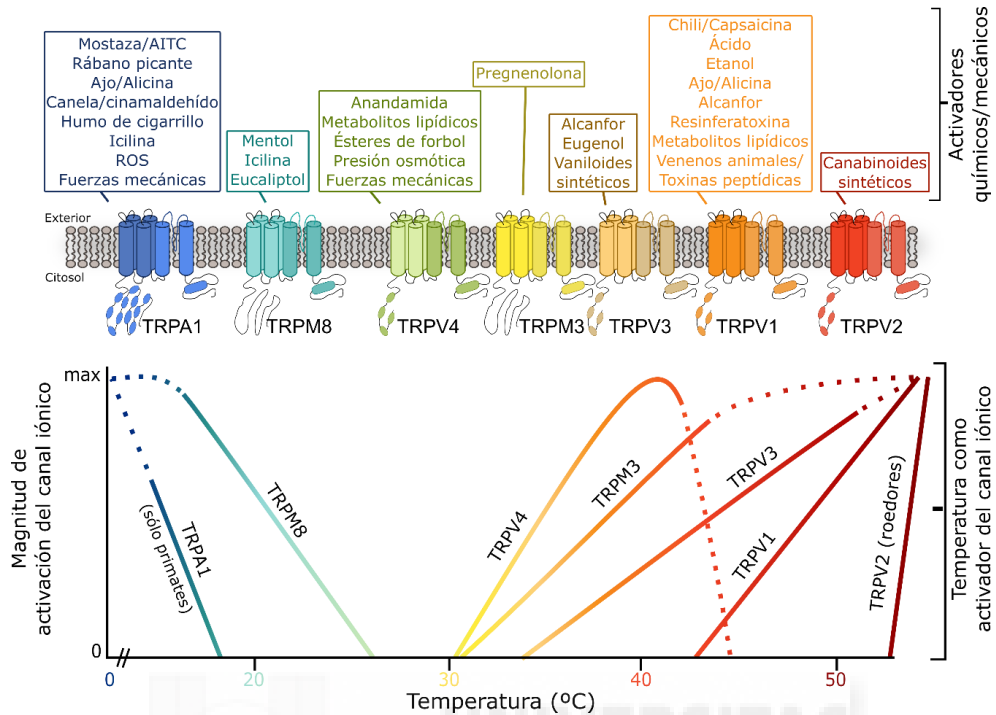


Figura 4. Clasificación de los canales TRP termosensibles implicados también en la nocicepción. En la parte superior en cajas se señalan los activadores químicos y mecánicos de cada TRP, representado con la conformación estructural de sus monómeros. Todos ellos con dominio TRP en el C-terminal y numerosas repeticiones de anquirina en TRPA1 y pocas repeticiones de anquirina en los TRPV, ausentes en TRPM en el N-terminal. En la parte inferior se representa la magnitud de activación de cada canal por un rango de temperaturas que va de nocivas frías a nocivas cálidas (Imagen modificada de Mickle et al., 2015).

Todos los termoTRPs son polimodales y son activados por una amplia variedad de estímulos físicos y químicos. Además de la temperatura, el pH, la osmolaridad, compuestos endógenos, moléculas inflamatorias y productos naturales controlan su actividad (Dai, 2016; Moran and Szallasi, 2018; Nilius and Szallasi, 2014). De hecho, los compuestos naturales como la capsaicina, el mentol y el cinamaldehído se han utilizado comúnmente para explorar y comprender el papel de estos canales en la nocicepción y el dolor (Basbaum et al., 2009; Julius, 2013) (Figura 4).

La vinculación de estos termoTRP con la nocicepción ha sido largamente explorada (Bandell et al., 2007; Fernandez-Carvajal et al., 2011; Mickle et al., 2015, 2016; Patapoutian et al., 2009; Vay et al., 2012), así como su relación con patologías de dolor crónico como la osteoartritis, el dolor neuropático o la migraña (Dussor et al., 2014; Mickle et al., 2015, 2016).

En numerosas ocasiones se han considerado como potenciales dianas terapéuticas y se ha investigado, descrito y testado a través de ensayos clínicos diversos compuestos que han tratado de regular su actividad (Ferrer-Montiel et al., 2012; Kaneko and Szallasi, 2014; Mickle et al., 2016; Yekkirala et al., 2017).

TRPV1

TRPV1 es el canal dentro del grupo de los termoTRPs más estudiado y mejor caracterizado (Bevan et al., 2014; Mickle et al., 2015). Su descubrimiento es un claro ejemplo de los esfuerzos llevados a cabo para dilucidar los mecanismos de transducción del dolor. Aunque durante la mitad del siglo XX diversas investigaciones dieron a conocer los efectos de la capsaicina en las neuronas sensoriales (Dray, 1992; Lynn, 1990) no fue hasta la clonación de TRPV1 (a partir de bibliotecas de ADN copia de neuronas sensoriales de ratones) que se consiguió identificar el receptor de capsaicina y el primer canal TRP vaniloide (TRPV) (Caterina et al., 2006; Caterina et al., 1997). Este importante hallazgo sirvió como catalizador y propició el descubrimiento de toda una serie de canales TRP implicados en la nocicepción (Mickle et al., 2016).

TRPV1 se expresa en los terminales centrales y periféricos de las neuronas sensoriales somáticas y viscerales de pequeño tamaño (fibras C), así como en una menor proporción de las neuronas sensoriales de tamaño medio poco mielinizadas (fibras A δ) en ganglios de la raíz dorsal, ganglios del trigémino y ganglios vagales (Caterina et al., 1997; Kobayashi et al., 2005). Es detectado tanto en poblaciones neuronales peptidérgicas como no peptidérgicas pero con una clara predominancia de las primeras (Cavanaugh et al., 2011a). TRPV1 también se ha detectado en diversas áreas del sistema nervioso central de forma más o menos restringida (Cavanaugh et al., 2011b), en el músculo liso arteriolar (Cavanaugh et al., 2011b), urotelio de vejiga o queratinocitos humanos (Bevan et al., 2014; Caterina et al., 2006).

La estructura de TRPV1 sigue el patrón del resto de canales TRP, con seis dominios transmembrana, seis repeticiones de anquirina en el extremo N-terminal y el dominio TRP en el C-terminal, ambos extremos citosólicos (Cao et al., 2013; Liao et al., 2013).

El gen *Trpv1* humano está ubicado en el cromosoma 17p13, organizado en 17 exones que codifican una proteína de 839 aminoácidos. En el ratón, el gen se sitúa en el cromosoma 11 (banda 4), dividido en 16 exones. Resulta un gen altamente polimórfico del que se han detectado hasta 5 variantes distintas en ratón, además de un gran número de polimorfismos en un único nucleótido (SNP) que varían a lo largo de 21 cepas de ratón genotipadas por distintos consorcios (Dorfman et al., 2010) (<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:1341787>). En modelos murinos se han podido describir tres variantes de este canal: VR.5'sv, TRPV1b(beta) y TRPV1var (Schumacher and Eilers, 2010) (Figura 5). Las dos primeras presentan alteraciones en el N-terminal de TRPV1 por la pérdida de secuencias más o menos grandes (60 aminoácidos o 10 aminoácidos respectivamente). Ambas carecen de respuesta a capsaicina y se ha propuesto que funcionalmente actúan como reguladores negativos del canal iónico completo (Donaldson and Beazley-Long, 2016; Schumacher and Eilers, 2010). La tercera variante descrita se corresponde con un fallo en la eliminación del exón 5 lo que conduce a la traducción de una porción del N terminal sin las regiones transmembrana ni C-terminal. A nivel funcional se ha descrito que podría modular la respuesta de TRPV1 (Schumacher and Eilers, 2010).

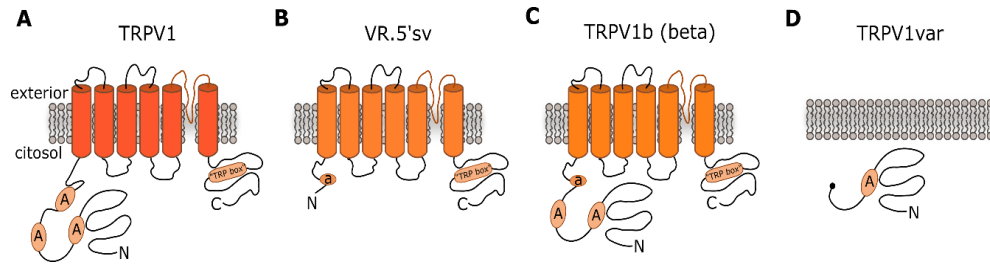


Figura 5. Comparativa estructural entre la configuración funcional completa de TRPV1 y sus variantes. A) Estructura de TRPV1 funcional con presencia de repeticiones de anquirina en el N-terminal y el dominio TRP (TRP *box*) en el C-terminal de la proteína. B) Estructura de la variante VR.5'sv. Estructura similar al TRPV1 funcional salvo por la región N-terminal, que retiene sólo una pequeña porción del tercer dominio repetido de anquirina. C) Estructura de la variante TRPV1b. Idéntica a TRPV1 excepto por la delección parcial del tercer dominio repetido de anquirina y la secuencia polipeptídica adyacente. D) Estructura de la variante TRPV1var. Carece por completo de regiones transmembrana y regiones intracelulares C-terminales. TRPV1var codifica una región intracelular N-terminal truncada que retiene el primer dominio de repetición de anquirina (Imagen adaptada de Schumacher and Eilers, 2010).

TRPV1 es un canal altamente polimodal sensible a diferentes estímulos físicos y químicos, incluido el calor nocivo ($> 43^{\circ}\text{C}$), pH ácido extracelular ($\leq \text{pH } 6,0$), pH básico intracelular ($\geq \text{pH } 7,8$), voltaje, vaniloides externos (capsaicina, piperina), cannabinoides, diferentes toxinas derivadas de animales (resiniferotoxina), endovaniloides (anandamida), endocannabinoides, alcaloides o lípidos. Distintos componentes de la sopa inflamatoria (bradiquinina, citoquinas, ATP, etc.) actúan de forma conjunta reduciendo el umbral de activación del canal, aumentan su expresión y movilizan los canales a membrana plasmática (Camprubi-Robles et al., 2009; Patapoutian et al., 2009). Además, TRPV1 puede modularse a través de la fosforilación por quinasas u otros factores metabólicos, así como por lípidos que en conjunto promueven su actividad y su expresión en membrana (Bevan et al., 2014; Caterina et al., 2006; Ciardo and Ferrer-Montiel, 2017; Dai, 2016; Jardin et al., 2017; Julius, 2013).

Los estudios sobre TRPV1 con el empleo de agonistas y antagonistas, así como los modelos que carecen de TRPV1 funcional (modelos *knock-out*) para este canal indican que TRPV1 es esencial para la sensación de dolor y la hiperalgesia térmica inducida por una lesión tisular. Por ejemplo, la aplicación intradérmica o tópica de capsaicina provoca, además de eritema y dolor ardiente, hiperalgesia térmica y mecánica, así como alodinia. En modelos animales la inyección de capsazepina, un antagonista de TRPV1, atenúa los comportamientos de hiperalgesia térmica inflamatoria. Además, los ratones *knock-out* para TRPV1 no muestran cambios en la respuesta a temperaturas nocivas, pero sí atenúan de forma muy marcada la hiperalgesia térmica provocada por mediadores inflamatorios (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000; Mickle et al., 2015; Moore et al., 2018). También en modelos animales se ha demostrado que tanto la carencia de TRPV1, como su bloqueo farmacológico pueden reducir los síntomas similares a la artritis (Barton et al., 2006). El conjunto de estas observaciones ha provocado el desarrollo de antagonistas y agonistas de TRPV1 como analgésicos eficaces de nueva generación para múltiples patologías relacionadas con el dolor inflamatorio (Bhattacharya et al., 2010; Mickle et al., 2015, 2016; Yekkirala et al., 2017).

En la relación de TRPV1 con el dolor neuropático, uno de los cambios más patentes resulta en la disminución de la expresión de TRPV1 ante una lesión axonal periférica, por ejemplo, en la neuropatía diabética. Además, se ha demostrado que tanto con la inhibición farmacológica como con los ratones TRPV1 *knock out* los comportamientos de dolor en diversos modelos de dolor neuropático se ven

ampliamente reducidos (Dai, 2016). A este respecto, aunque se ha testado algunos compuestos en ensayos clínicos, está aún por demostrarse su efectividad en este tipo de dolor (Mickle et al., 2016).

La vinculación de TRPV1 con el dolor visceral (intestino irritable o disfunción neurogénica de la vejiga, por ejemplo), el cáncer de hueso o la migraña también han sido y son ampliamente investigadas (Mickle et al., 2015, 2016). Así, el silenciamiento o inactivación de TRPV1 atenúan el dolor en la distensión colorrectal y puede disminuir la gravedad de la enfermedad. Además, al igual que en la cistitis, se produce una disminución de comportamientos asociados al dolor en ratones *knock out* de TRPV1. Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo de estas relaciones. Algo similar ocurre con el dolor en el cáncer. Aunque diversos estudios muestran el papel integral de TRPV1 en el cáncer de hueso, aún no se conoce el mecanismo exacto y se hipotetiza que es el microambiente inflamatorio junto con la acidez asociada a la región tumoral la que produciría la sensibilización de TRPV1. En el caso de la migraña, se ha demostrado que antagonistas de TRPV1 alivian los síntomas migrañosos hipotetizándose que la inhibición del canal reduce la liberación de neuropéptido CGRP, crítico en el desarrollo de la excitación trigémino-vascular (Dussor et al., 2014; Eid, 2011). Sin embargo, todas estas vinculaciones, más o menos indirectas han de ser estudiadas más profundamente para el desarrollo de terapia analgésicas efectivas (Jardin et al., 2017; Mickle et al., 2016).

A pesar de los numerosos esfuerzos en la búsqueda de terapias analgésicas que han llevado al desarrollo de nuevos compuestos antagonistas a los canales TRP en general y TRPV1 en particular (Mickle et al., 2016; Yekkirala et al., 2017) resulta indudable la necesidad de aumentar el conocimiento en los mecanismos que median en los distintos estados del dolor (Luo, 2012) para desarrollar terapias más eficaces.

Modelos animales

En el campo de la investigación médica, los estudios en modelos animales han resultado clave, y en ocasiones imprescindibles, para el desarrollo de nuevos tratamientos. Tanto para el desarrollo de hipótesis y pruebas de concepto como la validación de mecanismos de acción o pruebas de seguridad y/o eficacia, los modelos animales resultan críticos en el avance de la farmacología y de la terapia analgésica (Doyle et al., 2012; Freichel et al., 2011; Mogil et al., 2010; Sexton et al., 2018). Aunque sin duda, los avances en la generación de modelos no habrían sido posibles sin el desarrollo y la aplicación en paralelo de las distintas técnicas genéticas. Éstas han permitido dibujar y profundizar en aspectos muy relevantes de la percepción del dolor (Akopian, 2013; Lariviere et al., 2001; Molet and Pohl, 2013).

Por ejemplo, los métodos de clonación han permitido la identificación de nuevos factores de transcripción, proteínas del citoplasma, receptores y canales iónicos que participan en la generación, modulación y propagación de los potenciales de acción a lo largo de las vías de la nocicepción (Akopian, 2013). Desde sus inicios en las décadas de los 70 y 80, la evolución de los métodos de clonación ha dado lugar a diversos hitos en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares de la transducción. Por ejemplo la identificación del canal iónico TRPV1 ya mencionada (Basbaum et al., 2009; Caterina et al., 1997; Chen et al., 2013) o del receptor purinérgico P2rx3, el primer canal clonado específicamente para el procesamiento nociceptivo. Otro muchos canales como los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav1.8), los canales iónicos de detección de pH ASIC 1 y 3 o los mecanorreceptores Piezo 1 y 2 han podido identificarse con el desarrollo de los métodos de clonación (Akopian, 2013).

Por otra parte, el desarrollo de modelos animales modificados genéticamente ha abierto las puertas al conocimiento de la fisiología, el desarrollo y la patología de distintos mecanismos implicados en la nocicepción. La particularidad de la generación de estos animales modificados es que la evaluación es posible a distintos niveles, desde la bioquímica hasta el comportamiento pasando por la biología celular y la fisiología (Molet and Pohl, 2013).

En la generación de animales modificados genéticamente el procedimiento más simple comprende la inyección directa de ADN exógeno en gametos o cigotos. La capacidad de manipulación de retrovirus ha permitido, por su parte, la introducción de forma más sofisticada de mayores cantidades de ADN exógeno. En ambos casos, el principal problema de estas prácticas es la integración aleatoria en el genoma del material introducido. Fue a partir de los años 80 cuando se desarrolló la generación de modificaciones a partir de la recombinación homóloga, lo cual permitió la integración del material exógeno de forma controlada (Bouabe and Okkenhaug, 2013; Freichel et al., 2011).

Dentro de las múltiples estrategias y metodologías en la generación de animales transgénicos, los principios básicos se fundamentan en la introducción de genes exógenos o en la modificación de los genes endógenos. En el primer caso, la introducción de genes suele conducir a la ganancia de la función, ya que se suman la actividad del gen endógeno funcional y la del transgen, generalmente también funcional. En el segundo caso, la inactivación es la modificación más habitual, ya que la mayoría de modificaciones se orientan a interrumpir la actividad del gen endógeno (Doyle et al., 2012; Mogil and Grisel, 1998; Mogil et al., 2000). Para la investigación de las vías de señalización del dolor el método más empleado, con diferencia, ha sido el del desarrollo de animales con inactivación de genes endógenos, pérdida de función o *knock-out* (Mogil and Grisel, 1998; Mogil et al., 2000).

Algunos ejemplos son los animales deficientes para las neurotrofinas y sus receptores (NGF/TrkA y p75), los mediadores periféricos de la nocicepción e hiperalgesia (Interleuquina 6, receptores de bradiquinina o receptor de sustancia P entre otros), los receptores opioides (δ o μ), los receptores adrenérgicos o las moléculas intracelulares como las fosfoquinasas A y C (PKA y PKC) revisados en Mogil and Grisel (1998). Prácticamente con cada nuevo receptor o canal iónico identificado o vinculado a la nocicepción se ha creado un animal *knock-out* (Patapoutian et al., 2009). En el caso de los canales TRP los modelos de pérdida de función ha sido la estrategia más ampliamente seguida por los distintos grupos de investigación (Flockerzi and Nilius, 2014). Así podemos encontrar modelos *knock-out* para TRPV1 (Caterina et al., 2000), TRPV2 (Park et al., 2011), TRPA1 (Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006) o TRPM8 (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007). Desde hace una década existe una base de datos online que recoge de forma actualizada los distintos modelos transgénicos desarrollados implicados en la percepción del dolor (<http://www.jbldesign.com/jmogil/enter.html>) (Lacroix-Fralish et al., 2007) dado el crecimiento exponencial de los mismos.

Sin embargo, los modelos de pérdida de función o *knock-out* presentan ciertas limitaciones. Una de las críticas más comunes se debe a que posibles efectos compensatorios por la pérdida de un gen pueden enmascarar el fenotipo. Por otro lado, como ocurría con los primeros modelos *knock-out* para NGF o TrkA, la ausencia de un gen clave en el desarrollo de forma homocigota puede resultar letal, haciendo inviable el estudio del modelo (Freichel et al., 2011; Mogil and Grisel, 1998; Wolfer et al., 2002). La creación de animales transgénicos condicionales o inducibles, que ofrecen una restricción regional (tejidos específicos) o temporal (en determinados momentos del desarrollo), han permitido solventar en buena medida estos problemas (Doyle et al., 2012; Freichel et al., 2011; Lariviere et al., 2001).

En oposición a la eliminación de la expresión de genes, aunque basándose en las mismas estrategias genéticas clásicas y/o condicionales, se configuran los animales *knock-in* (Doyle et al., 2012; Freichel et al., 2011). Estos modelos introducen en las células o en el organismo bien un marcador para la

localización de la expresión del gen de interés, bien mutaciones funcionales para simular una sobreexpresión o una patología. En el campo de la nocicepción, los modelos *knock-in* se han desarrollado principalmente para delimitar la expresión de los canales iónicos o los receptores implicados en la transducción del dolor. El gen bacteriano para la beta-galactosidasa (LacZ) o la fosfolipasa alcalina fueron de los primeros marcadores empleados en los modelos de ratón. En términos generales, el marcador es expresado bajo la regulación del promotor del gen de interés permitiendo la localización de la expresión de dicho gen. Algunos ejemplos los encontramos con el modelo TRPM8 (Colburn et al., 2007) marcado con LacZ, TRPA1 marcado con la fosfolipasa alcalina (Kwan et al., 2006) o TRPV1 marcado con ambos (Cavanaugh et al., 2011a; Cavanaugh et al., 2011b).

Sin embargo, en los últimos años, las proteínas fluorescentes han surgido como una potente alternativa a los otros tipos de marcadores. La posibilidad de su visualización no invasiva y la monitorización en tiempo real *in vitro* e *in vivo* las han convertido en marcadores de interés. A partir de la proteína original, la proteína fluorescente verde (GFP), se han diseñado varios mutantes más termoestables, con la fluorescencia mejorada y diferentes variantes espectrales (Miyawaki et al., 2005; Shaner et al., 2007). Otros ejemplos de proteínas fluorescentes empleadas habitualmente son la proteína fluorescente amarilla (YFP), la proteína fluorescente azul (CFP) o proteínas fluorescentes con cromóforos rojos como la mRFP o el dímero en tándem tomate (tdTomato) (Freichel et al., 2011). El abanico de marcajes de distinto espectro combinado con la proliferación de animales condicionales para los diferentes genes de interés abre enormes posibilidades en la creación de zoos que permitan entender la compleja fisiología de canales iónicos como los TRPs (Wyatt et al., 2017). Algunos ejemplos de modelos marcados con proteínas fluorescentes son el de TRPM8 con GFP (Dhaka et al., 2008) o TRPV1 con dtTomato (Goswami et al., 2014; Mishra et al., 2011). En este punto, cabe mencionar el proyecto GENSAT (Atlas de expresión de genes del sistema nervioso, del inglés *Gene Expression Nervous System Atlas*) (<http://www.gensat.org/index.html>). GENSAT es un proyecto ideado para la generación de transgénicos condicionales, así como transgénicos marcados con la GFP cuyo objetivo es mapear la expresión de distintos genes en cerebro y sistema nervioso. Dentro de la base de datos de su página web es posible localizar y adquirir modelos de marcaje con GFP para canales iónicos y receptores presentes en el sistema nervioso y relacionados con el dolor.

La generación de un modelo animal, en ocasiones denominado "*knock-add-on*" va un paso más allá respecto a los modelos *knock-in* de marcaje. El marcador, generalmente una proteína fluorescente, se introduce en el marco de lectura de la proteína de interés, lo cual conduce a la expresión de una proteína modificada (Freichel et al., 2011). Este tipo de modelos permiten la identificación y localización de la expresión de un determinado gen. Pero además, permiten el estudio del transporte a membrana o cambios en la expresión de la proteína de interés a tiempo real, *in vitro* e *in vivo* bajo condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (Freichel et al., 2011). Actualmente, los ejemplos de generación de este tipo de modificaciones en proteínas de membrana son escasos. El primer ejemplo descrito fue el de la generación del receptor δ -opioides marcado fluorescentemente (Scherrer et al., 2006), y todas las publicaciones derivadas de la creación de este modelo muestran el potencial del mismo. Este modelo ha permitido el estudio de la expresión y la funcionalidad de este receptor, así como el análisis de respuestas ante estímulos endógenos y exógenos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Ceredig and Massotte, 2014; Gendron et al., 2015). Basándose en la misma estrategia que para el receptor δ -opioides se han desarrollado también modelos *knock-add-on* para el receptor mu-opioides (Erbs et al., 2015), el canal de calcio 3.2 (Cav3.2) (Francois et al., 2015) o los receptores de galanina 1 y 2 (Kerr et al., 2015).

No se tiene constancia de que este tipo de modelos se hayan desarrollado para ningún termoTRPs. Sin embargo, éstos posibilitarían la localización de los termoTRPs implicados en la nocicepción y la identificación de poblaciones celulares. Pero, además, aumentarían la comprensión de mecanismos reguladores ante diferentes estímulos, la identificación de heterómeros o la interacción con otras proteínas. Todo ello, además de ampliar el conocimiento actual en los procesos moleculares y celulares que los involucran, posibilitaría diseñar y desarrollar mejores fármacos.

CRISPR-Cas9

Las técnicas genéticas en el campo de la investigación del dolor han sido empleadas abundantemente tanto en la clonación de proteínas implicadas en la transducción del dolor como en la generación de animales transgénicos (Freichel et al., 2011; Sexton et al., 2018; Sun et al., 2016). En este sentido, la aparición de nuevas técnicas de modificación genética como las nucleasas con dedos de zinc (ZFN, del inglés *Zinc-Finger Nuclease*), las nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN, del inglés *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*) o las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) están redefiniendo los límites de la investigación biológica.

En concreto, el sistema CRISPR es el que en el último lustro se está perfilando como la tecnología de modificación genética por excelencia dada su mayor eficiencia y especificidad respecto a sus competidoras (Hay et al., 2017). En el campo de la investigación del dolor el potencial de esta tecnología se fundamenta en la posibilidad de crear modelos tanto en línea germinal como a nivel somático con mutaciones puntuales, deleciones, inserciones o reordenamientos cromosómicos de forma más simple y rápida que las técnicas de modificación genética clásicas (Sun et al., 2016).

El sistema CRISPR/Cas se corresponde con un tipo de sistema inmune adquirido presente en arqueas y bacterias (Mojica et al., 2009). Aunque su evolución y diversidad es extensa (Makarova et al., 2011; Makarova et al., 2015), su uso en la edición del genoma de mamíferos se ha centrado en el tipo dos, formado por la endonucleasa Cas9 para la ingeniería del genoma (Jinek et al., 2012; Ran et al., 2013b).

El sistema CRISPR/Cas9 se fundamenta en una secuencia de ARN guía quimérica (ARNsg), formada por la fusión de las secuencias ARNcr y ARNtracr, capaz de guiar a la endonucleasa Cas9 hacia una secuencia diana, donde ésta última creará una rotura de doble cadena en el ADN. El ARNcr se corresponde con una secuencia de unos 20 nucleótidos y finaliza con una secuencia denominada de motivo adyacente protoespaciadora (PAM, del inglés *Protospacer Adjacent Motif*). Esta secuencia PAM se compone de 3-5 nucleótidos generalmente y resulta específica para la bacteria de la que Cas9 es originaria (5'-NGG-3' para la enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, por ejemplo). El ARNtracr es una secuencia permanente cuya fusión con el ARNcr conforma el ARNsg y hace posible el reconocimiento del éste último por la Cas9. La secuencia genómica homóloga a la secuencia ARNcr con la secuencia PAM es cortada por el complejo Cas9-ARNsg en la hibridación ADN:ARN (Figura 6).

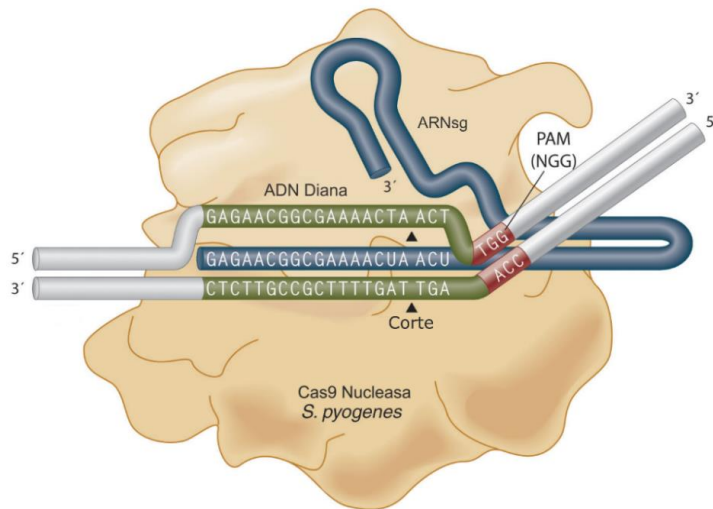


Figura 6. Esquema del complejo CRISPR/Cas9. La endonucleasa Cas9 de *S. pyogenes* (estructura en marrón) forma un complejo con el ARNsg (en azul). El corte de la Cas9 se produce en la secuencia genómica homóloga (en verde) a la secuencia diana del ARNsg 3 nucleótidos aguas arriba de la secuencia PAM (en rojo) (Imagen adaptada de Schildkraut et al., 2017).

La doble rotura en el ADN genómico producida por la Cas 9 a 3 nucleótidos aguas arriba de la secuencia PAM activa los mecanismos celulares de reparación de ADN. Los dos mecanismos principales son el sistema de reparación NHEJ (*Non-Homologous End Joining*) y el sistema de reparación HR (*Homologous Recombination*). El primero es el que se activa más frecuentemente y habitualmente genera mutaciones aleatorias en el punto de la reparación creando inserciones y deleciones no controladas. El segundo sistema se activa más raramente, requiere de una secuencia molde para la reparación y da la posibilidad de crear mutaciones puntuales o inserciones dirigidas a través de la secuencia molde. En ambos casos, las mutaciones producidas pueden llevar al silenciamiento o activación, represión o expresión de genes de interés de forma focalizada a través de las secuencias diana.

El crecimiento y uso de esta tecnología de edición genética desde su aparición está teniendo un crecimiento exponencial (Adli, 2018; Ledford, 2015). Sin embargo, los estudios de CRISPR en DRG se han limitado por el momento a la investigación de la expresión y diversificación de Runx3 en el desarrollo neuronal (Appel et al., 2016) y a la edición del epigenoma como estrategia para la neuromodulación (Stover et al., 2017). A pesar de ello, el potencial de esta tecnología para el desarrollo de modelos neuronales patológicos, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas así como la investigación en el dolor están ampliamente aceptados (Feng et al., 2018; Hay et al., 2017; Kolli et al., 2018; Powell et al., 2017; Sun et al., 2016).

Modelos celulares

Los cultivos neuronales primarios han supuesto la base para responder preguntas básicas de la neurobiología y del neurodesarrollo. Su capacidad para retener buena parte de las características de neuronas *in vivo* ha permitido el estudio de la formación y elongación de neuritas, la formación de sinapsis, la liberación de neurotransmisores, la señalización de factores neurotróficos y el transporte de proteínas intracelulares (Malin et al., 2007; Melli and Hoke, 2009; Owen and Egerton, 2012). En el caso de los DRG, el cultivo primario de neuronas sensoriales se puede llevar a cabo a partir de distintas especies y en distintos estadios del desarrollo (embrionario, neonatal o adulto) (Malin et al., 2007). Así, este tipo de cultivo ha permitido el estudio electrofisiológico y farmacológico, bajo condiciones muy controladas, tanto de la respuesta a distintos estímulos físicos y químicos, como la liberación de neurotransmisores o como la transducción de señales nocivas, ayudando, además, a la identificación de mediadores del dolor en la superficie celular (Melli and Hoke, 2009; Wang and Wang, 2003).

A pesar del extendido uso de los cultivos primarios en la investigación del dolor, éstos presentan una serie de limitaciones importantes que han de considerarse. El limitado número de células del que se dispone hace inviable, por ejemplo, el cribado de alto rendimiento de compuestos farmacológicos. Además, la supervivencia del cultivo resulta limitada en el tiempo. El aislamiento celular resulta un proceso técnico y que puede consumir bastante tiempo. La heterogeneidad del tejido, y la necesidad ocasional del aislamiento de los distintos tipos celulares puede resultar problemático. Por último, la dependencia de animales conduce a una parte administrativa a tener en cuenta al requerirse la aprobación por parte de los Comités Éticos de Investigación (Geuna et al., 2016; Gordon et al., 2013; Melli and Hoke, 2009; Wang and Wang, 2003; Yin et al., 2016).

En un intento de solventar estos inconvenientes, principalmente el de la heterogeneidad y la limitación del número de células, se han tratado de desarrollar líneas celulares que permitan un cultivo homogéneo y sostenido en el tiempo. Las estrategias seguidas a este respecto resultan variadas. Por una parte, se han desarrollado líneas celulares derivadas de tumores neuronales. Por otra parte, se han tratado de inmortalizar tipos celulares tanto con la creación de hibridomas, a través de la fusión de células diferenciadas con líneas celulares ya inmortales, es decir, tumorales, como con la inmortalización de células sensoriales a través de la transformación con virus (Gottlieb, 2002).

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y es una de las líneas celulares derivadas de la primera estrategia de uso bastante extendido. Aunque fue generada a partir de la subclonación de una línea celular procedente de un tumor óseo metastásico (Biedler et al., 1973; Biedler et al., 1978), es posible inducir un fenotipo neuronal mediante la adición de factores de crecimiento como el NGF. Esta línea celular es capaz de expresar marcadores neuronales inmaduros y, una vez diferenciadas, morfológicamente son similares a neuronas primarias. Las SH-SY5Y son empleadas comúnmente como neuronas adrenérgicas o dopaminérgicas, aunque presentan ciertos rasgos de neuronas sensoriales periféricas (Yin et al., 2016). La posibilidad de ser transfectadas ha sido lo que ha permitido la generación de líneas estables con canales iónicos típicos de nociceptores interesantes para el estudio del dolor (Dekker et al., 2005; Lam et al., 2007).

Otras líneas secundarias que también son empleadas como modelos neuronales a pesar de no derivar de tumores neuronales son las NT2 o las PC12. La línea NT2 se corresponde con una línea celular derivada de teratocarcinoma mientras que la línea PC12 deriva de un feocromocitoma de médula suprarrenal. Ambas líneas son inducibles a tipologías neuronales a través de la adición de compuestos como el ácido retinoico o el NGF (Gordon et al., 2013). Esta particularidad ha sido ampliamente

analizada en investigaciones de desarrollo de neuritas y han llevado a establecer estas líneas celulares como modelos validados para estudios de neurotoxicidad, en particular la línea PC12 (Harrill and Mundy, 2011; Shafer and Atchison, 1991).

Derivadas de la segunda estrategia, con la inmortalización a partir de la creación de hibridomas, se han generado la línea F-11 y la línea ND. Ambas se corresponden con la fusión de células procedentes de un neuroblastoma, el N18Tg2 en ambos casos, y neuronas sensoriales de DRGs embrionarios para las F11 y adultos para las ND. Ambas líneas han sido empleadas para estudiar la respuesta de diversos estímulos y agentes proinflamatorios como bradiquinina, prostaglandinas, capsaicina y opiodes. Esto es debido a la expresión de marcadores neuronales en su superficie celular, así como presentar membranas excitables, rasgo típico de las neuronas sensoriales. Otra de sus particularidades es la posibilidad de expresar otros marcadores neuronales induciendo su diferenciación (Wang and Wang, 2003).

De forma más o menos generalizada, las líneas SH-SY5Y, F-11 y ND han sido empleadas como modelos adecuados para la estudiar los mecanismos de activación de los nociceptores. Sin embargo, estas líneas celulares no reproducen fielmente las características de los cultivos primarios de DRGs. Un estudio reciente de transcriptómica que comparaba DRGs con estas líneas celulares mostró que, a pesar de detectar la expresión de múltiples receptores y canales iónicos relevantes en la nocicepción, ninguna de ellas se ajustaba a ninguna categoría neuronal periférica existente (Yin et al., 2016).

Por su parte, la inmortalización a partir de la transformación con virus trata de salvar los inconvenientes de los hibridomas. Por ejemplo, la línea H10.6 (Raymon et al., 1999), generada a través de la introducción de un oncogen en DRGs embrionarios humanos, o la línea 50B11 (Chen et al., 2007) con similar estrategia pero en DRGs embrionarios de rata, son líneas que tratan de asimilarse todo lo posible a los cultivos primarios de DRGs. En la obtención de la línea H10.6 se señaló la capacidad de ésta para madurar *in vitro*, expresando marcadores neuronales y disparando potenciales de acción (Raymon et al., 1999). Sin embargo, más allá de esta caracterización no existe literatura relacionada con estudios farmacológicos y no se encuentra disponible para su uso en investigación (Gottlieb, 2002; Melli and Hoke, 2009). Para la línea 50B11 se ha descrito que presenta marcadores característicos de nociceptores como TRPV1, TrkA o c-Ret tras la diferenciación (Chen et al., 2007). Presenta, también, desarrollo de neuritas y potenciales de acción por lo que se especulan como potenciales usos de esta línea celular los ensayos de crecimiento de neuritas y rastreo de alto rendimiento de compuestos analgésicos, test de degeneración axonal y test de neurotoxicidad (Bhattacharjee et al., 2014; Melli and Hoke, 2009). Sin embargo, la reducida viabilidad post diferenciación (72 horas) limita su uso a ensayos de corto plazo (Geuna et al., 2016).

Por otra parte, siguiendo el principio de inmortalización a través de la transfección con virus Jat et al. (1991) creó la cepa de ratón H-2Kb-tsA58 o *Immortomouse*. Esta cepa de ratón transgénico modificado con el virus sv40, ha posibilitado la obtención de líneas celulares inmortales con la aplicación de IFN- γ y la incubación a 33°C. Así se han podido desarrollar diversas líneas celulares de tipo renal (Takacs-Jarrett et al., 1998), hepático (Allen et al., 2000), muscular (Morgan et al., 1994), epitelial (Dixon et al., 2011) y neuronal (Anitha et al., 2008; Hugnot et al., 2001; Matuszyk et al., 2003). Un ejemplo de ello es la línea celular MED17.11, generada a partir del aislamiento y desarrollo de clones de DRGs embrionarios de *Immortomouse* (Doran et al., 2015). Con un protocolo que combina factores inductores de la formación de neuritas y maduración de nociceptores se ha descrito que en una semana las células presentan marcadores característicos de linajes sensoriales como TRPV1, Nav1.7 y Piezo2. Una vez diferenciadas muestran también respuesta ante la aplicación de estímulos como la capsaicina, la veratridina o mediadores inflamatorios como la bradiquinina y la histamina (Doran et al., 2015). Estas

características la convierten en una interesante línea celular para el estudio de la nocicepción aguda, el desarrollo de neuritas y la maduración de DRGs (Doran et al., 2015). Además de no presentar la limitación temporal presente en la línea 50B11, dado su origen, una cepa de ratón, esta línea celular resulta comparable con los modelos animales desarrollados, muchos de ellos en ratón. Por último, la capacidad de esta línea para ser transfectada abriría la posibilidad de su modificación permitiendo la generación de modelos *in vitro* equiparables a los modelos *in vivo*.

Actualmente son muchas y diversas las estrategias moleculares, celulares y animales que han ayudado en la investigación de la fisiopatología del dolor. Sin embargo, las importantes limitaciones técnicas y temporales conllevan que sea necesario el desarrollo de nuevas herramientas tanto animales como celulares. Gracias a éstas, la evaluación desde múltiples perspectivas y a diferentes niveles del organismo permitiría dibujar un esquema más preciso de las alteraciones relacionadas con el dolor. Además, este esquema daría lugar a un refinamiento en el desarrollo de terapias analgésicas permitiendo ser mucho más selectivo en las elecciones en función de la patología y de la respuesta individual de cada paciente.



OBJETIVOS



El dolor es el resultado de un complejo procesamiento de señales neuronales en los diferentes niveles del sistema nervioso del que se han podido identificar sólo algunos mecanismos bioquímicos, moleculares y celulares. El objetivo principal de este trabajo es el de proveer de nuevas herramientas que permitan estudiar y ampliar el conocimiento de estos mecanismos, principalmente los implicados en la transducción de las señales nocivas en neuronas sensoriales, los nociceptores. Estas herramientas se componen, por una parte, de un modelo animal transgénico *knock-add-on* que exprese el canal iónico TRPV1 ligado a la proteína fluorescente amarilla YFP para estudiar la dinámica *in vivo* de este receptor, especialmente en procesos inflamatorios. Por otra parte, un modelo celular que permita la obtención de nociceptores *in vitro*, dada la dependencia actual de cultivos primarios para el estudio de este tipo celular. Adicionalmente se explorará la implementación de nuevas herramientas de modificación genética de reciente aparición, CRISPR-Cas9, para la generación acelerada de nuevos modelos animales, y modelos celulares. Esta herramienta, además permitiría la modificación del modelo *in vitro* de nociceptores asemejando éste a los distintos modelos animales de los que se disponen para el estudio del dolor. A través de ambos modelos, animal y celular se amplía el conocimiento de rutas de señalización, de activación, de potenciación y/o de cronificación del dolor aportando información fundamental para el diseño racional de nuevos compuestos analgésicos. Adicionalmente, el modelo animal permite estudiar la función del canal TRPV1 en otros tejidos no neuronales tanto en situaciones fisiológicas como patológicas y el modelo celular establece un soporte, actualmente muy limitado, para el desarrollo y cribado de compuesto analgésicos en plataformas de alto rendimiento.

De forma específica, los objetivos planteados son:

1. Generación de un modelo animal con el receptor TRPV1 fusionado a la proteína fluorescente amarilla (YFP) creando un ratón *knock-add-on* homocigoto.
2. Caracterización del receptor YFP-TRPV1 en fibras aferentes y nociceptores de ratones *knock-add-on* heterocigotos y homocigotos.
 - 2.1. Evaluación de la transcripción del canal iónico YFP-TRPV1 en ratones heterocigotos y homocigotos.
 - 2.2. Evaluación de la expresión de la proteína de fusión YFP-TRPV1 en animales heterocigotos y homocigotos.
 - 2.3. Análisis de la funcionalidad del receptor YFP-TRPV1 en ratones *knock-add-on* homocigotos.
3. Comprobación de la efectividad de CRISPR/Cas9 en la modificación genética y generación de modelos *knock-in* / *knock-add-on* en sistemas *in vitro*.
4. Caracterización de la línea celular MED17.11 diferenciable a nociceptores *in vitro*.
 - 4.1. Reproducción de los protocolos de diferenciación de la línea MED17.11.
 - 4.2. Análisis de la viabilidad funcional de la línea MED17.11 como modelo celular de nociceptor.

RESULTADOS

UNIVERSITAS

Miguel
Hernández

Modelo animal YFP-TRPV1

Para la generación del modelo animal *knock-add-on* YFP-TRPV1 se siguió el mismo enfoque utilizado por Scherrer et al. (2006) para la generación del receptor δ -opioides marcado fluorescentemente. A través de recombinación homóloga, la proteína fluorescente amarilla se introdujo dentro del marco de lectura del gen TRPV1 de ratón. La expresión de este locus modificado conduce a la generación de la proteína de fusión YFP-TRPV1 en el animal.

Experimentos anteriores llevados a cabo por el grupo del Dr. Ferrer-Montiel compararon el efecto de la introducción del marcador en el extremo N- o C-terminal de TRPV1 (datos no publicados). Los análisis de expresión y de funcionalidad revelaron que la presencia de la proteína fluorescente en el C-terminal disminuía la expresión del canal iónico. Sin embargo, la fusión de ésta por el N-terminal no alteraba ni el funcionamiento ni la expresión del canal. Estos datos avalaron el diseño de un vector para la recombinación homóloga que introdujera la YFP en el codón de inicio de TRPV1 (N-terminal proteico) situado en el exón 2 del locus de TRPV1 (Figura 7A).

Para la obtención de los animales genéticamente modificados, los animales quimera, se llevó a cabo un acuerdo de colaboración entre el grupo del Dr. Ferrer-Montiel y los servicios técnicos del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) de la Universidad Autónoma de Barcelona. El diseño de la modificación genética, la generación del vector de recombinación y el testado de clones de ES-129Sv fueron competencias de este trabajo, mientras que la recombinación homóloga para la obtención de clones, el aislamiento de los mismos, la inyección en blastocistos, la transferencia y la cría de los animales quimera obtenidos hasta su transporte correspondió a los servicios del CBATEG.

Obtención y análisis de clones recombinantes

Construido el vector de integración pKO-YFPTRPV1 (Figura 33, en Materiales y Métodos), la recombinación homóloga se llevó a cabo con la transfección de éste en células ES129SvEv (células ES, del inglés *embryonic stem cells*) por los servicios del CBATEG. La selección de aquellos clones que integraron en su genoma dicho vector a través del aislamiento de células resistentes a la Neomicina (NeoR) (Figura 7A-B) condujo al aislamiento de más de 300 clones. Tras su expansión y su envío a nuestro laboratorio, se procedió al análisis vía Southern Blot, PCRs largas y PCRs anidadas para la selección de al menos un clon con la integración del vector en el locus de TRPV1 (Figura 7B).

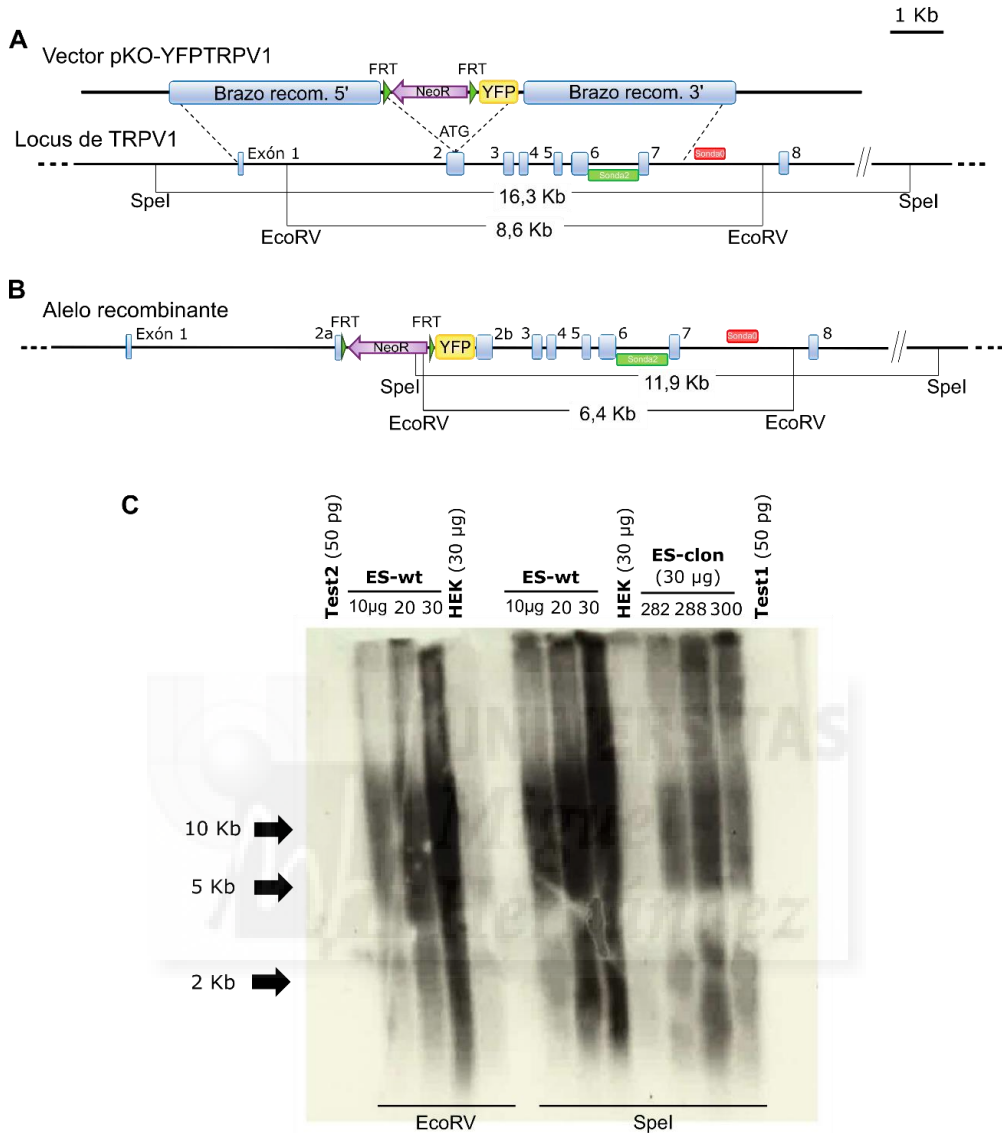


Figura 7. Esquema de recombinación e integración de YFP en TRPV1 junto con prueba de Southern-blot. A) Esquema de la recombinación del vector pKO-YFPTRPV1 en el locus wild type (wt) de TRPV1. Marcados los tamaños de las bandas generadas con la digestión de las enzimas EcoRV y SpeI. B) Esquema del locus de TRPV1 tras recombinación. Marcados los tamaños de las bandas generadas con la digestión de las enzimas EcoRV y SpeI C) Revelado de un Southern blot llevado a cabo con el marcaje de sonda 2 que recoge las distintas comprobaciones llevadas a cabo con esta técnica. Test 1 y Test 2 señalan amplificaciones de unas 2,3 Kb para el testado de sensibilidad de la sonda. ES-wt se corresponde con ADN de células madre no recombinadas para el control negativo de la integración, digerido con las enzimas EcoRV y SpeI se cargaron distintas cantidades de ADN para establecer la cantidad mínima necesaria. ES-clon se corresponde con el ADN de 3 clones distintos digeridos todos ellos con SpeI de los que se cargaron la máxima cantidad de ADN analizada.

En el caso de los Southern blot, limitaciones infraestructurales para el trabajo con radioactividad condujeron al empleo de una estrategia por etapas para esta técnica. En una primera etapa, la sonda para la identificación de los clones fue diseñada y sintetizada por nuestro grupo. Además, los ADNs genómicos (ADNg) de los controles (ES-wt) y de los distintos clones (ES-clones) fueron extraídos, digeridos y transferidos a membranas de nylon en nuestros laboratorios. En una segunda etapa, los servicios del CBATEG se encargaron del marcaje de la sonda, así como, de la hibridación y revelado de las membranas que eran enviadas por el grupo.

En las primeras membranas reveladas, la presencia de manchas (*smear*) por parte del ADN cargado, pero sin bandas reconocibles ni en los controles ni en los clones, llevaron a la puesta a punto del procedimiento. Se realizó el diseño y testado de nuevas sondas y se practicaron distintos ajustes y controles de calidad sobre las condiciones de transferencia (depurinización de las bases), de hibridación (rangos de incubación de 2 horas a toda la noche) y de revelado (rangos de exposición de 2 horas a toda la noche). Se corroboró que la sensibilidad de las sondas llegaba hasta límites de detección inferiores a los 0.5 ng de ADN (Figura 7C). Sin embargo, ni la variación en las enzimas de digestión empleadas para el procesado de las muestras (EcoRV y SpeI), ni la variación en los procedimientos de digestión (con incubaciones toda la noche) ni el empleo de distintas cantidades de ADN total cargado y transferido a las membranas (rangos de 10 µg a 50 µg) dieron lugar a la identificación de un clon recombinante con la inserción adecuada (Figura 7C). Los resultados fallidos con la técnica de Southern Blot hicieron necesario el uso de otros métodos.

Fue por ello que se trabajó en la realización de PCRs largas que permitieran la identificación de la inserción de YFP en el locus de TRPV1 con la orientación deseada (5'-3'). Se diseñaron y comprobaron distintas parejas de cebadores que abarcaran bien desde las secuencias insertadas (casete de resistencia a la Neomicina o YFP) bien desde el brazo de recombinación 5', hasta regiones aguas abajo del locus de TRPV1. Por otra parte, también se diseñaron y testaron parejas de cebadores que abarcaran desde regiones aguas arriba a la inserción hasta, bien el casete de NeoR, bien la YFP, bien el brazo de recombinación 3' (ANEXO I, Figura I). En los casos en los que las parejas de cebadores se situaban en los brazos de recombinación 5' o 3' y aguas arriba o aguas abajo de los mismos, el ADNg de las células madre ES129Sv sin modificar (ES-wt) era usado como control positivo metodológico (Figura 8A). La efectividad de esta estrategia resultó muy baja. Se testaron más de 50 parejas de cebadores, con distintas polimerasas y distintas condiciones de amplificación (cantidad de molde, concentración de Mg²⁺, presencia de DMSO, temperatura de hibridación, tiempo de elongación o número de ciclos) (ANEXO I; Tabla I y Tabla II). En 3 ocasiones las parejas y las condiciones de la PCR, originaron amplificaciones de tamaño tal que permitieron la distinción entre la no inserción y la inserción de la YFP (Figura 8B) de forma reproducible.

Modelo animal YFP-TRPV1

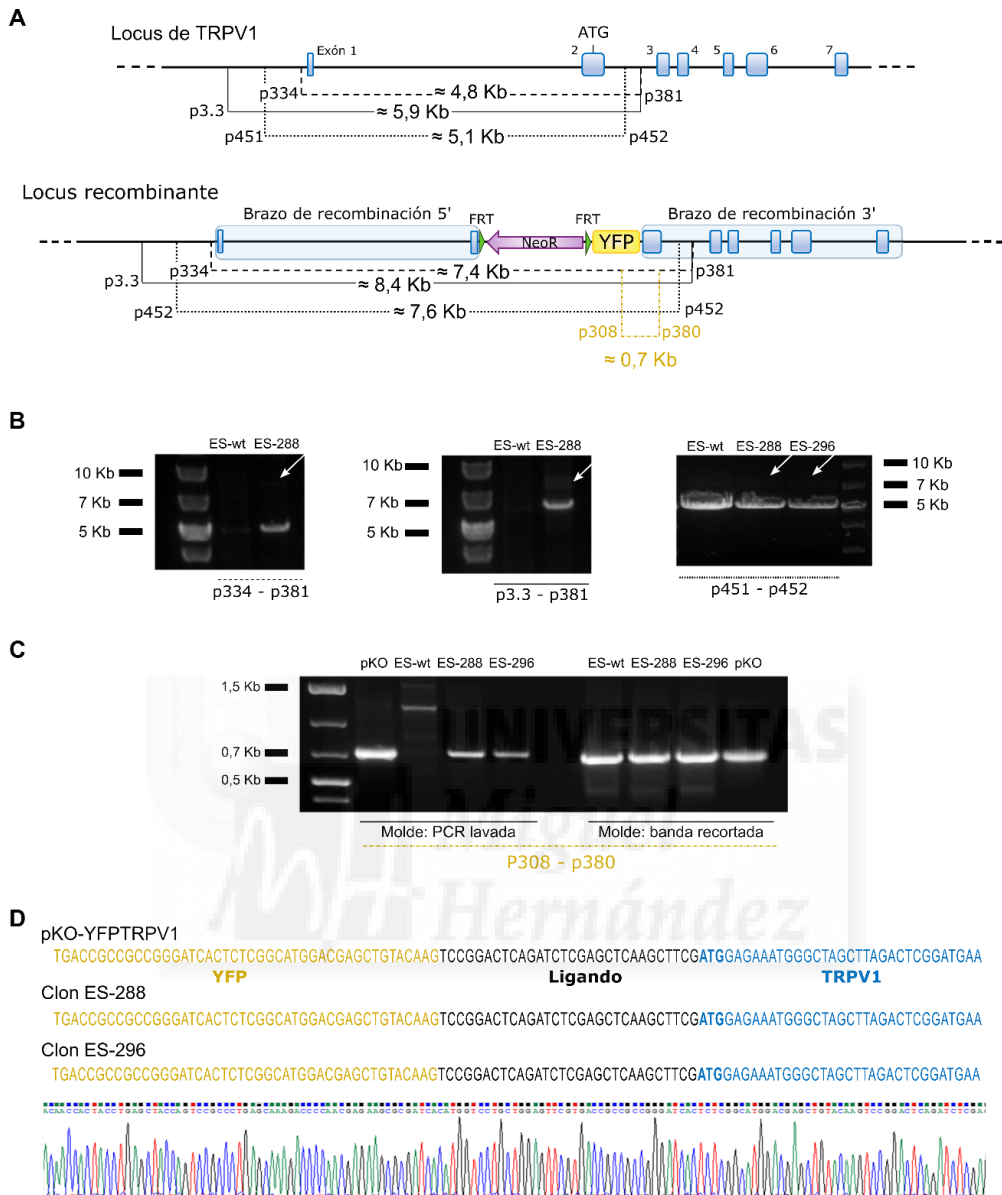


Figura 8. PCR largas y anidadas para la identificación positiva de clones recombinantes. A) Esquemas correspondientes a la ubicación de cebadores y amplificaciones esperadas en PCR largas en alelo wt (arriba) y alelo recombinante (abajo). En amarillo se señala la ubicación del segundo amplicón en la PCR anidada. B) Electroforesis de las PCRs largas desde ADN_g de ES- wt y del clon ES-288 para cada una de las 3 parejas de cebadores con doble banda. Las flechas señalan una segunda banda tenue detectada en el clon 288 correspondiente al inserto YFP (≈10 Kb). C) Electroforesis de la PCR anidada. Amplicones obtenidos en la segunda PCR empleando como moldes PCR “lavada” (izquierda) y banda recortada (derecha) de wt, clon 288 y clon 296. Se empleó como control positivo el vector pKO-YFPTRPV1 (en ambos extremos). D) Alineación de la secuenciación obtenida del segundo amplicón de la PCR anidada para el vector pKO-YFPTRPV1, el clon 288 y el clon 296. Abajo se incluye el cromatograma obtenido igual para las tres muestras.

Aunque las PCR largas apuntaban a la inserción de la YFP en el locus de TRPV1 obteniendo tenues bandas con los tamaños similares a los esperados (Figura 8B), la baja concentración de este amplicón extraído hizo inviable la secuenciación del mismo. Ante la imposibilidad de confirmar que dicha amplificación correspondiera con la inserción buscada, se optó por el diseño de una PCR anidada. Empleando como molde producto de las PCR largas, se llevó a cabo una segunda PCR que amplificara exclusivamente desde YFP al brazo de recombinación 3' (Figura 8A). Se decidió procesar la primera PCR siguiendo dos metodologías distintas. Por una parte, se lavaron y limpiaron con kits estándar las PCRs, obteniendo y empleando entonces como molde el conjunto de las amplificaciones obtenidas a partir de ES-wt o ES-clon. Por otra parte, se llevaron a cabo recortes de las amplificaciones y extrayendo éstas desde los geles de agarosa, los moldes se restringían a las bandas correspondientes al alelo wt o al alelo recombinante de ES-wt o ES-clon. Las segundas PCRs mostraron cómo algunos clones daban lugar a amplificaciones de la YFP, independientemente del procesado seguido con el molde. (Figura 8C). Por el contrario, los resultados obtenidos a partir del ADN_g de ES-wt resultaron controvertidos al mostrar amplificación de similar tamaño en las muestras en las que se empleó como molde banda recortada de muestras de ES-wt (Figura 8C). Se requirió la confirmación de la inserción a través de secuenciación. Ésta verificó que los amplicones de la segunda PCR se correspondían con YFP y parte del brazo de recombinación 3' (Figura 8D) e identificaron entre otros al clon ES-288 (denominación arbitraria) como un clon con la inserción en TRPV1 de la YFP.

Dicha identificación trató de validarse a través de la secuenciación completa del exoma, pero la baja cantidad de muestra junto con una ligera degradación de la misma impidió que ésta se pudiera llevar a cabo. A pesar de ello, la confirmación por secuenciación era reproducible y se contactó con los servicios del CBATEG para que procedieran con la inyección del clon ES-288 en blastocistos.

Generación de quimeras, heterocigotos y homocigotos YFP-TRPV1

Previo a la inyección, como control del estado y viabilidad de las células ES-288 se realizó un cariotipaje que resultó en un 78% de euploidía. Estos resultados permitieron continuar con este clon seleccionado.

Las inyecciones programadas de blastocistos y las transferencias de éstos a madres incubadora dieron lugar a un total de 9 animales quimera, 5 machos y 4 hembras en los servicios del CBATEG (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los animales quimera obtenidos a partir de las transferencias realizadas. Se incluye además del número de animales, la fecha de nacimiento, el porcentaje (%) de quimerismo, si estos sobrevivieron y cuáles transmitían la modificación a la descendencia. El % de quimerismo se estableció por el color del pelaje pudiendo variar éste a lo largo del desarrollo.

Transfer	Quimeras	Fecha Nacimiento	% Quimerismo	Sano	Transmisión de la modificación
B3	1 Macho	15-06-15	75 %	Si	Sí
B3	2 Hembras	15-06-15	75 %	Si	No
B7	1 Macho	16-06-15	60-70 %	Si	No
B8	1 Hembra	21-06-15	75 %	Si	No
B13	1 Macho	27-06-15	60-70 %	Ataxia/recuperado	Sí
B14	2 Machos	27-06-15	75 %	No (Ataxia y fallecimiento)	-
B14	1 Hembra	27-06-15	75 %	No (Ataxia y fallecimiento)	-
TOTAL	5 Machos 4 Hembras				

De las quimeras obtenidas, sólo 6 animales fueron recepcionados en los Servicios del Animalario de Elche, al producirse la muerte de los otros (Tabla 1). El informe anatomopatológico de la necropsia solicitada estableció que la sintomatología y las lesiones macroscópicas y microscópicas resultaban compatibles con un proceso metabólico con principal afectación de las neuronas motoras. El diagnóstico final se correspondió con una encefalopatía metabólica incipiente. Esta observación no se consideró relacionada con la mutación introducida y las quimeras recepcionadas en nuestro laboratorio no presentaron ninguna anomalía ni malformación, ni signos de ataxia o comportamiento anómalo.

Los animales quimera (B6;129-TRPV1^{tm1(YFP)}) fueron cruzados con animales C57Bl/6J.Ola.Hsd (B6) para la obtención de la primera generación heterocigota YFP-TRPV1. Los cruces establecidos con el objetivo de conseguir el máximo número de animales en el menor tiempo posible dieron lugar a camadas de unos 6,3 animales de promedio, dentro del rango normal de los animales B6 de $6,2 \pm 0,2$ (Nagasawa et al., 1973). El estado general de los animales era el adecuado sin observación de alteraciones físicas, fisiológicas o comportamentales.

Aunque el pelaje de las crías (agutí o negro) fue un indicador de la transmisión de la modificación en la primera generación F1 (Figura 9A), ésta fue confirmada a través del genotipado de los animales (Figura 9B-C). A través de PCRs de amplificación de YFP se testaron todas las crías obtenidas a partir de las quimeras, pudiendo establecer una primera generación heterocigota YFP-TRPV1 positiva (Figura 9B-C). Esto también nos permitió determinar que sólo 2 de las quimeras, el macho B3 del 15 de Junio y el macho B13 del 27 de Junio, transmitían la modificación a la descendencia y producían ratones heterocigotos (Tabla 1).

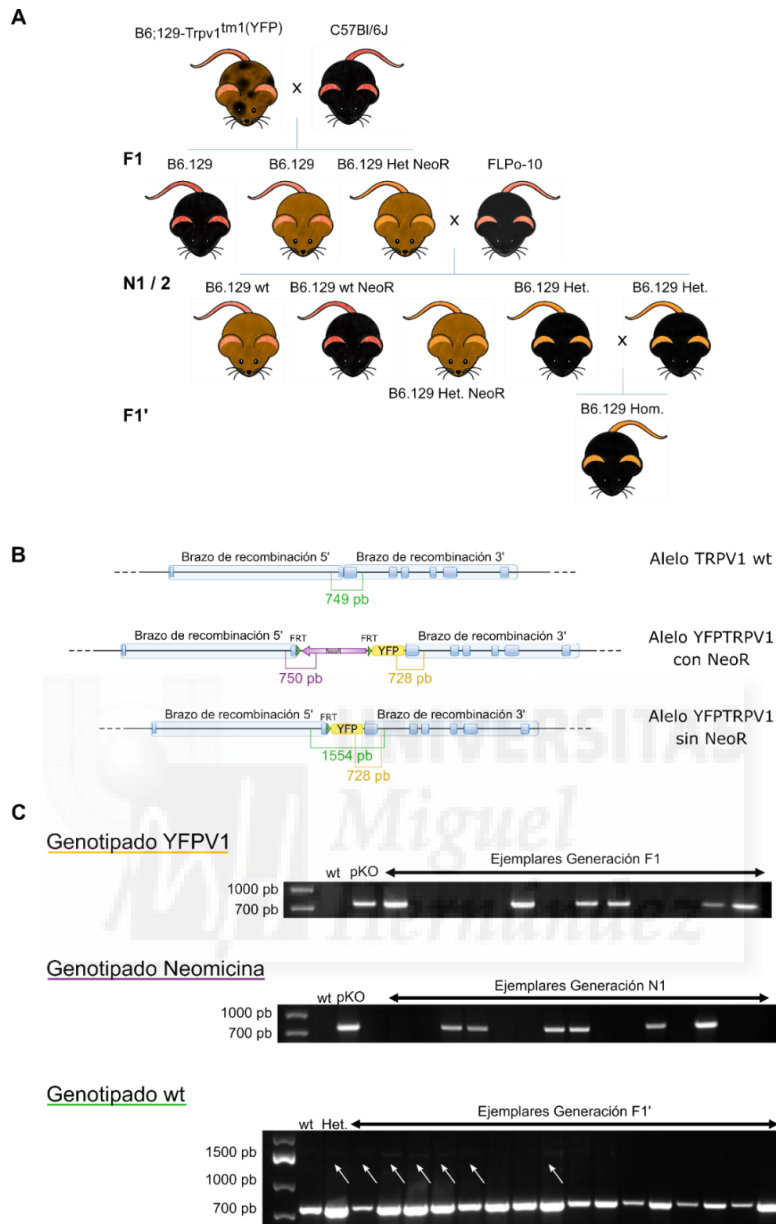


Figura 9. Esquema de cruces y genotipados llevados a cabo para la obtención de una generación homocigota YFP-TRPV1. A) Representación de cruces y generaciones obtenidas desde el primer cruce con animales quimera (B6.129-TRPV1^{tm1(YFP)}) y *wild type* (C57Bl/6J) hasta la generación F1' en la que se representa el genotipo objetivo, el homocigoto para nuestra mutación B6.129-V1^(YFP). Salvo en la última generación, se representan todos los genotipos obtenidos en cada generación marcándose con X los seleccionados para cruce. B) Esquema de los distintos alelos presentes en las distintas generaciones F1, N2 y F1' en los que se señalan los tamaños de las distintas PCRs positivas para cada genotipado. C) Electroforesis representativa de las distintas PCRs llevadas a cabo en cada una de las generaciones F1, N2 y F1' (de arriba a abajo). En la primera calle de todas ellas figura el marcador de peso molecular sobre el que se especifica el tamaño en pares de bases (pb). En el genotipado de YFPV1 y Neomicina se emplea como control positivo el vector PKO-YFPV1 y como negativo ADNg de wt. En el genotipado de wt se emplean dos controles positivos, ADNg de wt y ADNg de animales heterocigotos (YFPV1 Het). Las flechas blancas marcan la banda de aproximadamente 1500 pb presente en el caso de los animales heterocigotos.

Establecida la primera generación heterocigota, se procedió con el cruce de estos animales con los animales FLPo-10 (Figura 9A), paso necesario para la eliminación del marcador de selección de resistencia a la Neomicina (NeoR). La primera generación (N1) obtenida de este primer cruce fue retrocruzada una segunda vez con los animales FLPo-10 para la obtención de una segunda generación (N2). En estos cruces las tasas de reproducción se mantuvieron similares a las obtenidas con los animales quimera, y los animales generados nunca presentaron alteraciones físicas, fisiológicas o comportamentales identificables *de visu*. La escisión del casete de NeoR fue analizado a través del genotipado de las crías de la generación N1 y N2 (Figura 9B-C). Aproximadamente el 50% de los animales en la generación N1 y el 100% de animales en la generación N2 resultaron en ratones negativos a la resistencia de la Neomicina.

Animales de esta N2, heterocigotos para YFP-TRPV1 y negativos a la resistencia a la Neomicina fueron cruzados para la obtención de una generación homocigota de YFP-TRPV1 (Figura 9A). La identificación de estos animales homocigotos se llevó a cabo a través de una PCR entre ambos brazos de recombinación que producía un amplificado menor de 1 Kb en el alelo wt y de aproximadamente 1,5 Kb en el alelo YFP-TRPV1 sin la NeoR (Figura 9B). Estos cruces mantuvieron el número medio de crías por camada, y como en las anteriores generaciones, sin alteraciones reconocibles *de visu*. A lo largo de los genotipados, sin embargo, en la generación F1' sólo resultaron animales homocigotos para el alelo wt o heterocigotos para YFP-TRPV1, apareciendo una doble banda en las electroforesis para estos animales (Figura 9C). Aunque se comprobaron y repitieron los genotipados de los parentales y se establecieron más de 10 parejas diferentes entre animales N2, no se consiguió identificar ningún animal homocigoto para YFP-TRPV1.

Caracterización y análisis de la generación F1/N1-2

A lo largo del desarrollo del modelo animal se llevó a cabo una caracterización de los animales heterocigotos, con y sin NeoR. A través del análisis de ARN, inmunocitoquímicas y Western Blots se trató de identificar la expresión desde el genoma de la modificación introducida en TRPV1, así como la generación de la proteína de fusión YFP-TRPV1.

El análisis de expresión del alelo YFP-TRPV1 se realizó a través de PCRs a tiempo final a partir del ADNc de los principales tejidos nerviosos de expresión del canal TRPV1: cerebro, médula espinal, ganglios del trigémino y DRGs (Figura 10). Además de corroborar la expresión de TRPV1 (Figura 10A-C) se comprobó si era posible detectar el transcrito YFP-TRPV1 (Figura 10B-D) en animales heterocigotos con la resistencia a la Neomicina (Figura 10A-B) y sin ella (Figura 10C-D).

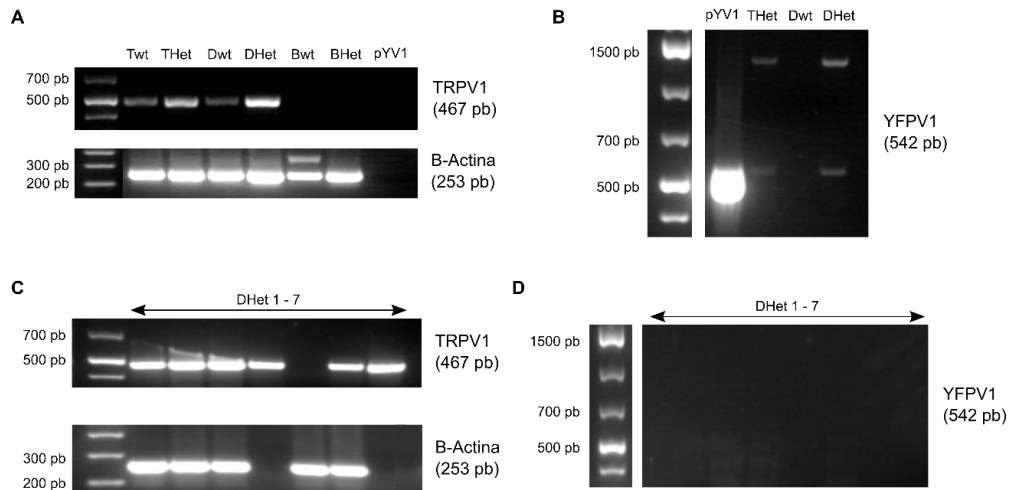


Figura 10. PCR a tiempo final desde ADNc para el análisis de expresión del transcrito de TRPV1 e YFP-TRPV1 en animales heterocigotos con y sin Neor. A) Electroforesis de PCR desde ADNc procedente de ganglios del trigémino (T), DRGs (D) y cerebro (B) de animales B6 (wt) y animales heterocigotos para YFPTRPV1 (Het) con el casete de NeoR de TRPV1. Como control de la retrotranscripción y estado del ADNc se incluyó una amplificación de la β -Actina. Como control metodológico se incluyó la PCR desde el vector de expresión pCI-neo-YFPTRPV1 (pYV1). B) Electroforesis de PCR desde ADNc procedente de ganglios del trigémino (T) y DRGs (D) de animales B6 (wt) y animales heterocigotos para YFPTRPV1 (Het) con el casete de NeoR de YFPTRPV1. Como control metodológico se incluyó la PCR desde el vector de expresión pCI-neo-YFPTRPV1 (pYV1). C) Electroforesis de PCR desde ADNc procedente de DRGs de animales heterocigotos para YFPTRPV1 (Het) sin el casete de NeoR. Como control de la retrotranscripción y el estado del ADNc se incluyó una amplificación de la β -Actina. D) Electroforesis de PCR desde ADNc procedente de DRGs (D) y cerebro (B) de animales B6 (wt) y animales heterocigotos para YFPTRPV1 (Het) sin el casete de NeoR de YFPTRPV1.

Las PCRs a tiempo final llevadas a cabo para el análisis de la transcripción del alelo wt mostraron que sólo en DRGs o TG se detectaba la expresión de TRPV1, tanto en animales B6 como en animales heterocigotos con NeoR (Figura 10A) y sin resistencia a la Neomicina (Figura 10C). La eliminación del casete de NeoR no alteraba por tanto la expresión de TRPV1. La expresión del alelo modificado, sin embargo, sólo fue detectada en animales heterocigotos de la F1, es decir, con el casete de resistencia a la Neomicina (Figura 10B). De hecho, las parejas de cebadores empleadas para la amplificación del transcrito YFPTRPV1 y validadas gracias al plásmido de expresión pCI-neo-YFPTRPV1 (véase Materiales y Métodos) daban lugar a una doble banda en las muestras de DRG y trigéminos de los animales heterocigotos. El amplicón de menor tamaño (542 pb) correspondía al transcrito YFPTRPV1, mientras que el amplicón de mayor tamaño (aproximadamente 1500 pb) parecía corresponderse con la secuencia genómica, mostrando contaminación de ADN en el ADNc (Figura 10B). Los análisis para la expresión de YFPTRPV1 desde ADNc de animales heterocigotos en el genotipado y sin la resistencia a la Neomicina (F1') no permitieron detectar ni la banda correspondiente al transcrito ni la correspondiente al genoma a pesar de estar todas las muestras procesadas de igual forma (Figura 10D).

La detección, sin embargo, del transcrito YFPTRPV1 en, al menos, animales heterocigotos YFPTRPV1 con la resistencia a la Neomicina llevó a los análisis de expresión de la proteína de fusión YFPTRPV1. Para ello se llevaron a cabo tanto inmunocitoquímicas como Western Blot que trataran de confirmar la presencia de dicha proteína.

Para los análisis por inmunocitoquímica se realizaron cultivos de DRGs de animales B6 (wt) y animales heterocigotos para YFPTRPV1 (Het). Empleando anticuerpos específicos antiTRPV1 (α V1) y antiGFP

(α GFP), válidos también para la detección de YFP, los controles mostraron que las células presentaban bajos niveles de fluorescencia inespecífica. Ésta fue corregida para la comparativa posterior con los marcajes de los respectivos anticuerpos. Para el α V1 se observó que la fluorescencia era similar tanto en DRGs wt como heterocigotos (Figura 11A-B). Con una distribución eminentemente citoplasmática no se encontraron diferencias entre animales silvestres y animales heterocigotos. A su vez, la fluorescencia dada para α GFP mostró un marcaje débil y difuso en animales wt mientras que sí se observó un marcaje homogéneo en DRGs de animales heterocigotos (Figura 11C-D). Estos resultados apuntaban a la expresión y presencia de la proteína de fusión YFPTRPV1 en animales heterocigotos, pero su concentración requería de la detección vía anticuerpos, no pudiendo detectarse la fluorescencia de la misma sin el uso de ellos.

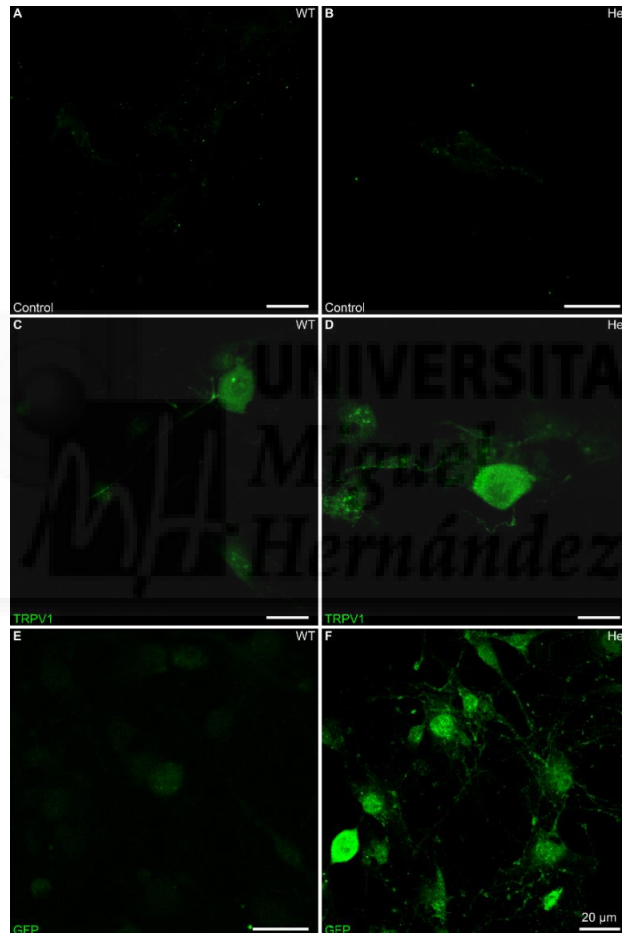


Figura 11. Imágenes de microscopía confocal de cultivo de DRGs de animales B6 (WT) y heterocigotos YFPTRPV1 (Het). A) Inmunocitoquímica (ICC) control de anticuerpo secundario verde en cultivo de DRGs de animales WT. B) ICC control de anticuerpo secundario verde en cultivo de DRGs de animales heterocigotos YFPTRPV1 (Het). C) ICC de cultivo de DRGs de animales B6 (WT) contra TRPV1 marcado en verde. D) Inmunocitoquímica de cultivo de DRGs de animales heterocigotos YFPTRPV1 (Het) contra TRPV1 marcado en verde. E) Inmunocitoquímica de cultivo de DRGs de animales B6 (wt) contra GFP marcado en verde. F) Inmunocitoquímica de cultivo de DRGs de animales heterocigotos YFPTRPV1 (Het) contra GFP marcado en verde. La barra de la escala en todos los casos se corresponde con 20 μ m.

La aparente expresión de la proteína YFPTRPV1 en el modelo heterocigoto trató de ser corroborada con análisis de inmunoblot (Western Blot). Así se llevó a cabo el examen de la expresión de TRPV1 y de YFPTRPV1 en los principales tejidos neuronales en los que se expresa este canal iónico. Se analizaron extractos de proteína total procedentes de DRGs, médula espinal y cerebro de animales B6 (wt), como control, y animales YFPTRPV1 heterocigotos (Figura 12).

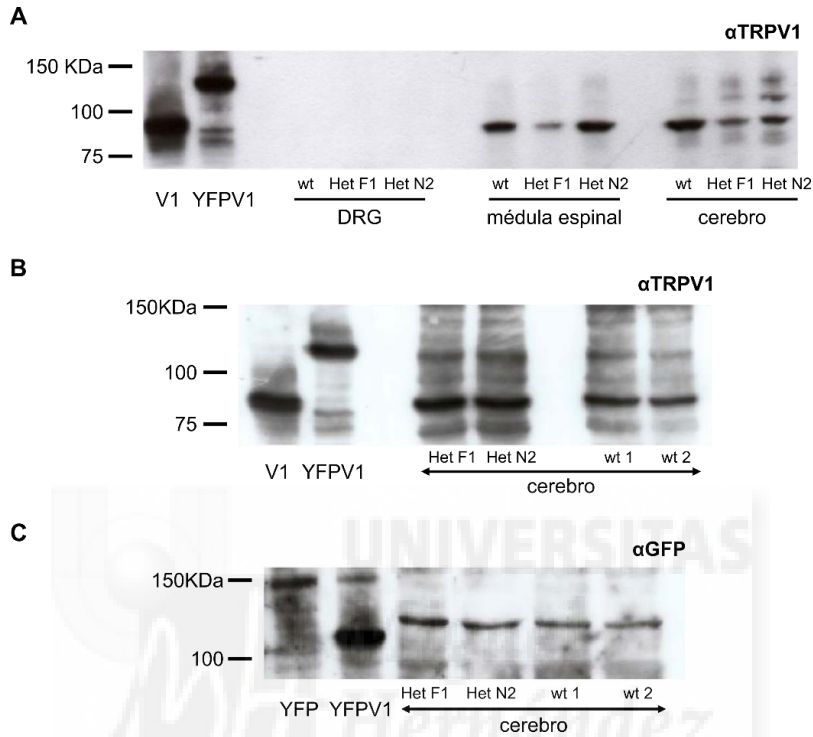


Figura 12. Inmunoblots para la detección de la expresión de TRPV1 y de YFPTRPV1 en tejido neuronal. A) Inmunoblot para detección de TRPV1 desde extractos de proteína total procedentes de DRGs, médula espinal y cerebro de animales B6 (wt) y animales heterocigotos para YFPTRPV1 con el casete de NeoR de TRPV1 (Het. F1) y sin el casete de Neo R (Het. N2). Como controles se emplearon extractos de proteína total de células HEK transfectadas con los vectores de expresión pcDNA3-TRPV1 (V1) y pCl-neo-YFPTRPV1 (YFPV1). B) Inmunoblot para la detección de TRPV1 desde extractos de proteína total procedentes de cerebro de animales B6 (wt) y animales heterocigotos para YFPTRPV1 con el casete de NeoR de TRPV1 (Het. F1) y sin el casete de Neo R (Het. N2). Como controles se emplearon extractos de proteína total de células HEK transfectadas con los vectores de expresión pcDNA3-TRPV1 (V1) y pCl-neo-YFPTRPV1 (YFPV1). C) Inmunoblot para detección de YFPTRPV1 desde extractos de proteína total procedentes de cerebro de animales B6 (wt) y animales heterocigotos para YFPTRPV1 con el casete de NeoR de TRPV1 (Het. F1) y sin el casete de Neo R (Het. N2). Como control se emplearon extractos de proteína total de células HEK transfectadas con los vectores de expresión pEYFP-C1 (YFP) y pCl-neo-YFPTRPV1 (YFPV1).

Los primeros análisis empleando anticuerpo α V1 mostraron que el extracto de proteínas totales de todas los DRGs de un único animal no presentaba suficiente concentración proteica para la detección de la expresión de TRPV1 (Figura 12A). Por el contrario, era posible la detección de esta proteína tanto en médula espinal como en cerebro de animales wt y animales heterocigotos con y sin NeoR (F1 y N2 respectivamente). En el caso de cerebro, además se detectaba una señal por encima de los 100 KDa que pudiera corresponderse con la proteína de fusión YFPTRPV1.

Los análisis posteriores con extractos de proteína total obtenidos de cerebro empleando anticuerpos $\alpha V1$ y αGFP , en los que además se aumentaba la cantidad de proteína cargada mostraron que sólo se detectaba señal de TRPV1 (Figura 12B). Así, aunque fue posible la detección del canal iónico con el anticuerpo $\alpha V1$ (Figura 12B) tanto en cerebro wt como heterocigoto, ni en el caso de este mismo anticuerpo ni con el anticuerpo αGFP (Figura 12C) se detectó una señal atribuible a YFPTRPV1. Lo que inicialmente podría corresponderse con la presencia de proteína YFPTRPV1 realmente se correspondía con señal generada por la falta de especificidad de los anticuerpos empleados, detectándose las mismas bandas tanto en las muestras de cerebro B6 como de cerebro heterocigoto (Figura 12B-C).

En conjunto, mientras que la inmunocitoquímica parecía señalar la presencia de la proteína de fusión YFPTRPV1 en los animales heterocigotos los análisis por Western blot rechazaron la producción de la misma. La carencia de un animal homocigoto impidió descartar un problema de señal de fluorescencia. Estos resultados junto con la falta de un animal homocigoto apuntaron la posibilidad de que los animales obtenidos no presentaran realmente el alelo YFP-TRPV1, ni en homocigosis ni hemicigosis.



CRISPR-Cas9

El cúmulo de resultados no evaluables ni reproducibles para el análisis de los clones ES resultó ser un limitante temporal clave, y condujo a importantes retrasos en la generación del modelo animal transgénico planteado. El auge de las nuevas técnicas de modificación genética como CRISPR-Cas, y la aparición de protocolos para la obtención de modelos animales a partir de las mismas (Yang et al., 2014) permitieron explorar la sustitución de la recombinación homóloga por el uso de CRISPR para la generación del modelo animal YFP-TRPV1. CRISPR-Cas ofrece la posibilidad de llevar a cabo modificaciones genéticas directamente en cigotos por lo que la búsqueda posterior de la modificación es posible directamente en animales neonatos. Este procedimiento salvaría hipotéticamente las limitaciones encontradas en los análisis de los clones ES, sin embargo, presenta sus propias restricciones como por ejemplo la baja efectividad para la generación de animales *knock-in*.

Teniendo en consideración éstas, se optó por el diseño y la evaluación de la efectividad de esta técnica para la generación de un modelo animal YFP-TRPV1. Además, se decidió desarrollar y analizar la posibilidad de, a través de CRISPR-Cas9, generar modelos animales *knock-add-on* para los termoTRPs TRPA1 y TRPM8, implicados junto a TRPV1 en la transducción del dolor. De esta forma se llevaron a cabo los distintos análisis de forma paralela para los tres canales iónicos. Para TRPA1 se seleccionó como marcador la proteína fluorescente azul CFP (de sus siglas en inglés *cyan fluorescent protein*), unido al N-terminal de la proteína. Para TRPM8 se escogió como marcador la proteína fluorescente roja denominada mRuby2 unida en este caso al C-terminal del canal iónico. La selección de la ubicación de los respectivos marcadores tenía el objetivo de no alterar la funcionalidad del canal iónico y fue avalada en el caso de TRPA1 y TRPM8 por la bibliografía (Thebault et al., 2005; Wang et al., 2008).

El primer paso fue el de la selección de las potenciales secuencias diana de cada canal iónico para lo que se emplearon las herramientas web CRISPR Design y ChopChop. Restringiendo las posibles secuencias a las áreas circundantes al punto de inserción, los programas arrojaron más de 15 secuencias diana viables para cada uno de los canales (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos con las herramientas online CRIPR.edu y ChopChop para los genes TRPV1, TRPA1 y TRPM8. Número de secuencias dadas para los 250 nt circunscritos al ATG (N-terminal) de TRPV1 y TRPA1 y al AAT (C-terminal) de TRPM8. Secuencia seleccionada seguida de los parámetros dados por cada uno de los *softwares* web empleados. El número de *mismatches* (MM) hace referencia al menor número de MM mostrado para todas las secuencias *off-targets* detectadas por cada uno de los programas.

	TRPV1		TRPA1		TRPM8	
	<i>CRISPR Design</i>	<i>ChopChop</i>	<i>CRISPR Design</i>	<i>ChopChop</i>	<i>CRISPR Design</i>	<i>ChopChop</i>
Nº de secuencias	41	15	46	29	18	10
Secuencia seleccionada	TCTGTCTGGAGGGTCCGGG C AGG		AGTCAATGAAGCGCGGCT TG AGG		AGTAAGGCTGGCGATGCT TG TGG	
Distancia al codón de inserción	64 nt		12 nt		58 nt	
Score	82	0,58	94	0,50	80	0,49
Posición	chr1: -73051806	chr1: -73238317	chr1: +14908911	chr1: -14918818	chr1: +90281283	chr1: +88384709
Nº de <i>off-targets</i>	171 (25 están en genes)	2	70 (14 están en genes)	0	137 (21 están en genes)	2
Nº <i>mismatches</i> (MM)	2 MM (4 MM en genes)	3 MM	4 MM (4 MM en genes)	-	3 MM (4 MM en genes)	3 MM

Las tres secuencias dianas seleccionadas obtuvieron una puntuación (*Score*) elevada, por encima de 80 sobre 100 en el caso de CRIPR Design y por encima de 0,5 sobre 1 para ChopChop. Aunque los programas arrojaron potenciales secuencias con una mejor puntuación, la lejanía de las mismas (por encima de los 100 nt) al punto de inserción deseado nos hicieron descartarlas (Tabla 2). Las secuencias seleccionadas para cada TRP presentaron un número de *off-targets* (potenciales regiones cortadas por el complejo Cas9: ARNsg dada la similitud de secuencia nucleotídica con la secuencia diana) elevado, por encima de 100 en el caso de TRPV1 y TRPM8. Sin embargo, este número de *off-targets* nunca fue superior a 25 dentro de genes conocidos. Además, se tuvo en cuenta que el número de nucleótidos no coincidentes (*mismatches*) para estos últimos casos siempre fue igual o superior a 4 (Tabla 2).

Seleccionadas las respectivas secuencias, se analizó si éstas eran reconocidas y cortadas por la Cas9, y con qué eficiencia se producía este proceso a través del empleo del kit de *Guide-it™ sgRNA In vitro Transcription and Screening System*. Aunque las pruebas llevadas a cabo permitieron confirmar el reconocimiento adecuado de la Cas9, la eficiencia para cada caso fue diferente (Figura 13).

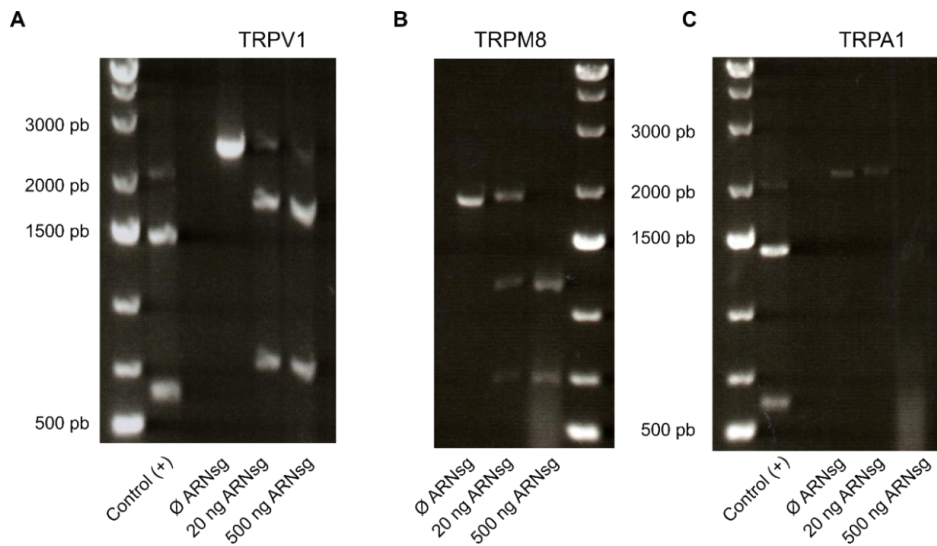


Figura 13. Análisis de eficiencia de corte de Cas9 sobre las secuencias diana seleccionadas para TRPV1, TRPM8 y TRPA1. A) Electroforesis de la digestión de 100 ng de amplificado de unos 2.5 Kb con la secuencia diana para TRPV1 con Cas9 y 20 ng o 500 ng de ARNs de TRPV1 y sin ARNs como control negativo. Se señalan los pesos moleculares a la izquierda del gel. B) Electroforesis de la digestión de 100 ng de amplificado de unas 2 Kb con la secuencia diana para TRPM8 con Cas9 y 20 ng o 500 ng de ARNs de TRPM8 y sin ARNs como control negativo. Se señalan los pesos moleculares a la derecha del gel. C) Electroforesis de la digestión de 100 ng de amplificado de unos 2.3 Kb con la secuencia diana para TRPA1 con Cas9 y 20 ng o 500 ng de ARNs de TRPA1 y sin ARNs como control negativo. Se señalan los pesos moleculares a la izquierda del gel. El control positivo (+) se corresponde con la reacción proporcionada por la casa comercial en el kit empleado.

Empleando en todos los casos 100 ng de secuencia molde para el corte de la Cas9, se observó que, en el caso de TRPV1, la eficiencia de corte con 20 ng de ARNs era del 86,98%, siendo muy similar al 97,2% obtenido con aproximadamente 500 ng de ARNs. Para TRPA1 la eficiencia de corte varió drásticamente en función de la cantidad de ARNs empleado. Así obtuvimos una eficiencia del 0% con 20 ng de ARNs mientras que se alcanzó una eficiencia de corte del 92,5% empleando 500 ng. Algo similar ocurrió con TRPM8 al encontrar una eficiencia de corte del 41,33% al emplear 20 ng de ARNs mientras que con aproximadamente 500 ng de ARNs se alcanzó una eficiencia del 99,79%.

Dado que el reconocimiento de las secuencias se daba en todos los casos, se trabajó en la obtención de vectores *all-in-one*. El desarrollo de este tipo de vectores permitió la simplificación de la transfección al reunir en un único vector la expresión tanto de la proteína Cas9 como de la secuencia guía ARNs, habiendo sólo que introducir la secuencia diana a modificar (Ran et al., 2013b). La eficiencia de la clonación resultó muy elevada para este vector en los tres casos. Los análisis de RFLP mostraron que 11 de 12 colonias analizadas para TRPV1, 11 de 11 colonias para TRPA1 y 8 de 10 colonias para TRPM8 presentaban la inserción de la secuencia diana. La secuenciación de los plásmidos de al menos dos colonias para cada TRP mostraba que la inserción de la secuencia diana era correcta.

Para la introducción de los distintos marcadores fluorescentes en las dianas seleccionadas hubieron de generarse además los vectores molde o de recombinación correspondientes. Es decir, se necesitó construir un vector con YFP flanqueado por las secuencias genómicas correspondientes al N-terminal de TRPV1; un vector con CFP flanqueado por las secuencias genómicas correspondientes al N-terminal de TRPA1; y un vector mRuby2 flanqueado por las secuencias genómicas correspondientes al C-terminal de TRPM8. Para el primer caso, se optó por adaptar el vector pKO-YFPTRPV1 ya construido

para el modelo animal a las condiciones que la bibliografía marcaba para CRISPR. Para ello se llevaron a cabo mutaciones dirigidas para introducir secuencias de enzimas de restricción para reducir los brazos de recombinación de 4 Kb a aproximadamente 2 Kb cada uno. Las modificaciones, debido a interferencias entre las enzimas de restricción, se realizaron de forma secuencial y requirieron de la puesta a punto de cada mutación dirigida, así como de las digestiones y ligaciones, al no producirse siempre las escisiones esperadas que junto con reordenamientos en el vector durante la ligación retrasaron mucho la obtención del mismo.

Por otro lado, la obtención del vector de recombinación CFP-TRPA1 y mRuby2-TRPM8 se diseñó partiendo de la digestión e inserción de los brazos de recombinación respectivos en el vector base de CFP y mRuby2. Para el primer caso resultó inviable la inserción del brazo de recombinación 3' de TRPA1 en el vector de CFP, a pesar de todos los intentos y pruebas de las condiciones para digestión, inserción y ligación. El plásmido molde mRuby2-TRPM8, sin embargo, no presentó incidencias en su obtención y resultó ser el primer vector de recombinación disponible para CRISPR.

La generación del vector *all-in-one* con la secuencia diana para TRPM8, así como del vector molde para la introducción de la mRuby2 en el C-terminal del canal iónico permitió analizar la eficiencia del sistema en la línea celular C2C12. Se corroboró que esta línea celular no presentaba la expresión de ninguno de los canales iónicos TRP de interés. Sin embargo, su disponibilidad en el laboratorio, su rápido crecimiento y su origen, línea procedente de ratón, permitía la evaluación de los vectores para CRISPR/Cas9 diseñados a través de análisis genéticos. Se llevó a cabo la transfección con ambos plásmidos (Figura 14A) y se realizó el aislamiento de las células que integraron el vector *all-in-one*. La posterior amplificación de las células aisladas permitió la obtención del material genético para el análisis del locus de TRPM8. De los distintos clones aislados se obtuvo amplificación de la región del C-terminal de TRPM8 de 31, y las electroforesis mostraron inserción en 12 de ellos (Figura 14B), lo que se tradujo en una tasa de inserción del 38,70 %. La posterior secuenciación permitió la confirmación de la integración de mRuby2 en el locus de TRPM8 (Figura 14C).

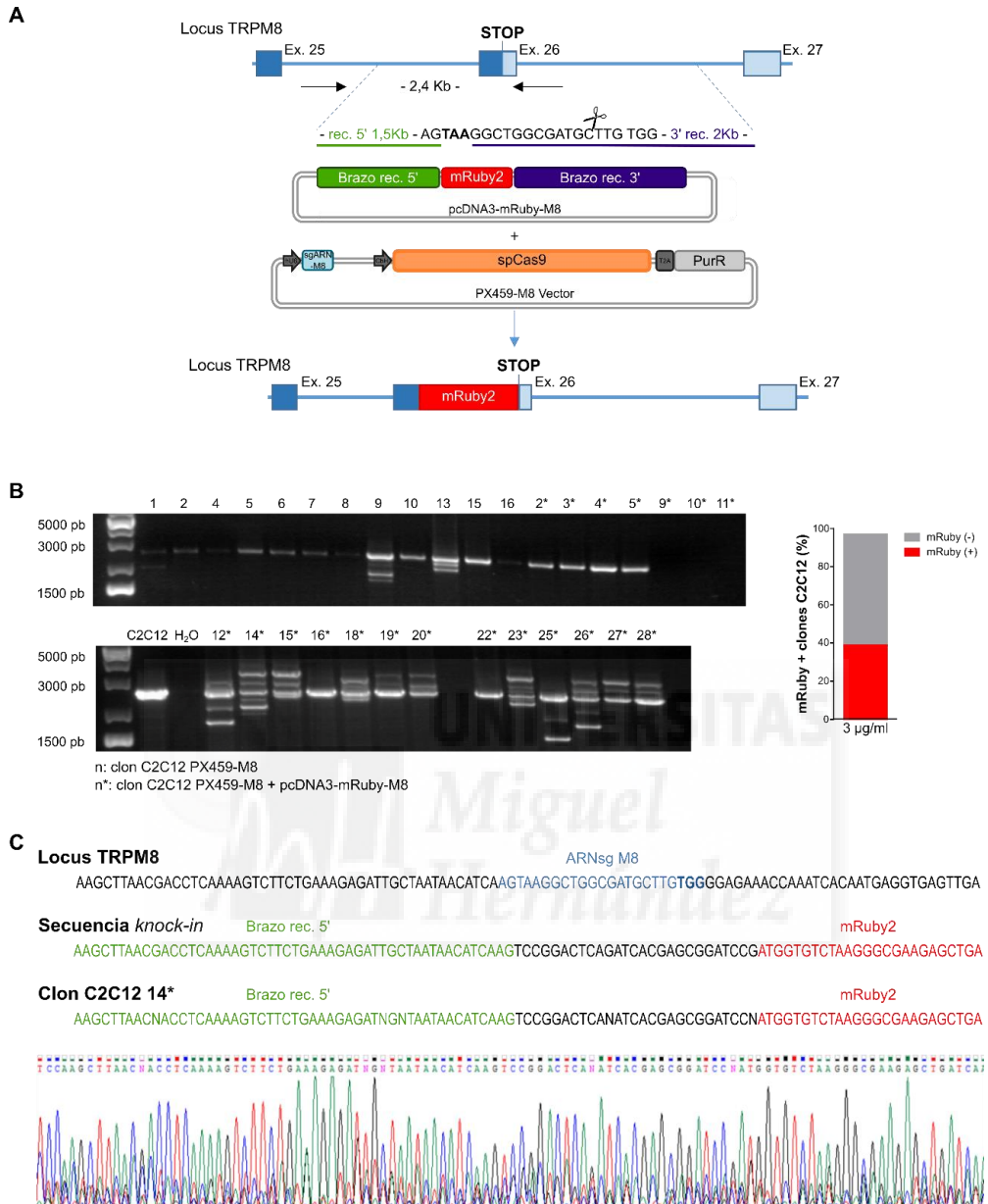


Figura 14. Modificación por CRISPR-Cas9 del gen TRPM8 en la línea celular C2C12. A) Esquema de la integración de la proteína fluorescente mRuby2 en el locus de TRPM8 a partir del vector molde con los brazos de recombinación de TRPM8 y el vector *PX452* con la secuencia diana cercana al codón de STOP de TRPM8. B) Electroforesis de los genotipados realizados a los clones C2C12 aislados. Amplificación de secuencia genómica correspondiente al C-terminal de TRPM8. Se realizó el análisis en clones aislados y transfectados únicamente con el vector PX459-M8 numerados arbitrariamente. Los clones con * se corresponden a clones cotransfectados con el vector PX459-M8 y pcDNA3-mRuby-M8. Se incluye el porcentaje de inserción mRuby en TRPM8 detectado en los clones C2C12 cotransfectados con 3 µg/ml del vector pcDNA3-mRuby-M8. C) Alineación de la secuencia del locus de TRPM8 con la secuencia diana seleccionada en azul, la secuencia esperada tras la inserción de la proteína fluorescente mRuby2 y la secuencia obtenida para el clon 14* con el locus de TRPM8 donde se confirma la inserción. Se incluye el cromatograma obtenido para el clon 14*.

Estos resultados nos indujeron a pensar que el uso de CRISPR-Cas9 podría ser una buena estrategia para la generación de un modelo animal, pero también podría emplearse para la modificación y obtención de un modelo celular dados los resultados en la línea C2C12. Así, partiendo de una línea celular que expresara los canales iónicos de TRPV1, TRPA1 o TRPM8 se podrían obtener líneas celulares que nos permitieran el estudio *in vitro*, facilitando la caracterización de los procesos de expresión, transporte o eliminación de estos canales.



Modelo celular MED17.11

La dependencia de cultivos celulares primarios para el estudio de la nocicepción conlleva además de restricciones temporales y materiales, restricciones éticas y legales para con el uso de animales de experimentación. Por ello surge la necesidad de desarrollar nuevas herramientas *in vitro* que permitan el estudio de la nocicepción sin esos condicionantes, creando y validando nuevos modelos celulares. En esta línea, diversos grupos trabajan en el desarrollo de líneas celulares capaces de diferenciarse a nociceptores maduros, entre ellos el grupo del investigador M.A. Nassar de la Universidad de Sheffield. La línea celular MED17.11 creada por ellos (Doran et al., 2015), se ha descrito como una línea celular capaz de expresar marcadores de nociceptores maduros de forma rápida convirtiéndola en una interesante herramienta para el cultivo de nociceptores *in vitro*. En particular, su capacidad para expresar el canal iónico TRPV1 en una semana resultó interesante para este trabajo al permitir el estudio de TRPV1 en un entorno controlado y semejante a su situación *in vivo*. Además, esta línea celular posibilitaba el desarrollo de un modelo celular equiparable al modelo animal YFP-TRPV1 si se modificaba con los vectores CRISPR/Cas9 creados en este trabajo.

Diferenciación de la línea celular MED17.11 siguiendo el protocolo de (Doran et al., 2015).

Para la adaptación de esta nueva línea celular en el laboratorio se llevó a cabo en primer lugar una reproducción del protocolo de diferenciación de las MED17.11 (Figura 15). A fin de confirmar la obtención de nociceptores maduros, fundamentalmente peptidérgicos, se realizó la caracterización de los cultivos en cada etapa del proceso.

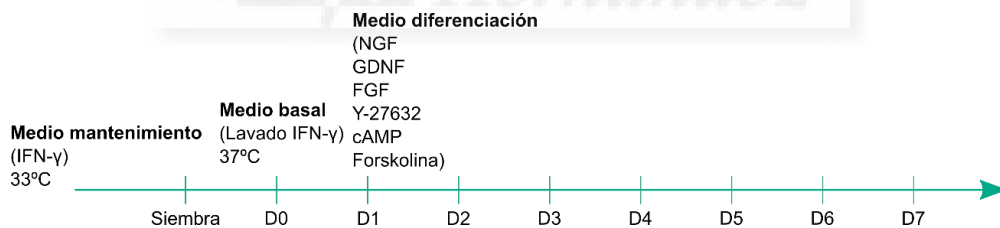


Figura 15. Esquema del protocolo de diferenciación de la línea celular MED17.11 por Doran et al. (2015). IFN- γ : Interferón Gamma; NGF: factor de crecimiento nervioso; GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía; FGF: factor de crecimiento de fibroblastos; cAMP: Adenosina monofosfato cíclico.

En primer lugar se realizó la caracterización morfológica a través de la observación y el seguimiento de los cultivos en cada una de las fases de crecimiento y diferenciación (Figura 16). La puesta a punto de los protocolos de siembra y diferenciación llevaron al establecimiento de siembras de 5000 células por cm^2 como óptimo de concentración. Mientras que concentraciones inferiores alteraban la morfología de las células no diferenciadas (adquirían morfologías muy espiculadas y el crecimiento se ralentizaba), las concentraciones superiores generaban sobrecrecimiento, es decir, las células no crecían en monocapa tras los primeros días de diferenciación.

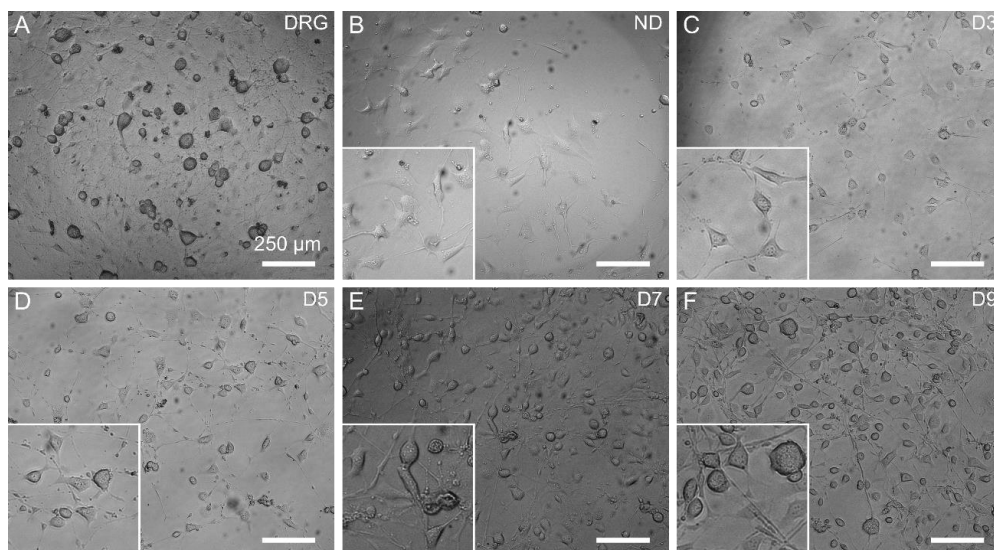


Figura 16. Análisis de visu del proceso de diferenciación de las MED17.11. A) Cultivo de DRGs de ratón adulto (12 semanas). B) Cultivo de MED17.11 no diferenciadas (ND) con medio de mantenimiento a 33°C. C) Cultivo de MED17.11 a día 3 de diferenciación (D3) con medio de diferenciación a 37°C. D) Cultivo de MED17.11 a día 5 de diferenciación (D5) con medio de diferenciación a 37°C. E) Cultivo de MED17.11 a día 7 de diferenciación (D7) con medio de diferenciación a 37°C. F) Cultivo de MED17.11 a día 9 de diferenciación (D9) con medio de diferenciación a 37°C. Barra de escala de 250 µm. Recuadros con zoom 2X de los cultivos.

Empleando como referencia la morfología de un cultivo primario de DRGs de ratón (Figura 16A), a lo largo del proceso de diferenciación se observó que las células pasaban de un estado de soma estrellado o alargado, de tipo fibroblasto (Figura 16B) en estado no diferenciado a una conformación más redondeada, con reducción del tamaño del cuerpo celular. En las primeras 72 horas aparecían las primeras prolongaciones dendríticas, y se iniciaba el desarrollo de una incipiente red de neuritas (Figura 16C). Dicha red se apreciaba desarrollada, madura e interconectada (Figura 16D-F) a partir de los días 5 ó 6 de diferenciación. En estas fases, además, resultaba apreciable el aumento del número de células por campo. A los 9 días de diferenciación y siguientes la heterogeneidad morfológica resultaba muy marcada, encontrando células con soma grande y casi ameboide; células redondas de gran tamaño con múltiples axones y células con soma pequeño y conformación bipolar (Figura 16F). Los análisis *de visu* mostraron, por tanto, que tras una semana de diferenciación obteníamos un cultivo celular con las MED17.11 semejante morfológicamente a los cultivos primarios de DRGs.

De forma complementaria al análisis *de visu* se llevaron a cabo inmunocitoquímicas en MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 7 (D7). Con ellas, además de la morfología, se caracterizó si los tipos celulares presentes se correspondían con neuronas sensoriales. Así se analizó la presencia del marcador neuronal Tuj1 (β -Tubulina III); el marcador de astrogliá GFAP; el receptor TrkA, implicado en la maduración de nociceptores; el canal iónico TRPV1 presente en nociceptores peptidérgicos y el marcador IB4, cuyas características permiten la distinción de nociceptores peptidérgicos (negativo) y no peptidérgicos (positivo) (Figura 17).

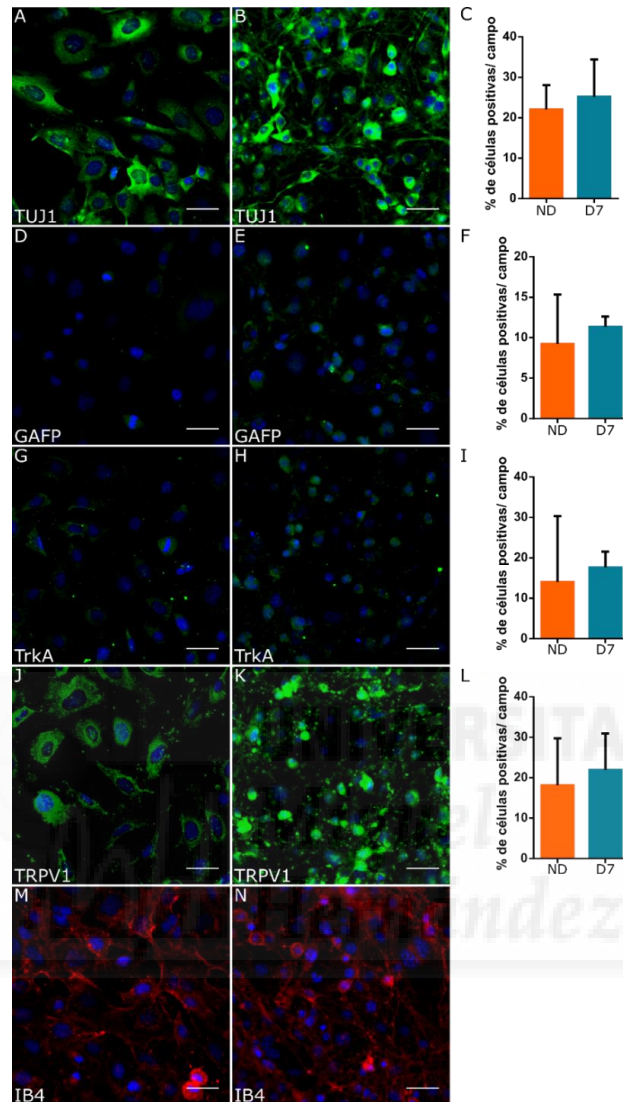


Figura 17. Análisis de inmunocitoquímica (ICC) llevada a cabo en MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 7 (D7). A) MED17.11 ND marcado el citoplasma de las células neurales en verde con TuJ1 y los núcleos en azul con DAPI. B) MED17.11 diferenciada D7 marcado el citoplasma de células neurales en verde con TuJ1 y los núcleos en azul con DAPI. C) Diagrama de barras para el porcentaje de células contabilizadas como positivas para TuJ1 MED17.11 ND (n=31) y D7 (n=18). D) MED17.11 ND marcado el citoplasma de las células gliales en verde con GFP y los núcleos en azul con DAPI. E) MED17.11 diferenciada D7 marcado el citoplasma de células gliales en verde con GFP y los núcleos en azul con DAPI. F) Diagrama de barras para el porcentaje de células contabilizadas como positivas para GFP MED17.11 ND (n=31) y D7 (n=23). G) MED17.11 ND marcado el citoplasma de las células en verde con TrkA y los núcleos en azul con DAPI. H) MED17.11 diferenciada D7 marcado el citoplasma de células en verde con TrkA y los núcleos en azul con DAPI. I) Diagrama de barras para el porcentaje de células contabilizadas como positivas para TrkA MED17.11 ND (n=34) y D7 (n=15). J) MED17.11 ND marcado el citoplasma de las células nociceptivas en verde con TRPV1 y los núcleos en azul con DAPI. K) MED17.11 diferenciada D7 marcado el citoplasma de células nociceptivas en verde con TRPV1 y los núcleos en azul con DAPI. L) Diagrama de barras para el porcentaje de células contabilizadas como positivas para TRPV1 MED17.11 ND (n=38) y D7 (n=21). M) MED17.11 ND marcado el citoplasma de las células no peptidérgicas en rojo con IB4 y los núcleos en azul con DAPI. N) MED17.11 diferenciada D7 marcado el citoplasma de células no peptidérgicas en rojo con IB4 y los núcleos en azul con DAPI. Barra de escala correspondiente a 50 μ m.

Los cambios morfológicos entre los dos estadios celulares analizados resultó muy marcado (Figura 17). En líneas generales, las células no diferenciadas presentaban un tamaño variable pero superior en su mayoría a las células diferenciadas. En los campos analizados la distribución de las MED17.11 no diferenciadas resultaba homogénea, con una muy marcada disposición en monocapa y una morfología muy similar entre ellas. Por el contrario, las células diferenciadas mostraban una elevada heterogeneidad. Se podían distinguir distintas morfologías distribuidas además en distintos planos. En el plano inferior se apreciaban células similares a las células no diferenciadas, así como células “gigantes” multinucleadas. En planos superiores se apreciaban las redes axonales y dendríticas bien marcadas, y células con somas redondeados con gran variedad de tamaños, bipolares y multipolares.

El marcador neuronal Tuj1 confirmó el origen neuronal de las MED17.11 sin embargo, mostró que dicha población neuronal se encontraba por debajo del 50 % de las células analizadas (Figura 17A-C). En el caso de las células no diferenciadas, el marcaje señaló un soma muy amplio y no siempre bien definido. En algunos campos se apreciaron células con un marcaje intenso alrededor del núcleo (Figura 17A). En las células diferenciadas se observaba una heterogeneidad amplia al encontrar células marcadas de forma similar a las células no diferenciadas pero también se apreciaron las redes axonales y dendríticas bien definidas y células de pequeño tamaño, con bordes muy definidos y de aspecto muy esférico, con morfología bipolar (Figura 17B).

En el marcaje con GFP también se pudieron identificar células positivas tanto en células ND como diferenciadas a día 7, pero en ambos casos con un porcentaje muy bajo de éstas (Figura 17F). En el caso de las células no diferenciadas el marcaje se centraba alrededor de los núcleos de las mismas sin que se apreciara la extensión del soma. En el caso de las MED17.11 a D7 con el cambio de morfología se detectaron células de pequeño tamaño con una intensa fluorescencia.

El marcador neuronal de desarrollo de nociceptores TrkA mostró también un marcaje focalizado alrededor de los núcleos en células ND, mientras que en las células a D7 aparecieron células de reducido tamaño con una fluorescencia intensa en todo el soma (Figura 17G-H respectivamente). El porcentaje de células positivas en ninguno de los dos estadios superó el 25% y la diferenciación, aunque incrementó su porcentaje, no resultó significativamente mayor a las ND (Figura 17I).

Con TRPV1 se detectó un aumento importante de los residuos celulares y un cambio en el aspecto del marcaje. Mientras que en las células no diferenciadas se apreciaba una señal intensa pero restringida alrededor del núcleo, en el caso de las células a D7 se apreciaban células positivas a TRPV1 con una señalización intensa y definida en células muy redondeadas y de pequeño tamaño celular (Figura 17J-K). El aumento en el porcentaje de células positivas contabilizadas para este marcador, al igual que el resto, no resultó significativo, situándose en ambos estadios por debajo del 25% (Figura 17L).

En el caso del marcaje con IB4 para la distinción entre células no peptidérgicas y peptidérgicas resultó muy extenso en los somas en ambos estadios, imposibilitando el conteo de células positivas, al no poderse distinguir los límites celulares en las células a D7. Se apreció que la mayoría de células resultaban positivas para este marcador con escasas excepciones (Figura 17M-N).

Los marcajes cruzados de TrkA o TRPV1 con IB4 mostraron que la mayoría de células consideradas nociceptores (células positivas para TrkA o TRPV1) resultaban no peptidérgicas (IB4 positivos), con escasas excepciones (Figura 18).

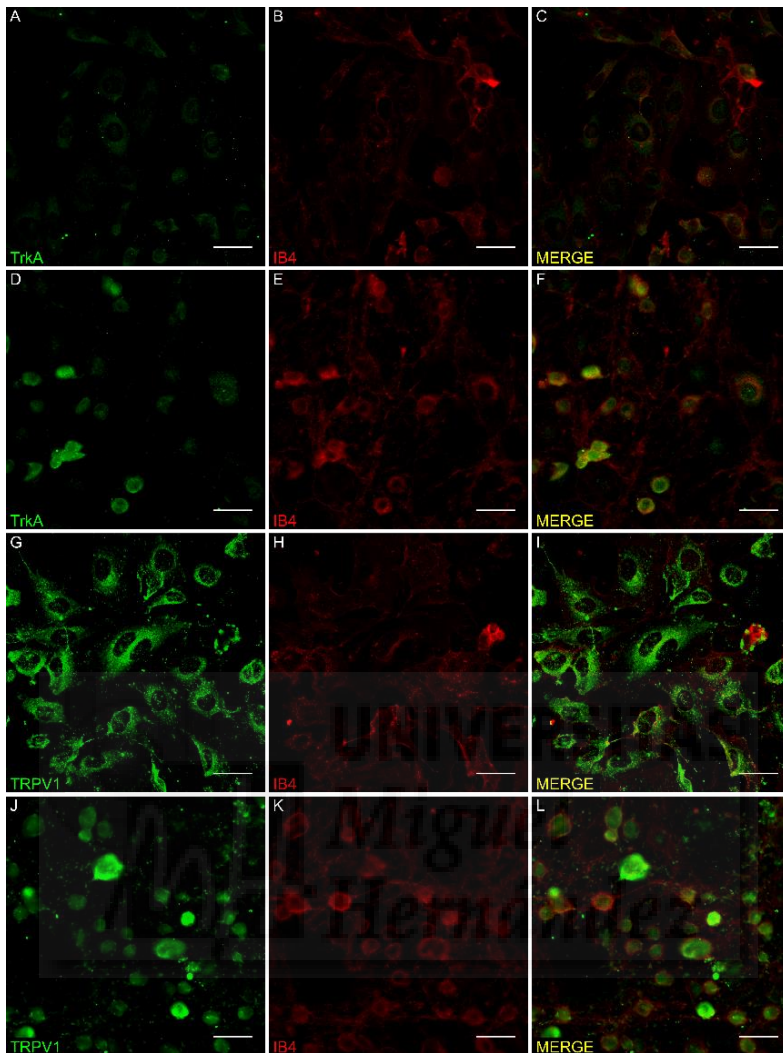


Figura 18. Comarcajes de TrkA y TRPV1 con IB4 de MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 7 (D7). A) MED17.11 ND marcado el citoplasma de los nociceptores en verde con TrkA. B) MED17.11 ND marcado el citoplasma de las células no peptidérgicas en rojo con IB4. C) Comarcaje de MED17.11 ND en verde con TrkA y en rojo IB4. D) MED17.11 D7 marcado el citoplasma de los nociceptores en verde con TrkA. E) MED17.11 D7 marcado el citoplasma de las células no peptidérgicas en rojo con IB4. F) Comarcaje de MED17.11 D7 en verde con TrkA y en rojo IB4. G) MED17.11 ND marcado el citoplasma de los nociceptores en verde con TRPV1. H) MED17.11 ND marcado el citoplasma de las células no peptidérgicas en rojo con IB4. I) Comarcaje de MED17.11 ND en verde con TRPV1 y en rojo IB4. J) MED17.11 D7 marcado el citoplasma de los nociceptores en verde con TRPV1. K) MED17.11 D7 marcado el citoplasma de las células no peptidérgicas en rojo con IB4. L) Comarcaje de MED17.11 D7 en verde con TRPV1 y en rojo IB4. Barra de escala en todas las imágenes de 50 μm .

Por otra parte, los análisis de inmunocitoquímica permitieron cuantificar el número de células por campo y el tamaño de los núcleos marcados con DAPI. Los análisis mostraron que el cultivo de MED17.11 continuaba dividiéndose encontrando un aumento significativo (Mann Whitney test, p-valor < 0,001) del número de núcleos contabilizados a D7 ($91,3 \pm 30,4$) respecto a ND ($49,5 \pm 18,7$) (Figura 19A). El tamaño medio de estos núcleos en las células diferenciadas ($200 \pm 22,5 \mu\text{m}^2$) resultó también significativamente más pequeño (Test-t despareado, $t=18,4$; $df=209$; p-valor < 0,001) que las áreas

medidas en las células ND ($297 \pm 43,2 \mu\text{m}^2$) (Figura 19B). Adicionalmente, las áreas de las regiones de interés (ROI) seleccionadas para imagen de calcio fueron también analizadas como una aproximación al tamaño celular en cada fase de diferenciación. La comparativa confirmó que el tamaño se reducía y, además, se uniformizaba disminuyendo su variabilidad a lo largo del proceso de diferenciación (Figura 19C).

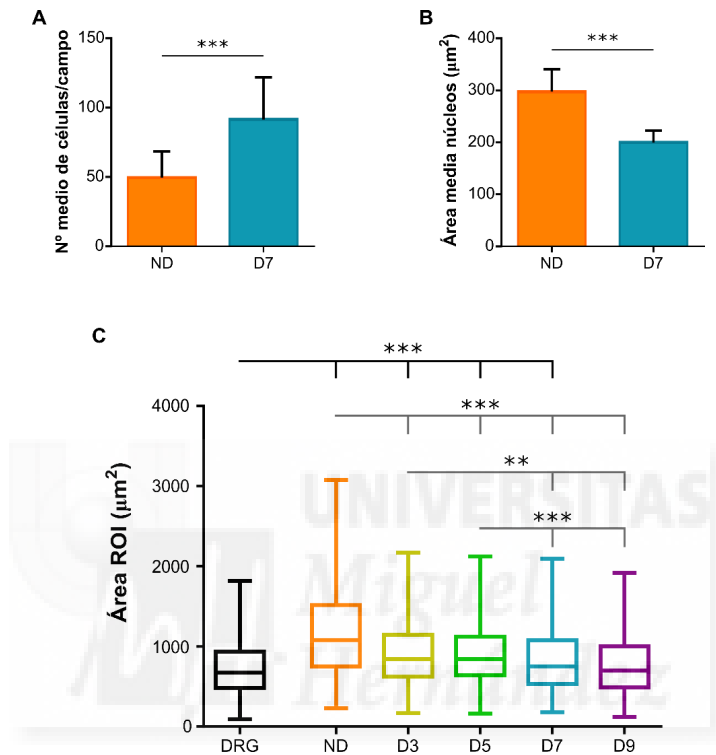


Figura 19. Análisis del cambio de número y tamaño de las MED17.11 a lo largo de la diferenciación. A) Conteo automático del número de núcleos marcados con DAPI en las inmunocitoquímicas realizadas en MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 7 (D7). Número de campos analizados: ND= 134; D7= 77. *** se corresponde al p-valor < 0.001 (Mann Whitney test) B) Análisis del área de los núcleos en las ICC para células ND y diferenciadas a D7. Número de campos analizados: ND= 134; D7= 77. *** se corresponde al p-valor < 0.001 (Test-t desapareado) C) Diagrama de cajas y bigotes para las áreas de las ROI de DRGs y MED17.11. DRG: ganglio de la raíz dorsal (n=778); ND: MED. 17.11 no diferenciadas (n=476); D3: MED17.11 en el tercer día de diferenciación (n=532); D5: MED17.11 en el quinto día de diferenciación (n=526) y D9: MED17.11 en el noveno día de diferenciación (n=815). Las cajas señalan el rango intercuartílico dónde la línea horizontal representa la mediana de las ROI. Los bigotes muestran los valores mínimo y máximo de las áreas para cada grupo de células. ** se corresponde al p-valor < 0.01 *** se corresponde al p-valor < 0.001 (Kruskal-Wallis/Test de Dunn para múltiples comparaciones).

En comparación con los DRGs ($740.9 \pm 329.7 \mu\text{m}^2$), las áreas analizadas de las MED17.11 en los distintos días de diferenciación resultaron significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, p-valor < 0.01) salvo a D9 (Figura 19C). Las células no diferenciadas (ND) presentaron el mayor tamaño ($1194 \pm 585.4 \mu\text{m}^2$) y la mayor dispersión de todas las ROI, mostrando diferencias significativas con todas las MED17.11 diferenciadas indistintamente del día de diferenciación (Kruskal-Wallis, p-valor < 0.01). Se observó

además una reducción progresiva del tamaño desde el día de diferenciación 3 (D3) con $918.6 \pm 390.9 \mu\text{m}^2$, al día de diferenciación 5 (D5) con $926.9 \pm 391.3 \mu\text{m}^2$, al día de diferenciación 7 (D7) con $836.4 \pm 384.9 \mu\text{m}^2$ y al día 9 de diferenciación (D9) con $775.3 \pm 358.9 \mu\text{m}^2$. La dispersión de las áreas, sin embargo, resultó bastante sostenida. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre las ROI de D3 y D5 con las áreas de D7 y D9 (Kruskal-Wallis, p-valor < 0.01) (Figura 19C).

Al igual que en los análisis *de visu*, estos resultados mostraban que a lo largo de la diferenciación las MED17.11 tendían a aproximarse a los tamaños presentes en los cultivos primarios de DRGs.

La caracterización de las MED17.11 se continuó con el análisis de la expresión de los receptores TrkA y CGRP y el canal TRPV1 vía retrotranscripción de ARN de MED17.11 en diferentes estadios de diferenciación, seguida de una PCR a tiempo final. El receptor TrkA, marcador de nociceptores y clave en el desarrollo de los mismos, fue detectado en todas las muestras analizadas, sin apreciarse diferencias en la expresión entre las distintas muestras (Figura 20A). En el caso de CGRP (Calca), también se detectó su expresión en todas las muestras analizadas, no diferenciadas y a diferentes días de diferenciación (Figura 20A). Sin embargo, los análisis de expresión de TRPV1 mostraron que en ninguna de las muestras se obtenía amplificado (Figura 20A). Estos resultados apuntaron a que el proceso de diferenciación no alteraba la expresión de los marcadores analizados.



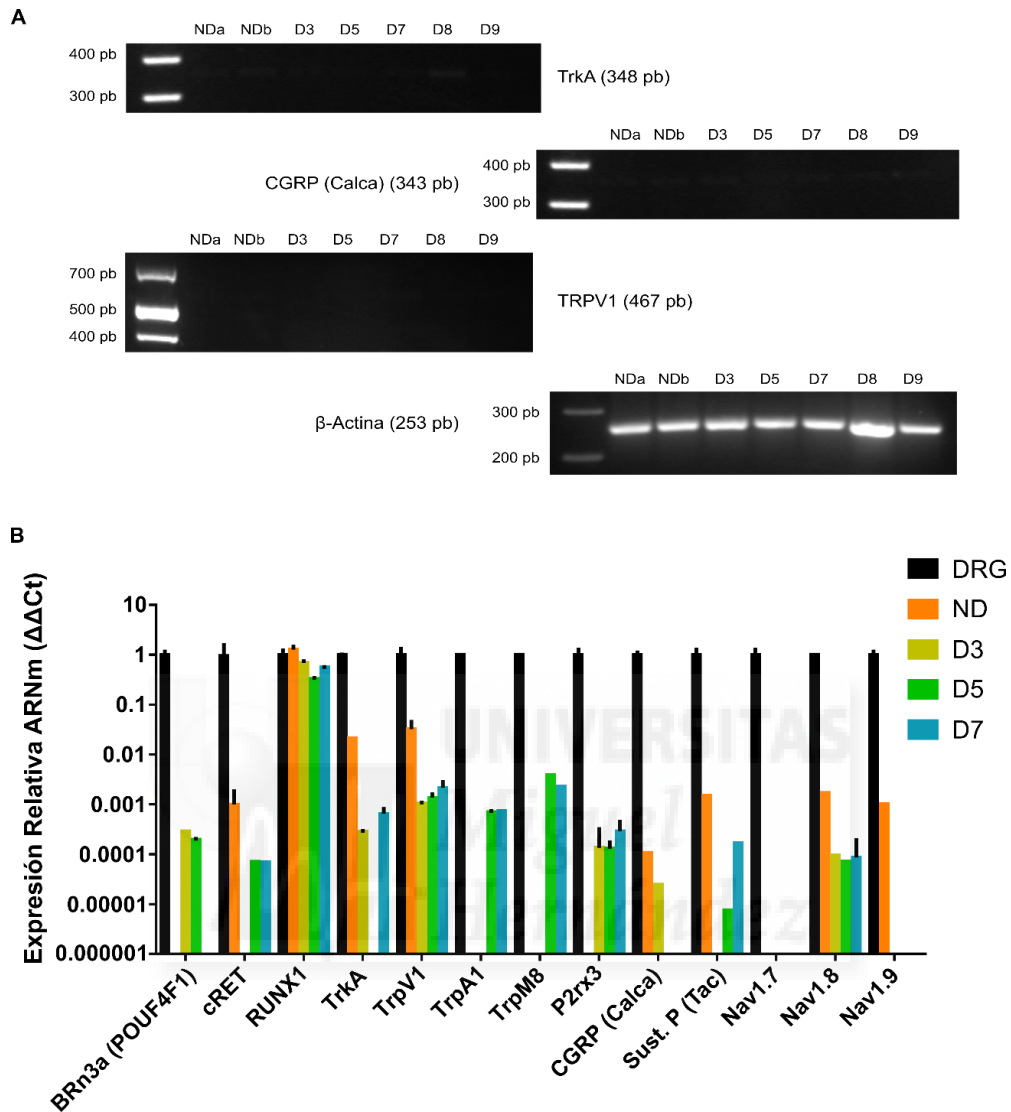


Figura 20. Análisis de expresión de marcadores neurales en MED17.11 no diferenciadas y diferenciadas. A) Electroforesis de PCR desde ADNc procedente de MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 3 (D3), día 5 (D5), día 7 (D7), día 8 (D8) y día 9 (D9). Se analizaron los marcadores de nociceptores peptidérgicos TrkA, CGRP y TRPV1 en los que se señalan los tamaños de amplificadas esperados en cada caso. Como control de la retrotranscripción se incluyó la amplificación de la β -Actina. B) Resultados de la RT-qPCR con la expresión relativa de MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 3 (D3), a día 5 (D5) y a día 7 (D7) en relación a la expresión de dichos marcadores en DRG de ratón adulto. Marcadores analizados relacionados con la maduración de nociceptores, Brn3a, cRet, Runx1, TrkA, y receptores y canales iónicos presentes en nociceptores maduros, TRPV1, TRPA1, TRPM8, P2rx3, CGRP, Sustancia P, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9. Control interno empleado GAPDH.

Se decidió aumentar el panel de marcadores analizados incluyendo transcritos implicados en la maduración de nociceptores peptidérgicos, así como canales iónicos y receptores presentes en esta subpoblación de neuronas sensoriales. Para ello se llevó a cabo una PCR a tiempo real (RT-qPCR) y la cuantificación relativa de estos genes respecto a su expresión en DRGs. En este caso, los análisis mostraron que sólo la expresión de Runx1, presente en el proceso de maduración de nociceptores,

obtuvo unos valores similares a los DRGs (Figura 20B). El resto de marcadores presentó una expresión ínfima, con hasta tres órdenes de magnitud por debajo de los DRGs de ratón adulto en todos los casos, salvo para TrkA y TRPV1 de células no diferenciadas que sólo fue dos órdenes de magnitud inferiores. Uno de los aspectos más destacados fue que, con la excepción de Brn3a (Pouf4), TRPA1, TRPM8 y P2rx3, las MED17.11 diferenciadas, indistintamente del día analizado, mostraron una menor expresión que las células ND. En algunos casos la expresión detectada en las células no diferenciadas no era detectada en las células diferenciadas. El canal de sodio Nav1.7 fue el único marcador que no se detectó en ninguna de las fases analizadas de las MED17.11.

Estos resultados, en contra de los resultados morfológicos, mostraron que las MED17.11 presentaban un perfil de expresión de marcadores neuronales muy alejado del perfil detectado en DRGs de ratón adulto. Además, la diferenciación, en contra de lo esperado, incrementaba las diferencias de expresión entre los DRGs y las MED17.11 en muchos de los marcadores analizados.

Dados los cambios de la expresión detectados de TRPV1 en las qPCR y la contradicción presentada con las inmunocitoquímicas, se llevó a cabo un inmunoblot (Western Blot) para la comprobación de la expresión proteica de este canal iónico en distintos momentos de la diferenciación (Figura 21).

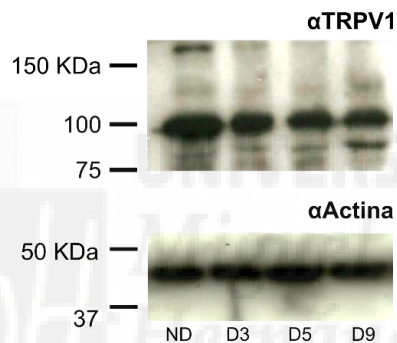


Figura 21. Inmunoblot (Western blot) de la expresión de TRPV1 en las MED17.11. Inmunoblot desde extractos de proteína total procedentes de MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 3 (D3), día 5 (D5) y día 7 (D7). Control de la carga llevado a cabo con actina.

Tal y como señalaron los resultados en las inmunocitoquímicas, la presencia de TRPV1 se detectaba a una muy baja proporción en casi todos los días de diferenciación, aunque no se apreciaban cambios en la expresión entre las células no diferenciadas y diferenciadas a distintos días de diferenciación.

Teniendo en cuenta estos datos, se trató de analizar la funcionalidad de las MED17.11, estudiando a través de imagen de calcio la capacidad de respuesta a diversos estímulos. De forma estandarizada se aplicaron 45 segundos de Capsaicina (Caps) a 10 μ M; adenosin-5'-trifosfato (ATP) a 10 μ M y cloruro potásico (KCl) a 40 mM, con un intervalo de lavado y recuperación entre ellos de 4 minutos (Figura 22B).

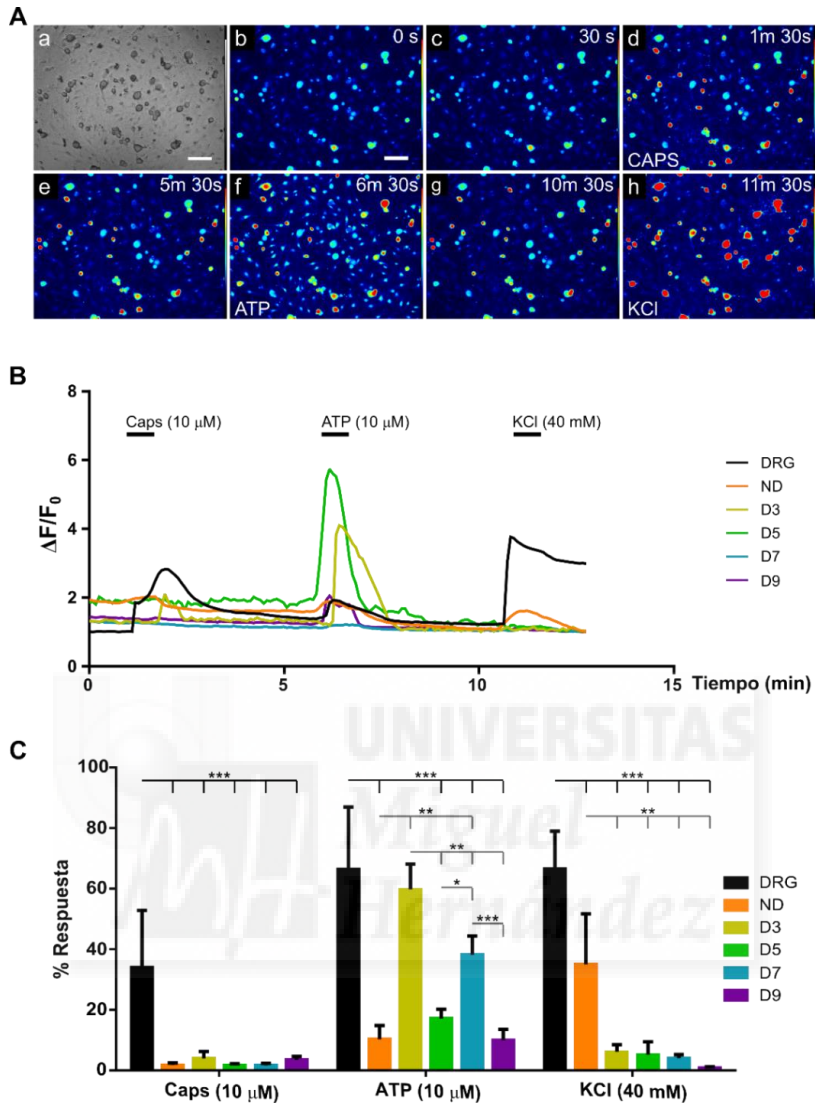


Figura 22. Análisis de imagen de Ca^{2+} de la línea celular MED17.11 no diferenciada y diferenciada en comparación con DRG de ratón adulto. A) Secuencia temporal del registro de fluorescencia aplicando el protocolo de estimulación en cultivo de DRGs de ratón adulto. a: fotografía en luz transmitida del cultivo de DRGs; b: imagen de fluorescencia en el inicio del registro que corrobora la carga de las células con la sonda Fluo-4 tras 40 min de incubación; c: imagen de fluorescencia a los 30 segundos, pre aplicación del estímulo de capsaicina (Caps); d: imagen de fluorescencia al minuto y 30 segundos, durante la aplicación del estímulo de Caps; e: imagen de fluorescencia a los 5 minutos y 30 segundos, tras lavado y pre aplicación del estímulo de adenosina trifosfato (ATP); f: imagen de fluorescencia a los 6 minutos y 30 segundos, durante la aplicación del estímulo de ATP; g: imagen de fluorescencia a los 10 minutos y 30 segundos, tras lavado y pre aplicación del estímulo de cloruro potásico (KCl); h: imagen de fluorescencia a los 11 minutos y 30 segundos, durante la aplicación del estímulo de KCl. Barra de escala correspondiente a 250 μm . B) Registros representativos en imagen de Ca^{2+} para DRGs y MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 3 (D3), día 5 (D5), día 7 (D7) y día 9 (D9). Se señala en negro el momento y la duración de los pulsos de los tres estímulos aplicados, Caps, ATP y KCl. C) Porcentaje medio de respuestas obtenidas para cada uno de los estímulos aplicados en los registros considerando el número de células que respondieron a cada estímulo respecto al total de células registradas en DRG: n=786; ND: n=486; D3: n=553; D5: n=542; D7: n=646 y D9: n=858. * se corresponde al p-valor < 0.05; ** se corresponde al p-valor < 0.01 y *** se corresponde al p-valor < 0.001 (análisis de la varianza ANOVA/ test post-hoc Bonferroni).

Tabla 3. Porcentaje de respuesta de las células a un único estímulo, a dos estímulos o a los tres estímulos aplicados. Se recogen los datos obtenidos en imagen de calcio para DRGs de ratón adulto, y MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 3 (D3), a día 5 (D5), a día 7 (D7) y a día 9 (D9) a los estímulos de capsaicina (Caps), adenosina trifosfato (ATP) y cloruro potásico (KCl). Se especifica el número de células total tenidas en cuenta y el número de campos analizados para cada uno de los tipos celulares analizados.

	Nº Células (Total)	% sólo Caps	% sólo ATP	% sólo KCl	% Caps/ATP	% ATP/KCl	% Caps/KCl	% Caps/ATP/KCl	N (nº cristales)
<i>DRGs</i>	786	5,98	22,14	15,01	4,07	25,19	12,21	11,83	11
<i>ND</i>	486	0,41	3,5	37,65	0	9,26	0,21	0,62	7
<i>D3</i>	553	0,90	51,9	1,45	2,17	3,25	1,45	0,54	11
<i>D5</i>	542	1,11	16,05	6,64	0,18	0,92	0,18	0,18	11
<i>D7</i>	646	0,93	32,97	2,17	0,31	1,70	0,15	0,31	14
<i>D9</i>	858	2,91	11,07	0,47	0,7	0,35	0,12	0	11

En las pruebas de control realizadas sobre el cultivo primario de DRGs se observó que menos de la mitad de las células respondían a capsaicina (Figura 22A). En determinados casos, la aplicación de la misma condujo a la muerte celular, pero en líneas generales, casi todas las células que respondían a caps. lo hacían también a los estímulos de ATP y KCl o sólo a KCl (Tabla 3). Más de un quinto de las células analizadas en DRGs respondían únicamente a ATP, correspondiéndose por norma general a glía presente en el cultivo (Tabla 3) (Figura 22A). Comparando las respuestas observadas de cultivo de DRGs (Figura 22A-B) con las MED17.11 se detectó que estas últimas tenían una muy baja respuesta a capsaicina, con diferencias significativas respecto a los DRGs pero sin diferencias en el porcentaje de respuesta entre los distintos días de diferenciación (ANOVA, F=9,851, p-valor < 0,001) (Figura 22C). En el caso de las respuestas a KCl se detectó una disminución significativa respecto a DRGs tanto en ND como en las células diferenciadas (test post-hoc Bonferroni, p-valor < 0,001). También se registró una reducción significativa (test post-hoc Bonferroni, p-valor < 0,01) entre el porcentaje de respuesta a KCl por parte de las células ND (35 ± 44.2) y las células diferenciadas (D3: $6,17 \pm 7,67$; D5: $5,19 \pm 14,29$; D7: $4,01 \pm 4,72$; D9: $0,87 \pm 1,31$). Aunque, si bien las células ND presentaron un elevado porcentaje de respuesta a KCl en muchos casos, a diferencia de los DRG, éste era el único estímulo al que respondían (Tabla 3). La respuesta al ATP pareció aleatoria y no tendía a correlacionarse con el proceso de diferenciación y maduración de las MED17.11. Así, la reducción significativa (post-hoc Bonferroni, p-valor < 0,001) en el porcentaje de células que respondieron a ATP en comparación con DRGs, en las células D3 no fue significativa (Figura 22C). El porcentaje de células que respondía únicamente a ATP fue muy superior en las células a D3 y D7 (Tabla 3).

La falta de respuesta a capsaicina evidenció la carencia de TRPV1 funcional en las MED17.11. Por otro lado, la diferenciación mostró una reducción dramática en la respuesta al KCl por parte de las MED17.11. Así, los registros obtenidos mostraron que funcionalmente las MED17.11 no se comportaban como neuronas, encontrándose bastante alejadas de los nociceptores peptidérgicos buscados.

Análisis del envejecimiento celular de las MED17.11

La carencia de un modelo celular funcional, y los efectos sobre el sistema del protocolo empleado para la diferenciación hizo revisar en primer lugar las condiciones de las MED17.11 de partida. A lo largo de las pruebas y los análisis llevados a cabo, se detectó una alta heterogeneidad en la diferenciación celular. En particular los análisis de calcio mostraron una alta variabilidad entre experimentos. Así planteamos si el envejecimiento del cultivo podría afectar a la diferenciación. Por ello, se procedió a distinguir entre pases “jóvenes” (≤ 15) y pases “antiguos” (≥ 20).

En primer lugar, los análisis de visu con pase de distinta edad no mostraron diferencias morfológicas (Figura 23). Las células ND presentaron formas espiculadas y somas amplias en ambas edades (Figura 23A-B). Las MED17.11 diferenciadas, tanto en pases antiguos como pases jóvenes mostraron un cultivo heterogéneo, con células de variado tamaño y una red dendrítica y axonal desarrollada (Figura 23C-D).

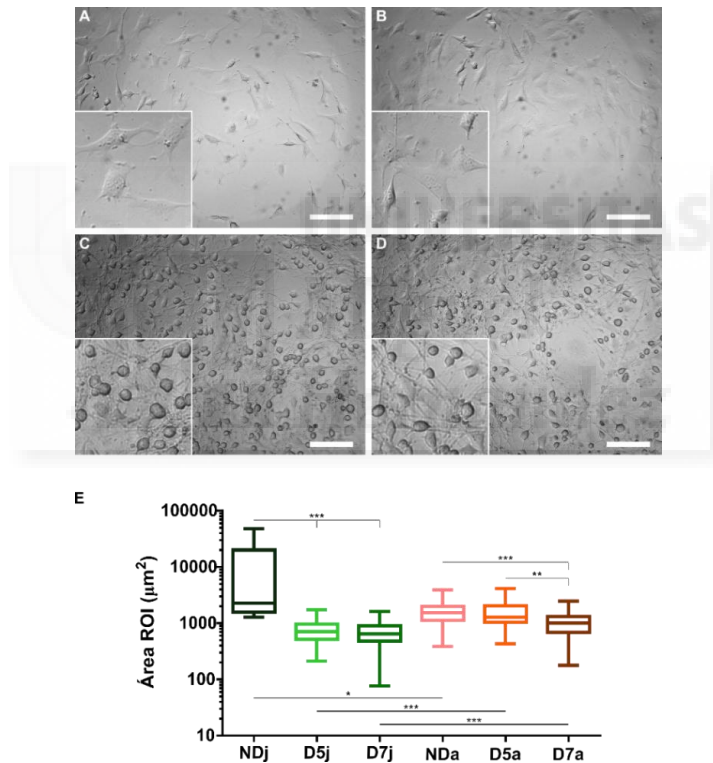


Figura 23. Análisis de la morfología de MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 5 (D5) en pase “joven” (j) (≤ 15) y pase “antiguo” (a) (≥ 20). A) Cultivo de MED17.11 no diferenciadas (ND) con medio de mantenimiento a 33°C de pase joven. B) Cultivo de MED17.11 no diferenciadas (ND) con medio de mantenimiento a 33°C de pase antiguo. C) Cultivo de MED17.11 a día 5 de diferenciación (D5) con medio de diferenciación a 37°C de pase joven. D) Cultivo de MED17.11 a día 5 de diferenciación (D5) con medio de diferenciación a 37°C de pase antiguo. Barra de escalas en las 4 imágenes correspondientes a 250 μm . Zoom del cultivo 2X en la parte inferior izquierda. E) Diagrama de cajas y bigotes para las áreas de las ROI de MED17.11 para pase joven y antiguo descartando los valores extremos. MED17.11 NDj: n=38; NDa: n=133; D5j: n=225; D5a: n=52; D7j: n=196 y D7a: n=121. Las cajas señalan el rango intercuartílico dónde la línea horizontal representa la mediana de las ROI. Los bigotes muestran los valores mínimo y máximo de las áreas para cada grupo de células. * se corresponde al p-valor < 0.05; ** se corresponde al p-valor < 0.01 y *** se corresponde al p-valor < 0.001 (Kruskal-Wallis/Test de Dunn para múltiples comparaciones).

Los análisis de las áreas de las ROI tras descartar los valores extremos, sin embargo, detectó diferencias significativas entre pases jóvenes y pases antiguos de las distintas fases analizadas (Kruskal-Wallis, p-valor < 0,001) (Figura 23E). Se encontró que el rango de tamaños en pases jóvenes en el caso de células ND ($10649 \pm 12947 \mu\text{m}^2$) era significativamente mayor que en pases antiguos ($1647 \pm 715,2 \mu\text{m}^2$) (Test de Dunn, p-valor < 0,001) (Figura 23E). Con la diferenciación el rango de tamaños se estrechaba, mostrando una menor variabilidad en todos los casos. La diferenciación mostró que, independientemente de la edad del pase, a día 7 (D7 joven: $713,6 \pm 304,3 \mu\text{m}^2$; D7 antiguo: $1052 \pm 473,1 \mu\text{m}^2$) los tamaños de las células fueron significativamente menores respecto a las células no diferenciadas (Test de Dunn, p-valor < 0,001) (Figura 23E). Sin embargo, dichas diferencias de tamaño no se detectaron entre ND y D5 de pase antiguo ($1540 \pm 761,7 \mu\text{m}^2$), mientras que sí se detectaron (Test de Dunn, p-valor < 0,001) con las células a D5 en pase joven ($769,9 \pm 327,7 \mu\text{m}^2$) (Figura 23E).

Aunque la morfología no pareció evidenciar diferencias, los tamaños celulares mostraron que las MED17.11 de pases jóvenes resultaban más afectadas por la diferenciación que las MED17.11 de pases antiguos, mostrando estas últimas unas áreas más similares en las distintas fases analizadas.

En la exploración del factor de la edad del pase de las MED17.11, se llevó a cabo también un análisis comparativo de la expresión de marcadores neuronales entre pases jóvenes y pases antiguos. Respecto a los primeros análisis realizados, se incrementaron el número de genes examinados y se efectuó una cuantificación relativa a través de qPCR respecto a DRGs de ratón adulto (Figura 24). El panel de marcadores analizados incluyó marcadores neuronales implicados en el desarrollo neuronal, marcadores típicos de nociceptores peptidérgicos y marcadores de nociceptores no peptidérgicos.



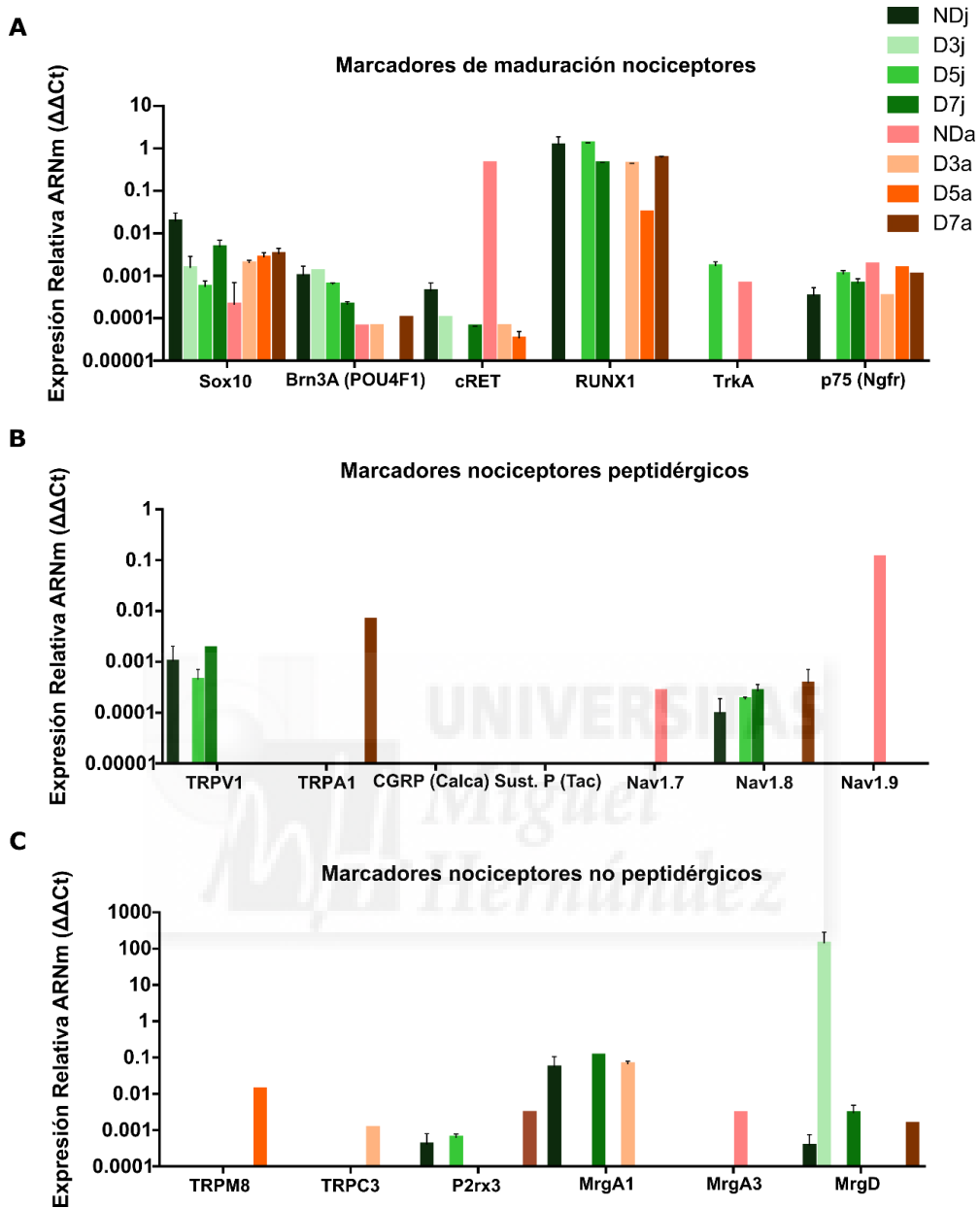


Figura 24. Resultados de la RT-qPCR con la expresión relativa de MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 3 (D3), a día 5 (D5) y a día 7 (D7) de pases jóvenes (j) (≤ 15) y antiguos (a) (≥ 20) en relación a la expresión de dichos marcadores en DRG de ratón adulto (no representado). A) Análisis de los factores de transcripción y receptores relacionados con la maduración de nociceptores, Sox10, Brn3a, cRet, Runx1, TrkA y p75. B) Análisis de receptores y canales iónicos presentes en nociceptores maduros generalmente peptidérgicos: TRPV1, TRPA1, CGRP, Sustancia P, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9. C) Análisis de receptores y canales iónicos presentes en nociceptores maduros generalmente no peptidérgicos: TRPM8, TRPC3, P2rx3, MrgA1, MrgA3 y MrgD. Control interno empleado para todos los casos GAPDH.

En los análisis llevados a cabo sólo el factor de transcripción Sox10, implicado en el desarrollo neuronal y presente en la glía, fue detectado en todas las muestras empleadas. Los valores de expresión resultaron muy bajos, entre 2 y 3 órdenes de magnitud inferiores a la expresión en DRGs. Este marcador, además, fue el único caso en el que el protocolo de diferenciación mostró un efecto opuesto en pases jóvenes y pases antiguos. Mientras que en pases jóvenes las células diferenciadas presentaron valores inferiores a las células ND, en pases antiguos la expresión de Sox10 se fue incrementando con el aumento de los días de diferenciación. En el caso Brn3a (Pou4f1) implicado también en el desarrollo de neuronas sensoriales, se detectaron niveles de expresión 3 órdenes de magnitud inferiores a los DRGs en MED17.11 de pases jóvenes. RunX1 fue el único marcador que se detectó en todas las muestras, salvo D3 de pase joven con niveles de expresión semejantes a los DRGs. Por lo general, las muestras de células diferenciadas de ambas edades presentaron valores inferiores a las células ND, apuntando a una tendencia hacia la reducción de la expresión de este factor de transcripción.

Para el resto de marcadores analizados, las expresiones detectadas fueron extremadamente bajas respecto a los DRGs, aleatorias y sin aparente relación con la edad de los pases o los estadios de diferenciación. Se detectaron, por ejemplo, expresiones aisladas de TRPV1, Nav1.8, P2rx3 o MrgA1, circunscritas únicamente a muestras de pases jóvenes. Por otro lado, los análisis a través de qPCR no detectaron la expresión de MrgA3, Nav1.9, Nav1.7, sustancia P (Tac) o CGRP (Calca) en ninguna muestra diferenciada independientemente del pase.

Aunque estos resultados mostraron diferencias de expresión entre pases jóvenes y antiguos, para la mayoría de los marcadores éstas fueron incoherentes y aleatorias. Las expresiones de los genes analizados mostraron grandes diferencias respecto a los DRGs adultos y la diferenciación celular no revirtió estas diferencias.

Se analizó también la funcionalidad de las MED17.11 distinguiendo entre pases jóvenes y pases antiguos a través de imagen de calcio, aplicando el mismo protocolo de estimulación con capsaicina, ATP y cloruro potásico al empleado anteriormente (Figura 25A). Funcionalmente, las MED17.11, indistintamente de la edad del pase o la fase de diferenciación, presentaron una respuesta por debajo del 25% a capsaicina, a KCl y a ATP en el caso de pases antiguos, (Figura 25B) (Tabla 4). La respuesta múltiple a los distintos estímulos aplicados resultó nula en la mayoría de las condiciones (Tabla 4). La edad del pase no mostró diferencias significativas entre sí con la aplicación de capsaicina ni con la aplicación de KCl (Test de comparaciones múltiples de Tukey, p-valor > 0,05) (Figura 25B). En el caso del ATP, las células no diferenciadas no presentaron diferencias significativas entre pases antiguos y pases jóvenes, sin embargo, las células diferenciadas a D5 y D7 de pases jóvenes mostraron una elevada respuesta al ATP, por encima del 30%.

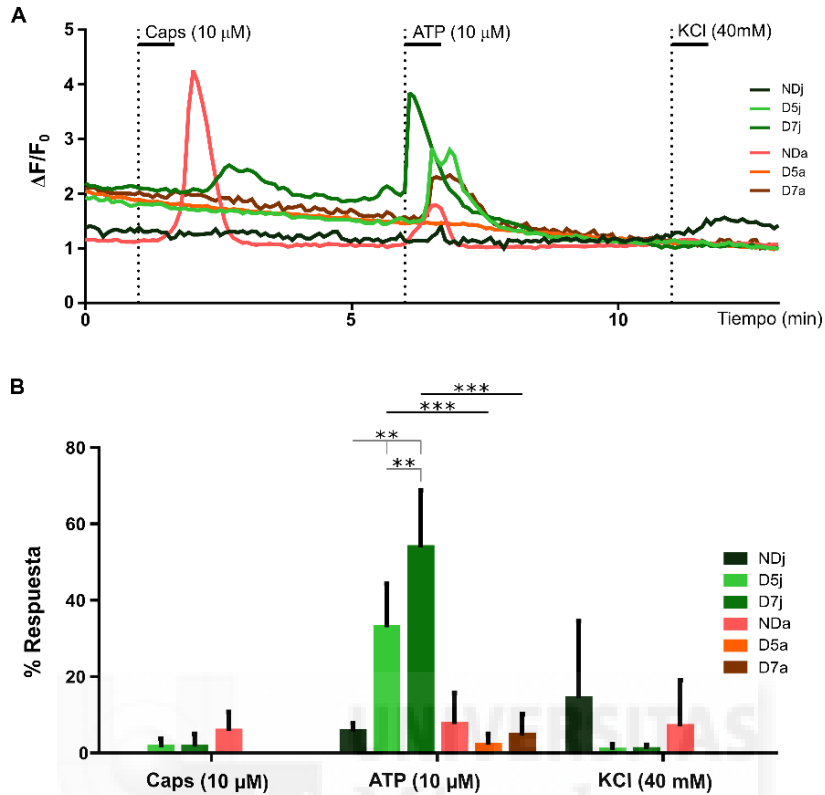


Figura 25. Análisis de imagen de Ca^{2+} en MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 5 (D5) y día 7 (D7) de pases jóvenes (j) (≤ 15) y antiguos (a) (≥ 20). A) Registros representativos de imagen de Ca^{2+} de MED17.11 NDj, NDa, D5j, D5a, D7j y D7a. Se señalan en negro el momento y la duración de los pulsos de los tres estímulos aplicados, Caps, ATP y KCl. B) Porcentaje medio de respuestas obtenidas a cada uno de los estímulos aplicados considerando el número de células que respondieron a cada estímulo respecto al total de células registradas para MED17.11 NDj: n=38; NDa: n=136; D5j: n=230; D5a: n=53; D7j: n=209 y D7a: n=125. ** se corresponde al p-valor < 0.01 y *** se corresponde al p-valor < 0.001 (análisis de la varianza ANOVA/ test post-hoc Bonferroni).

Tabla 4. Porcentaje de células que respondieron a uno, dos o tres estímulos en pase joven y pase antiguo. Se recogen los datos obtenidos en imagen de calcio para MED17.11 no diferenciadas (ND) y diferenciadas a día 5 (D5) y día 7 (D7) de pases jóvenes (j) (≤ 15) y antiguos (a) (≥ 20) a los estímulos de capsaicina (Caps), adenosina trifosfato (ATP) y cloruro potásico (KCl). Se especifica el número de células total tenidas en cuenta y el número de campos analizados para cada uno de los tipos celulares analizados.

	N° Cél. (Total)	% sólo Caps	% sólo ATP	% sólo KCl	% Caps/ ATP	% ATP/ KCl	% Caps/ KCl	% Caps/ATP/ KCl	N (n° cristales)
NDj	38	0	5,26	10,53	0	0	0	0	2
D5j	230	1,3	32,61	0,87	0	0	0	0	4
D7j	209	1,91	55,5	0,96	1,91	0	0,96	0	4
NDa	136	6,62	8,09	6,62	0,74	0,74	0	0,74	3
D5a	53	0	1,89	0	0	0	0	0	2
D7a	125	0	4	0	0	0	0	0	4

Estos resultados señalaron que, en pases jóvenes, el protocolo de diferenciación tenía algún tipo de efecto sobre las MED17.11 en relación a la respuesta al ATP. Sin embargo, las células diferenciadas analizadas no se comportaron como los nociceptores esperados. La baja respuesta al KCl detectada en las células ND se redujo o desapareció en las células diferenciadas sin distinción entre las edades de los pases usados. Así, el factor de envejecimiento del cultivo, aunque introducía alteraciones en la expresión y funcionalidad de las MED17.11, éstas no resultaban determinantes para el desarrollo de neuronas maduras y existían otros factores que impedían la obtención de nociceptores.

Modificaciones al protocolo de diferenciación de (Doran et al., 2015).

La lista de diferencias detectadas principalmente en la expresión de marcadores neuronales entre las MED17.11 no diferenciadas y los DRGs propició que se modificara el protocolo de mantenimiento y de diferenciación de las células. Bajo diferentes supuestos se analizaron y evaluaron distintas opciones en pro de conseguir nociceptores funcionales que expresaran TRPV1.

Adición de BMP4

Una de las modificaciones llevadas a cabo fue la adición de proteína morfogénica ósea 4 (BMP4, del inglés *bone morphogenetic protein 4*). Se optó por adicionar este compuesto basándonos en protocolos de diferenciación de células pluripotenciales inducibles (*ips cells*), donde es usada como factor de inducción del estado neural.

La adición de este compuesto al medio de mantenimiento y el medio basal de las MED17.11 no afectó a la morfología de las células ND. Los análisis de las inmunocitoquímicas realizadas no señalaron cambios en la morfología, el número o el tamaño medio de los núcleos (Figura 26A-C), así como tampoco en la detección de células positivas para Tuj1, GAFF, TrkA o TRPV1 (Figura 26B). Los análisis de área de las ROI mostraron que tanto la media como la variabilidad entre las MED17.11 ND no tratadas con BMP4 ($1194 \pm 585.4 \mu\text{m}^2$) y las tratadas ($1275 \pm 575.7 \mu\text{m}^2$) eran muy similares, no encontrando diferencias significativas entre ellas (Figura 26C).

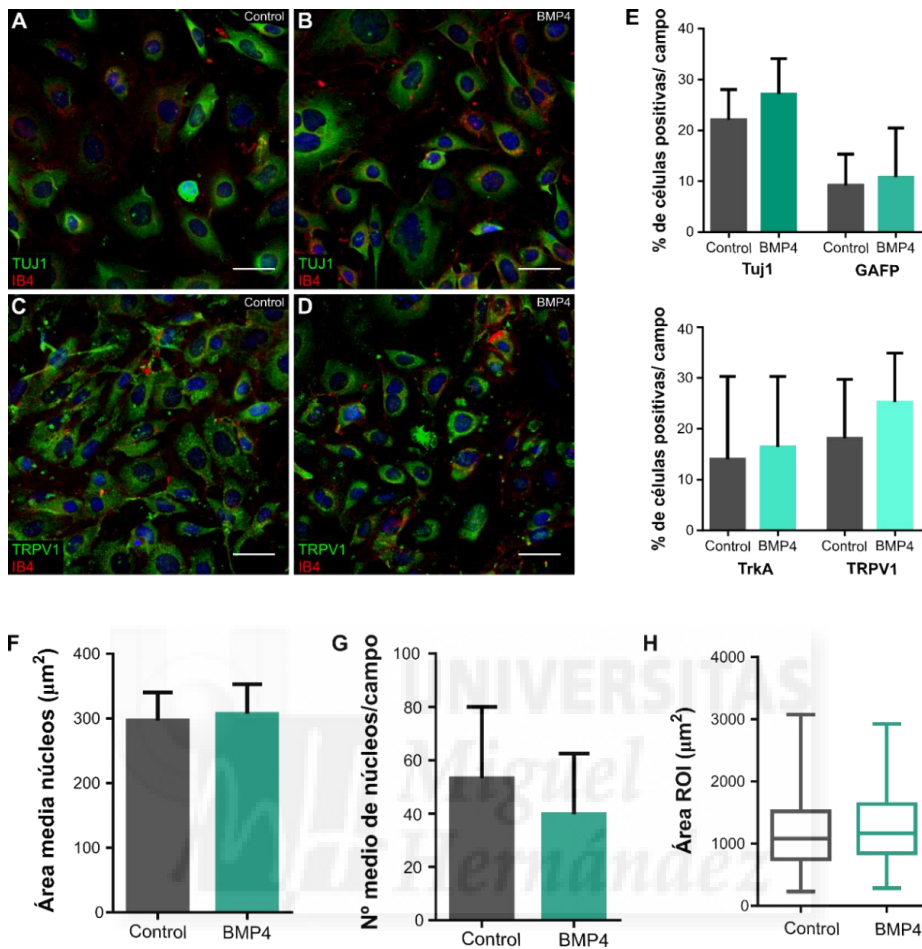


Figura 26. Análisis de la morfología de MED17.11 no diferenciadas (Control) y MED17.11 no diferenciadas tratadas con BMP4 (BMP4). A) Comarcaje de MED17.11 control en verde con Tuj1, marcador de células neuronales, y en rojo de IB4, marcador de nociceptores no peptidérgicos. B) Comarcaje de MED17.11 tratadas en verde con Tuj1, marcador de células neuronales, y en rojo de IB4, marcador de nociceptores no peptidérgicos. C) Comarcaje de MED17.11 control en verde con TRPV1, canal iónico presente en nociceptores peptidérgicos, y en rojo de IB4, marcador de nociceptores no peptidérgicos. D) Comarcaje de MED17.11 tratadas con BMP4 en verde con TRPV1, canal iónico presente en nociceptores peptidérgicos, y en rojo de IB4, marcador de nociceptores no peptidérgicos. Barra de escala de 50 µm. E) Diagrama de barras para el porcentaje medio de células contabilizadas como positivas por campo para Tuj1, GAFP, TrkA y TRPV1 de MED17.11 ND no tratadas y tratadas con BMP4 donde se analizaron ND control Tuj1 n=31, ND BMP4 Tuj1 n=18, ND control GAFP1 n=31, ND BMP4 GAFP n=35, ND control TrkA n=34, ND BMP4 TrkA n=35, ND control TRPV1 n=38 y ND BMP4 TRPV1 n=37 campos. F) Conteo automático del número de núcleos marcados con DAPI en las inmunocitoquímicas realizadas en MED17.11 no diferenciadas no tratadas (Control) y tratadas con BMP4 (BMP4). G) Análisis del área de los núcleos en las ICC para células ND no tratadas (Control) y tratadas con BMP4 (BMP4). Número de campos analizados: ND Control=129; ND BMP4=141. H) Diagrama de cajas y bigotes para las áreas de las ROI de MED17.11 Control (n=476) y MED17.11 BMP4 (n=196). Las cajas señalan el rango intercuartílico dónde la línea horizontal representa la mediana de las ROI. Los bigotes muestran los valores mínimo y máximo de las áreas para cada grupo de células.

A través de RT-qPCR, se analizó si la expresión de marcadores neuronales en MED17.11 no diferenciadas era alterada por la aplicación del BMP4 (Figura 27). Todos los marcadores relacionados con el desarrollo de neuronas fueron detectados tanto en las células tratadas como no tratadas con la excepción de TrkA que no se detectó en ninguna de las muestras y p75 (Ngrf) que sólo se detectó en las muestras no tratadas. No se detectaron cambios en los niveles de expresión, manteniéndose éstos en dos y tres órdenes de magnitud por debajo de la expresión en DRGs, salvo Runx1. TRPM8 fue el único canal iónico que se detectó en las células no tratadas, mientras que MrgD fue el único que presentó un aumento de la expresión en los cultivos tratados con BMP4. En conjunto la adición del compuesto no producía ninguna alteración en la expresión de los marcadores analizados (Figura 27).

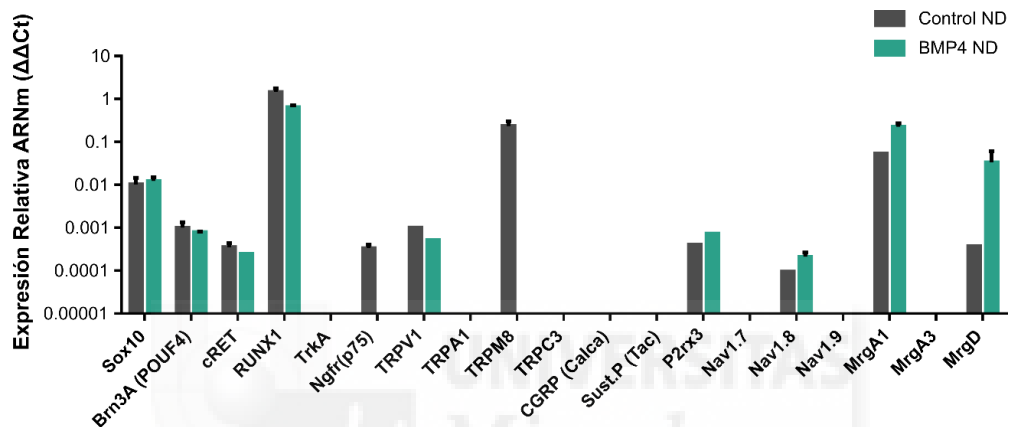


Figura 27. Expresión de marcadores neuronales en MED17.11 no diferenciadas no tratadas (Control) y MED17.11 no diferenciadas tratadas con BMP4 (BMP4). Resultados de la RT-qPCR con la expresión relativa en relación a la expresión de dichos marcadores en DRG de ratón adulto (no representado). Análisis de los factores de transcripción y receptores relacionados con la maduración de nociceptores, Sox10, Brn3a, cRet, Runx1, TrkA y p75, receptores y canales iónicos presentes en nociceptores maduros generalmente peptidérgicos: TRPV1, TRPA1, CGRP, Sustancia P, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9 y receptores y canales iónicos presentes en nociceptores maduros generalmente no peptidérgicos: TRPM8, TRPC3, P2rx3, MrgA1, MrgA3 y MrgD. Control interno empleado para todos los casos: GAPDH.

A nivel de funcionalidad, el protocolo seguido para el análisis de respuesta a capsaicina, ATP y KCl mostró que el porcentaje de respuesta a cada uno de los estímulos en las células ND tratadas con BMP4 fue inferior al 10 % (Figura 28). Para ninguno de los tres estímulos hubo diferencias significativas en las respuestas de las MED17.11 por la adición del BMP4 respecto a las células no tratadas (Figura 28).

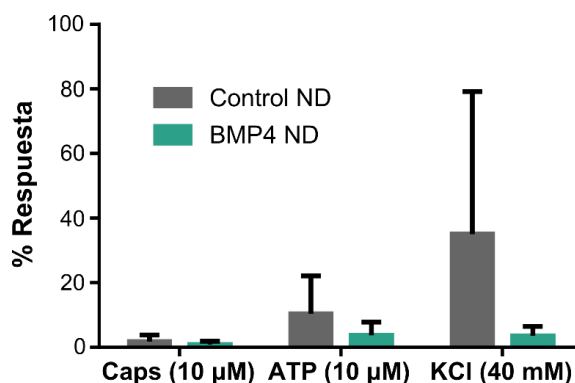


Figura 28. Respuesta media a los estímulos de capsaicina, ATP y KCl en MED17.11 no diferenciadas (Control) y MED17.11 no diferenciadas tratadas con BMP4 (BMP4) considerando el número de células que respondieron a cada estímulo respecto al total de células registradas para Control ND: n=486 y BMP4 ND: n=197.

Tomados en conjunto, la adición del compuesto BMP4 no afectó a las MED17.11 ni morfológica, ni estructural, ni funcionalmente. La diferenciación posterior de las células tratadas con este compuesto tampoco reflejó ninguna alteración respecto a las MED17.11 no tratadas.

Adición de compuestos citostáticos

Se planteó que la baja tasa de diferenciación detectada en las MED17.11 podría deberse a la elevada heterogeneidad morfológica detectada en los días más avanzados de la diferenciación y el mantenimiento de las células en división durante este proceso. Estos dos factores trataron de contrarrestarse con la aplicación de compuestos citostáticos para restringir, durante la fase de diferenciación, los tipos celulares presentes en el cultivo de MED17.11. Se optó por testar los citostáticos arabinósido de citosina (AraC) y 5'-desoxi-5-fluorouridina (dFUR), ampliamente usados para la restricción del crecimiento de glía en cultivos neuronales.

Tanto la aplicación del AraC como del dFUR con el medio de diferenciación redujo el número de células con características similares a las MED17.11 no diferenciadas. En ambos casos, los análisis morfológicos *de visu* mostraron una prevalencia de células con soma pequeño y redondeado y una amplia red axonal y dendrítica (Figura 29A-C). Por otro lado, los análisis de las áreas de las ROI señalaron cambios significativos entre tratamientos (Kruskal-Wallis, p-valor < 0,001) (Figura 29D). La comparativa entre los distintos días de diferenciación no tratados y tratados con cada uno de los citostáticos señaló una reducción significativa de las áreas a D3 (Control: $918.6 \pm 390.9 \mu\text{m}^2$; AraC: $692.8 \pm 271.3 \mu\text{m}^2$; dFUR: $580.5 \pm 243.2 \mu\text{m}^2$) (Test de Dunn, p-valor < 0,001). A D7 no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, mostrando tamaños y rango muy similares entre ellos (Control: $836.4 \pm 384.9 \mu\text{m}^2$; AraC: $905.1 \pm 362.5 \mu\text{m}^2$; dFUR: $843.4 \pm 980.5 \mu\text{m}^2$) (Figura 29D). A día 9 de diferenciación, las células tratadas con dFUR mostraron un mayor tamaño medio además de una gran variabilidad de los mismos de forma significativa (Control: $775.3 \pm 358.9 \mu\text{m}^2$; AraC: $886.8 \pm 482.7 \mu\text{m}^2$; dFUR: $1212 \pm 555.5 \mu\text{m}^2$) (Test de Dunn, p-valor < 0,001) (Figura 29D). En contra de lo observado con las MED17.11 diferenciadas sin tratar, las células tratadas con AraC aumentan su tamaño medio y su variabilidad a lo largo de la diferenciación, siendo estadísticamente significativa dicha variación entre D3 y D7 (Test de Dunn, p-valor < 0,01) (Figura 29D). En el caso de las células tratadas con dFUR este aumento de la variabilidad y el tamaño resulta significativo entre los 3 estadios analizados (Test de Dunn, p-valor < 0,05) (Figura 29D).

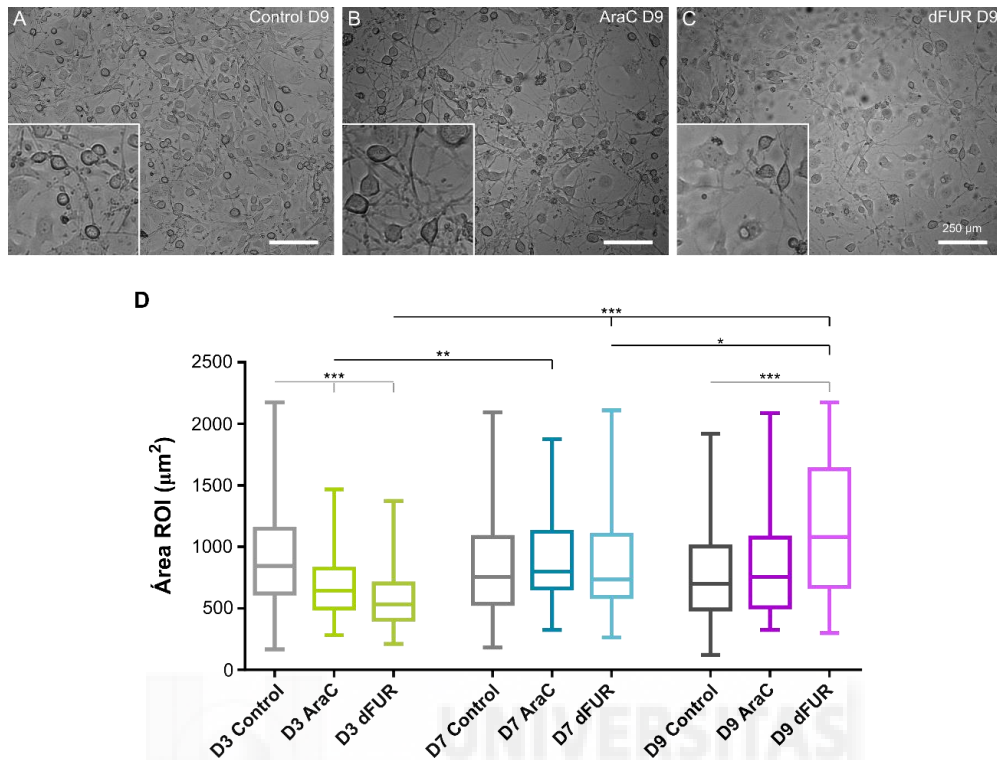


Figura 29. Análisis de la morfología de MED17.11 diferenciadas a día 3 (D3), a día 7 (D7) y a día 9 (D9) no tratadas (Control) y tratadas con AraC y dFUR. A) Cultivo de MED17.11 diferenciadas a día 9 (D9) con medio de diferenciación sin tratamiento de citostáticos. B) Cultivo de MED17.11 a D9 con medio de diferenciación y tratamiento con AraC. C) Cultivo de MED17.11 diferenciadas a D9 con medio de diferenciación y tratamiento con dFUR. Barra de escala de las 3 imágenes 250 µm y zoom 2X en la parte inferior izquierda. D) Diagrama de cajas y bigotes para las áreas de las ROI de MED17.11 a D3 Control (n= 572), tratadas con AraC (n= 75) y tratadas con dFUR (n=115); a D7 Control (n= 617), tratadas con AraC (n= 102) y tratadas con dFUR (n=77) y a D9 Control (n= 815), tratadas con AraC (n= 33) y tratadas con dFUR (n=39). Las cajas señalan el rango intercuartilico donde la línea horizontal representa la mediana de las ROI. Los bigotes muestran los valores mínimo y máximo de las áreas para cada grupo de células. ** se corresponde al p-valor < 0.01 y *** se corresponde al p-valor < 0.001 (Kruskal-Wallis/Test de Dunn para múltiples comparaciones).

Aunque morfológicamente los tratamientos con los citostáticos parecían reducir la variabilidad de las MED17.11 los análisis de tamaños demostraron que salvo a D3, los tratamientos no resultaban efectivos e incluso propiciaban el aumento de la heterogeneidad.

El análisis de funcionalidad a través de imagen de calcio mostró que la restricción de los tipos celulares en los cultivos no aumentó la proporción de respuestas a los estímulos de capsaicina, ATP o KCl. De hecho, éstos resultaron más bajos que los detectados en los cultivos sin tratar con citostáticos (Figura 30D). Únicamente las células tratadas con AraC a día 3 presentaron un aumento en el porcentaje de respuestas a capsaicina, aunque no significativo (post hoc Test de Bonferroni, múltiples comparaciones , p-valor > 0,05) (Figura 30D). La reducción en las respuestas a ATP en todos los días de diferenciación analizados, sin embargo, sí que resultó significativa en ambos tratamientos (post hoc Test de Bonferroni, múltiples comparaciones , p-valor < 0,05) (Figura 30D).

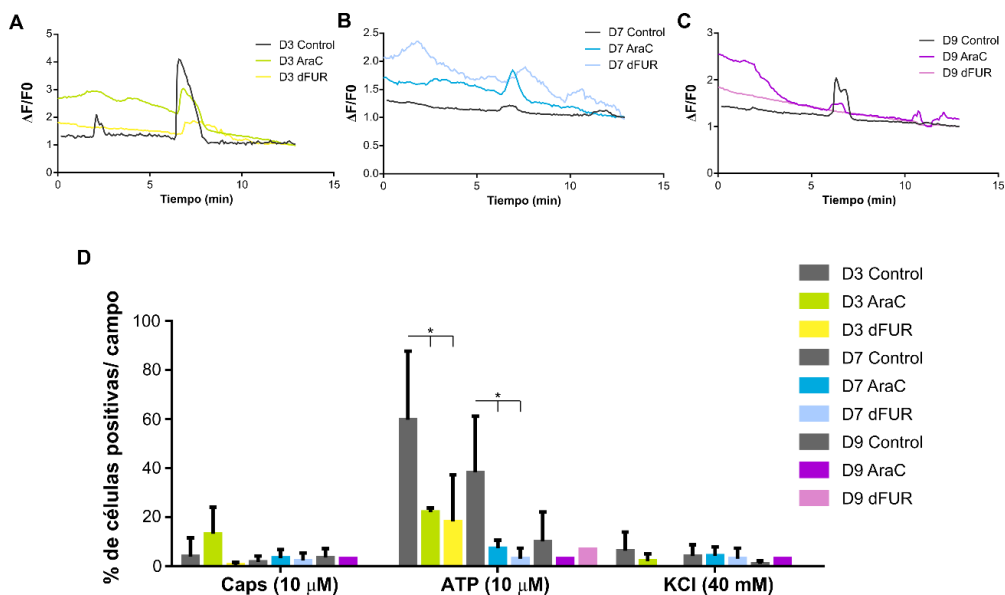


Figura 30. Análisis de imagen de Ca^{2+} en MED17.11 diferenciadas a día 3 (D3), a día 7 (D7) y a día 9 (D9) no tratadas (Control) y tratadas con los citostáticos AraC y dFUR respectivamente. A) Registros representativos de imagen de Ca^{2+} de MED17.11 diferenciadas a D3 sin tratar (Control), tratadas con AraC y tratadas con dFUR con la aplicación de capsaicina al minuto 1, de ATP al minuto 6 y KCl al minuto 11 de registro. B) Registros representativos de imagen de Ca^{2+} de MED17.11 diferenciadas a D7 sin tratar (Control), tratadas con AraC y tratadas con dFUR con la aplicación de capsaicina al minuto 1, de ATP al minuto 6 y KCl al minuto 11 de registro. C) Registros representativos de imagen de Ca^{2+} de MED17.11 diferenciadas a D9 sin tratar (Control), tratadas con AraC y tratadas con dFUR con la aplicación de capsaicina al minuto 1, de ATP al minuto 6 y KCl al minuto 11 de registro. D) Porcentaje medio de respuestas obtenidas a cada uno de los estímulos aplicados considerando el número de células que respondieron a cada estímulo respecto al total de células registradas para MED17.11 a D3 Control (n= 553), tratadas con AraC (n= 80) y tratadas con dFUR (n=120); a D7 Control (n= 646), tratadas con AraC (n= 105) y tratadas con dFUR (n=78) y a D9 Control (n= 858), tratadas con AraC (n= 33) y tratadas con dFUR (n=29). * se corresponde al p-valor < 0.05 (análisis de la varianza ANOVA/ test post-hoc Bonferroni).

Estos resultados demostraron que la aplicación de los citostáticos afectaba a las MED17.11 en sentido inverso al esperado. Con la intención de reducir la heterogeneidad para aumentar la tasa de producción o detección de nociceptores maduros, los citostáticos, sin embargo, produjeron una reducción del número de células funcionales por lo que su uso se descartó.

Adición de NGF a MED17.11 no diferenciadas

Diversas investigaciones han demostrado que el factor de crecimiento nervioso, el NGF, resulta clave en el desarrollo, viabilidad y supervivencia de los cultivos neuronales. Si bien este factor era aplicado para la diferenciación celular de las MED17.11, la carencia del mismo en las células no diferenciadas se planteó como un posible factor determinante y limitante del correcto desarrollo y diferenciación celular. Para comprobar esta posibilidad se llevó a cabo la adición de una baja concentración de NGF (un quinto de la concentración empleada para la diferenciación) tanto al medio de mantenimiento como al basal.

Los análisis morfológicos *de visu* no mostraron diferencias entre las células ND no tratadas (Figura 31A) y tratadas con NGF (Figura 31B). En ambos casos las células mostraron generalmente un soma

amplio y espiculado muy similar y homogéneo. Sin embargo, los análisis de los tamaños de las ROI mostraron que el tratamiento de NGF aumentó significativamente el tamaño de las células (ND Control: $1194 \pm 585.4 \mu\text{m}^2$ y ND NGF: $1551 \pm 684.2 \mu\text{m}^2$) (Mann Whitney test, p-valor < 0,001) (Figura 31C). Los análisis de funcionalidad, a su vez, mostraron una reducción en el porcentaje de respuestas a capsaicina y KCl, sin embargo, la alta variabilidad en los registros dio lugar a que dichas diferencias no resultaran significativas (Control caps: $1.76 \pm 2.01 \%$; NGF caps: $0.88 \pm 1.02 \%$; Control ATP: $10.34 \pm 11.81 \%$; NFG ATP: $3.68 \pm 4.13 \%$; KCl Control: $35.03 \pm 44.2 \%$ y NFG KCl: $3.54 \pm 2.92 \%$)(Figura 31E).

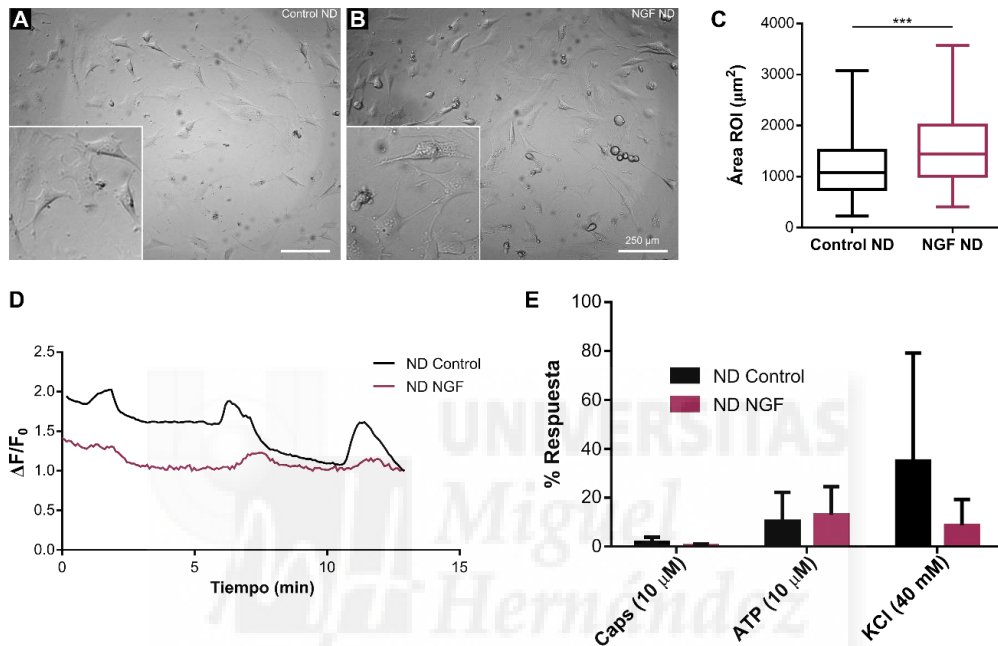


Figura 31. Análisis de morfología y respuesta de MED17.11 no diferenciadas no tratadas (Control) y tratadas con NGF. A) Cultivo de MED17.11 no diferenciadas con medio de mantenimiento sin tratamiento. B) Cultivo de MED17.11 a D9 no diferenciadas con medio de mantenimiento y tratadas con NGF. Barra de escala de las imágenes 250 μm y zoom 2X en la parte inferior izquierda. C) Diagrama de cajas y bigotes para las áreas de las ROI de MED17.11 Control (n= 476) y MED17.11 BMP4 (n= 261). Las cajas señalan el rango intercuartílico dónde la línea horizontal representa el área mediana de las ROI. Los bigotes muestran los valores mínimo y máximo de las áreas para cada grupo de células. D) Registros representativos de imagen de Ca^{2+} de MED17.11 no diferenciadas sin tratar (Control) y tratadas con NGF con la aplicación de capsaicina al minuto 1, de ATP al minuto 6 y KCl al minuto 11 de registro. E) Porcentaje medio de respuestas obtenidas a cada uno de los estímulos aplicados considerando el número de células que respondieron a cada estímulo respecto al total de células registradas para MED17.11 no diferenciadas Control (n= 486) y tratadas con NGF (n= 265).

En conjunto, el tratamiento con NGF a las MED17.11 no diferenciadas no pareció afectar a ningún aspecto de las mismas, salvo el tamaño medio registrado. La falta de respuesta funcional por parte de las mismas puso en duda su uso para una optimización de los cultivos celulares de las MED17.11 ND.

Diseño de nuevo protocolo de diferenciación de las MED17.11

Obviando el origen neuronal de la línea MED17.11, se optó por plantear un nuevo protocolo de diferenciación. Basándonos en un protocolo de diferenciación de fibroblastos a nociceptores con moléculas de pequeño tamaño (Chambers et al., 2012), se trató la línea MED17.11 como una línea celular de fibroblastos. Adaptando la secuencia de moléculas pequeñas descritas en (Chambers et al., 2012), a los tiempos de las MED17.11, se procedió con la desdiferenciación de las células para la posterior diferenciación a nociceptores (Figura 32A).

Únicamente se llevó a cabo un análisis *de visu* para corroborar si el protocolo planteado producía algún cambio morfológico en las células. En este caso, la aplicación del Y-27632 de forma pre-inductora dio lugar a la aparición de pequeñas prolongaciones, neuritas semejantes a principios dendríticos y axonales (Figura 32B). La reproducción y expansión de las células no se vio inhibida por la aplicación de los distintos compuestos inhibidores a día 0 y día 2. Se observó un aumento considerable del número de células, con un soma de considerable tamaño, de aspecto ameboso y con un estrechamiento de las prolongaciones (Figura 32C-D). Tras la aplicación de los factores de diferenciación a día 5, la red axonal-dendrítica comenzó a desarrollarse (Figura 32E), particularmente en áreas con una menor confluencia de células. Aunque el soma se redondeó, éste generalmente no se esferificaba como en las neuronas sensoriales.

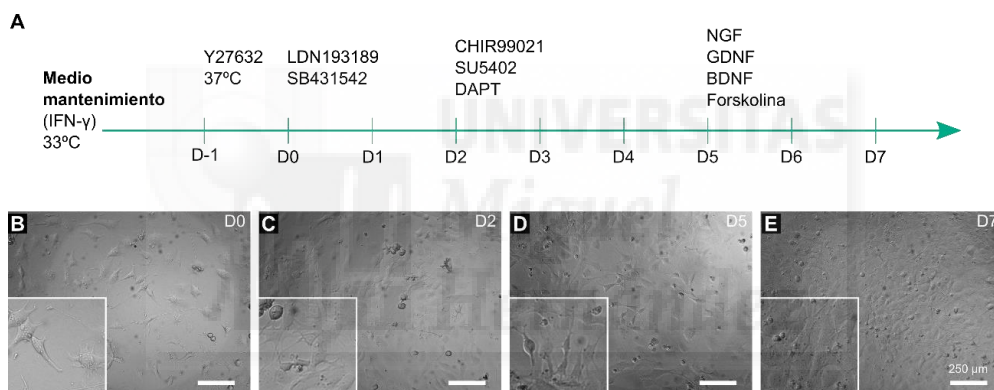
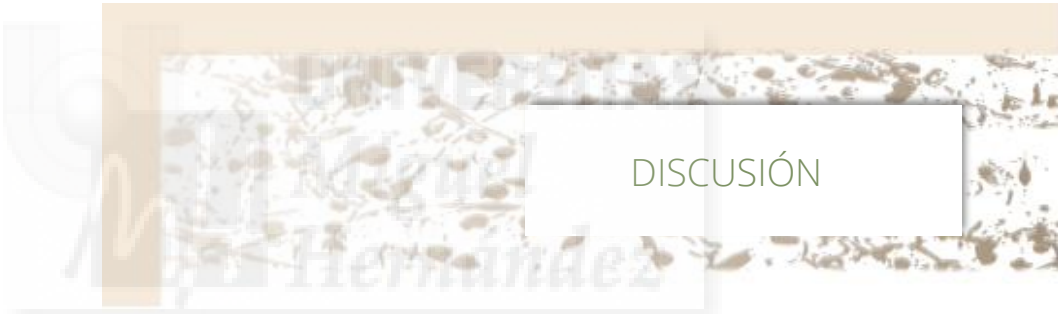


Figura 32. Aplicación de un nuevo protocolo de reprogramación y diferenciación adaptado para la línea celular MED17.11. A) Esquema del protocolo de reprogramación y diferenciación de la línea celular MED17.11 dónde se señalan el momento de adición al medio basal DMEM suplementado con FBS y P/S (véase Materiales y Métodos) los compuestos IFN- γ : Interferón Gamma; compuestos de pequeño tamaño (LDN193189; SB431542; CHIR99021; SU5402 y DAPT, descritos en (Chambers et al., 2012): NGF: factor de crecimiento nervioso; GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía; BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro. B) Cultivo de MED17.11 a día 0 de aplicación del nuevo protocolo, habiendo retirado el IFN- γ , cambiado la temperatura de incubación y aplicado el Y27632. C) Cultivo de MED17.11 a día 2 de aplicación del nuevo protocolo, habiendo retirado el Y27632 y aplicado los compuestos LDN y SB. D) Cultivo de MED17.11 a día 5 de aplicación del nuevo protocolo, habiendo retirado los compuestos LDN y SB y aplicado CHIR, SU y DAPT. E) Cultivo de MED17.11 a día 7 de aplicación del nuevo protocolo, habiendo retirado los compuestos CHIR, SU y DAPT y aplicados los factores de diferenciación NGF, GDNF, BDNF y Forskolina. Barra de escala de las imágenes 250 μm y zoom 2X en la parte inferior izquierda.

Si bien la aplicación del nuevo protocolo promovió cambios morfológicos muy marcados y evidentes en las MED17.11, éstos no derivaron en la aparición de células de aspecto neuronal. La alta reproducción celular resultó en un problema, con cultivos sobrecrecidos y la presencia de numerosos residuos celulares.

En resumen, la línea celular MED17.11 no pudo diferenciarse a nociceptores peptidérgicos maduros y funcionales. Todos los intentos de reproducción del protocolo de diferenciación, la introducción de distintas modificaciones, incluso la aplicación de un protocolo de desdiferenciación adaptado a la línea celular, condujo a cambios morfológicos muy marcados en las células. Sin embargo, los análisis de expresión con marcadores neuronales mostraron grandes discrepancias en comparación al tejido de referencia, los DRGs adultos de ratón. Por otra parte, las MED17.11 diferenciadas no mostraron, bajo ninguna condición, respuestas a KCl, poniendo en cuestión su funcionalidad neuronal. A pesar de los distintos intentos llevados a cabo, las MED17.11 no pudieron ser validadas como modelo celular de nociceptores *in vitro* y se descartó su uso para el estudio de TRPV1 y la creación del modelo celular modificado YFP-TRPV1.





DISCUSIÓN

El estudio de la nocicepción, al igual que el estudio de los TRPs, resulta una tarea muy compleja. La heterogeneidad de las señales potencialmente dañinas requiere de un sistema igualmente heterogéneo que pueda responder ante cualquier tipo de alteración o lesión (Gascon and Moqrich, 2010; Li et al., 2016). Por su parte, la familia de canales TRPs, con la estructura como única vinculación, aglutina una amplia variedad de canales iónicos con expresiones muy dispares, en ocasiones limitadas y en ocasiones prácticamente ubicuas. Funcionalmente, participan en una plétora de procesos biológicos donde la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} , el metabolismo, la visión, la termorregulación o la nocicepción son sólo algunos ejemplos (Benarroch, 2008; Earley et al., 2007; Flockerzi and Nilius, 2014; Khalil et al., 2018; Venkatachalam and Montell, 2007). En este último caso, el papel clave en la transducción de señales nociceptivas de determinados TRPs (TRPV1-4, TRPA1, TRPM8 y TRPM3), los han postulado como interesantes dianas para la terapia analgésica (Julius, 2013; Kaneko and Szallasi, 2014; Mickle et al., 2016; Nilius and Szallasi, 2014; Patapoutian et al., 2009). Así, el estudio de la nocicepción y el papel de los TRPs requiere de herramientas que permitan comprender la expresión, el funcionamiento y regulación de estos canales, tanto en procesos fisiológicos como fisiopatológicos del dolor.

En este sentido, la generación de modelos animales gracias al desarrollo y los avances en la ingeniería genética, ha constituido uno de los pilares fundamentales en el progreso de la investigación del dolor. Aunque la gran mayoría se corresponde con modelos de pérdida de función o *knock-out*, son cada vez más los animales *knock-in* que se vienen desarrollando (Lacroix-Fralish et al., 2007; Mogil and Grisel, 1998). Estos últimos, en su mayoría, se corresponden con modelos de marcaje que han ayudado a comprender la expresión de los canales iónicos y la identificación de subpoblaciones celulares (Freichel et al., 2011; Wyatt et al., 2017). Sin embargo, la falta de control en la expresión de los marcadores introducidos limita el uso de estos modelos precisamente al estudio de la expresión. La generación de modelos "*knock-add-on*", un derivado de los animales *knock-in*, son una interesante herramienta al permitir, no sólo la localización y la identificación de la expresión de un determinado gen, sino el transporte y la regulación, así como, el reciclaje de la proteína de interés a tiempo real, *in vitro* e *in vivo* bajo condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (Freichel et al., 2011). El potencial de este tipo de modelos transgénicos fue lo que llevó a plantear su creación con el canal iónico TRPV1 en el presente trabajo.

La generación del modelo YFP-TRPV1 se fundamentó en procedimientos clásicos de generación de animales transgénicos (Bouabe and Okkenhaug, 2013; Bradley et al., 1992; Doyle et al., 2012; Freichel et al., 2011; Lamoreux et al., 2010; Overbeek, 2014; Seong et al., 2004). El uso de células madre derivadas de la cepa de ratón 129Sv, resulta una práctica común por razones prácticas e históricas y la inserción de éstas en blastocistos C57bl/6J facilita el análisis fenotípico y aumenta la fertilidad de la línea (Seong et al., 2004). El alto número de clones 129Sv obtenidos, la generación de un número aceptable de animales quimera (6 animales) y la elevada fertilidad tanto de las quimeras como de las generaciones posteriores avalaron el empleo de este procedimiento.

Por otro lado, la identificación de un clon recombinante válido para su inyección en la generación del modelo animal presentó numerosas y diversas incidencias. Aunque los Southern blots y las PCRs largas son procedimientos habituales para la identificación de ES modificados en la transgénesis (Vicente-García et al., 2014), en este trabajo resultaron técnicas limitadas, no reproducibles y no concluyentes. En el caso de los Southern blots nos encontramos con restricciones técnicas que forzaron una estrategia dividida en etapas. A pesar de realizar todos los controles procedimentales pertinentes, ni siquiera el ADNg control de las células 129Sv no modificadas originó una banda reconocible. Esto derivó en el abandono de esta técnica para la identificación, altamente limitada presumiblemente por la estrategia seguida además de por la calidad del ADNg de las células 129Sv.

DISCUSIÓN

Por su parte, las PCRs largas presentan dificultades inherentes a la técnica (Albers et al., 2017). Las capacidades de las polimerasas para elongaciones largas son limitadas, con una alta tasa de introducción de mutaciones y requieren, en muchos casos, protocolos de ciclos complejos con variaciones progresivas de temperatura o duración de cada ciclo. Además, para dichas amplificaciones largas, los moldes empleados requieren ser de alta calidad y algunos diseños de amplificaciones carecen de controles positivos produciendo un tedioso proceso de ensayo-error hasta la identificación (Albers et al., 2017; Irwin et al., 2014; Vicente-García et al., 2014). En este trabajo más allá de los problemas comunes ya mencionados para esta técnica, la falta de reproducibilidad de las amplificaciones obtenidas condicionó la credibilidad de los datos. Fue por ello que se necesitó recurrir a las PCRs anidadas para la identificación de al menos un clon adecuado. Aunque esta última técnica fue la que validó al clon 288 para su inyección en blastocistos, los resultados obtenidos con ella también resultaron, bajo determinadas condiciones, incongruentes, presentando amplificaciones de YFP en las muestras procedentes de células wt. Éstas fueron atribuidas al procesamiento de las muestras y no fueron tenidas en cuenta en la selección del clon.

Por último, la imposibilidad de confirmar a través de secuenciación del exoma la inserción de la YFP en el locus de TRPV1 estuvo condicionada por la cantidad del ADNg del clon a analizar. Sin embargo, la disparidad en las cuantificaciones según el procedimiento de análisis y la ligera degradación detectada volvió a poner el foco en la calidad del ADNg empleado, pudiendo ser éste y no sólo las técnicas realizadas el principal condicionante de los resultados obtenidos en el Southern blot, en las PCRs largas y en la secuenciación del exoma.

La generación de los animales quimera y los análisis de los animales heterocigotos obtenidos a partir de éstas introdujeron nuevas cuestiones sobre el modelo YFP-TRPV1 generado y en desarrollo. La mortalidad observada en algunos de los animales quimera neonatos planteó dudas sobre la modificación introducida. *A priori* la alteración de TRPV1 no parece implicada en alteraciones del desarrollo o la viabilidad de los animales tal y como demuestran los modelos *knock-out* para este canal iónico (Bolcskei et al., 2005; Caterina et al., 2000; Garami et al., 2011; Tucker and Stocker, 2016; Yee et al., 2015). Sin embargo, algunos estudios de translocación genómica en el cromosoma 11 han demostrado la letalidad de algunas alteraciones en este cromosoma, en el que se sitúa el locus de TRPV1 (Kile et al., 2003; Liu et al., 1998). Hasta donde sabemos las alteraciones descritas por estos trabajos no se han relacionado con TRPV1 pero algunos de los fenotipos descritos en el trabajo de Kile et al. (2003) resultan similares a la sintomatología descrita en los animales quimera fallecidos. Por otra parte, aunque la vinculación de TRPV1 con la nocicepción está ampliamente demostrada (Caterina et al., 2006; Dai, 2016; Jardin et al., 2017; Julius, 2013; Messeguer et al., 2006; Moran and Szallasi, 2018; Nilius and Szallasi, 2014) otras investigaciones también han relacionado este canal con la plasticidad sináptica en el hipocampo (Gibson et al., 2008), la longevidad (Riera et al., 2014), y por su papel en la termorregulación (Gavva, 2008), su activación en etapas críticas del desarrollo neural se ha vinculado con la aparición de malformaciones congénitas (Hutson et al., 2017). Con todo ello, la alteración de este gen podría desembocar en problemas en el desarrollo y causar mortalidad prematura.

A pesar de todo esto, los animales quimera recepcionados en nuestras instalaciones resultaron en animales morfológica y etiológicamente normales. Incluso la quimera B13, que presentó síntomas de ataxia tras su nacimiento, se recuperó y fue trasladada sin presentar a lo largo de su vida ninguna anomalía o afección patológica más. Las generaciones posteriores tampoco presentaron ninguna incidencia en su fertilidad, en su comportamiento o en su morfología, atribuyendo las muertes neonatales a razones idiopáticas.

La caracterización de la expresión de la YFP-TRPV1 en las distintas generaciones heterocigotas obtenidas mostró resultados contrarios a los esperados. Los animales analizados con la expresión de resistencia a la Neomicina mostraron la expresión de la YFP-TRPV1 a nivel de ARN. Por el contrario, en los animales que no presentaban esta resistencia no se detectó la expresión de la YFP-TRPV1 (Figura 10). La posibilidad de que la detección de YFP en la F1 fuera auspiciada por el promotor de la resistencia a la Neomicina en lugar del promotor de TRPV1 fue la primera hipótesis descartada. En el diseño y construcción del vector pKO-YFPTRPV1, la YFP se situó aguas arriba respecto al promotor mPGK utilizado para la expresión de resistencia a la Neomicina. Esto imposibilita que al eliminar este promotor se perdiera, junto con la resistencia a la Neomicina, la expresión de la YFP-TRPV1.

Otra de las hipótesis consideradas fue que el cruce con los animales FLP₀-10 hubiera afectado a la expresión de TRPV1. Los genotipados demostraban la transmisión de la YFP-TRPV1 a las siguientes generaciones, lo que descartaba que, en la escisión del marcador de resistencia, parte de la modificación introducida hubiera desaparecido en una extraña reordenación. Sin embargo, son numerosos los estudios que señalan el enorme impacto que el fondo genético tiene sobre la expresión de los genes (Doetschman, 2009; Lamoreux et al., 2010; Lariviere et al., 2001; Linder, 2001; Silva et al., 1997). La transgénesis con líneas celulares y blastocitos de diferente cepa animal ha sido criticada, y en numerosas ocasiones se ha abogado por el uso de líneas celulares madre y blastocitos de igual fondo genético (Auerbach et al., 2000; Lamoreux et al., 2010; Overbeek, 2014; Seong et al., 2004; Silva et al., 1997). Aunque la selección de la FLP₀-10 se basó precisamente en que el fondo genético de esta cepa era B6, como el de los animales quimera. El cruce y retrocruzamiento de esta línea con la generación F1 y N1 es un factor de variabilidad añadido a la variabilidad ya presente en estas generaciones. La corrección de ésta es posible a través de una serie de retrocruzamientos sucesivos que permitan homogeneizar el fondo genético pero, las estrategias tradicionales requieren de al menos 10 generaciones (Silva et al., 1997; Silver, 1995) y las nuevas estrategias que reducen el tiempo a 5 generaciones (Wakeland et al., 1997; Wong, 2002) tienen un elevado coste económico por los análisis genéticos que requieren.

Cabe resaltar además que la cepa de ratón puede ser un factor determinante en la expresión de TRPV1. Un estudio de nocicepción en 12 cepas distintas de ratón mostró diferencias significativas entre 11 de ellas en los distintos test de hiperalgesia al dolor inflamatorio o sensibilidad térmica llevados a cabo (Mogil et al., 1999). Otro estudio posterior, señala diferencias significativas en la expresión de diferentes TRPs, incluido TRPV1, en 3 cepas de ratón habituales en los laboratorios (Kunert-Keil et al., 2006). Por otra parte, diversas investigaciones señalan la presencia de polimorfismos en TRPV1, que, además de afectar al umbral de sensibilidad al dolor mediado por este canal (Kim et al., 2004; Lotsch and Geisslinger, 2007; Xu et al., 2007), estarían también relacionados con diferentes niveles de expresión del mismo (Xu et al., 2007). Todas estas influencias en la expresión de los genes podrían haber condicionado los resultados obtenidos respecto a la expresión de la YFP-TRPV1 en el ARN.

Sin embargo, y a pesar de lo expuesto anteriormente, ni la expresión del ARN ni de la proteína TRPV1 silvestre cambió entre las distintas generaciones analizadas (Figura 10 y Figura 12). De hecho, la expresión de TRPV1 no pareció verse afectada en los animales heterocigotos analizados respecto a los animales B6 controles en ninguna de las pruebas llevadas a cabo. Una posible explicación a este hecho sería que la expresión de los dos alelos de TRPV1 en los animales heterocigotos no presentaran codominancia, es decir, no se expresaran por igual y prevaleciera la expresión del alelo wt frente al alelo YFP-TRPV1. Aunque existen muy pocos estudios a este respecto, en la generación del modelo *knock-out* para TRPV1, los análisis genéticos del mismo señalan que la expresión de ARN en los animales hemocigotos para TRPV1 (+/-) es similar a los animales no modificados (+/+), a pesar de la

DISCUSIÓN

disrupción del gen (Caterina et al., 2000). Además, en la única referencia encontrada donde se emplean animales hemicigotos para TRPV1 señalan que éstos (+/-) no presentan diferencias comportamentales significativamente diferentes a los animales no modificados (+/+) (Ghilardi et al., 2005). Aunque en ambos casos, los resultados mostrados podrían deberse a una sobrecompensación por la pérdida de uno de los alelos, también podrían corresponderse a la no codominancia de los alelos de TRPV1. La generación de un animal homocigoto YFP-TRPV1 y la caracterización del mismo podría resolver la existencia o no de esta codominancia.

Por otra parte, si bien es cierto, que las inmunocitoquímicas reflejaron la presencia de YFP, ésta sólo era detectada con el uso de anticuerpos. En los controles sin anticuerpo llevados a cabo no se consiguió detectar señal alguna de fluorescencia, es decir, no se detectó YFP por sí misma. Esta falta de señal fue atribuida en un primer momento a un bajo nivel de expresión de la YFP-TRPV1 al tratarse del análisis en animales heterocigotos. Esta posibilidad también podría explicar la no detección de YFP-TRPV1 en los inmunoblots realizados. De hecho, la baja expresión de determinadas proteínas resulta uno de principales condicionantes de los modelos *knock-add-on* y ha sido limitante en algunos modelos de este tipo desarrollados (Francois et al., 2015; Freichel et al., 2011).

Por otro lado, los inmunoblots llevados a cabo reflejaban una alta inespecificidad de los anticuerpos GFP, por lo que la señal detectada en las inmunocitoquímicas, podría deberse a la unión inespecífica del anticuerpo. De hecho, esa elevada inespecificidad de los anticuerpos no permitió evaluar la presencia de YFP libre en los inmunoblots. Otra posibilidad sería que un *splicing* (corte y empalme) de la YFP-TRPV1 condujera a la producción de YFP libre. En el genoma de ratón se han descrito hasta 5 reordenamientos diferentes para TRPV1 (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Splice?db=core;g=ENSMUSG00000005952;r=11:73234292-73261242) (Zerbino et al., 2018) que dan lugar a diferentes variantes del canal iónico (Donaldson and Beazley-Long, 2016; Schumacher and Eilers, 2010; Wang et al., 2004; Xue et al., 2001). La variante denominada TRPV1var descrita en rata se corresponde con la porción del N-terminal de TRPV1 y se postula que funciona regulando negativamente la expresión de TRPV1 (Schumacher and Eilers, 2010; Tian et al., 2006). Diversos trabajos también señalan que la expresión de estas variaciones de TRPV1 no se expresan en las mismas concentraciones que el TRPV1 de referencia. Así se ha detectado que, en DRGs el 5' V1sv se expresa 12 veces menos que TRPV1 (Sanchez et al., 2001) aunque esta diferencia se ha estimado en otros trabajos sólo 2 veces más baja (Schumacher et al., 2000).

Aunque estos *splicings* pudieran explicar la falta de detección de la proteína YFP-TRPV1 no esclarecen por qué los cruces entre hermanos de la F1' no han generado hasta la fecha un animal homocigoto para YFP-TRPV1. Aunque los genotipados confirman la presencia de la YFP, en todos los animales analizados siempre se detecta señal del alelo silvestre de TRPV1 (Figura 9). Se ha de tener en cuenta que las amplificaciones llevadas a cabo para la identificación de los animales se circunscriben a la YFP y parte del brazo de recombinación 3'. Por tanto, una reordenación en la región de la inserción de la YFP podría generar una mutación no detectable a lo largo de las generaciones genotipadas. Son diversos los ejemplos que muestran que los reordenamientos, la integración de ADN foráneo o la translocación de algunos cromosomas en la transgénesis tiene efectos letales en homocigosis (Gordon et al., 1989; Kile et al., 2003; Liu et al., 1998; Mahon et al., 1988; Matsukuma et al., 1999; Pravtcheva and Wise, 1995). Como ya se ha apuntado anteriormente, en el caso del cromosoma 11, la inversión cromosómica describió hasta 55 mutaciones letales en homocigosis, de las cuales 30 resultaban letales de forma prenatal y 23 posnatal (Kile et al., 2003). La realización de una hibridación *in situ* para la localización a nivel de cromosoma de la YFP podría ayudar a dilucidar si existe un reordenamiento (Matsui et al., 2002; Vicente-García et al., 2014). Si es la introducción de la YFP en el marco de lectura

de TRPV1 y la homocigosis de esta modificación la que durante el desarrollo embrionario o fetal resulta letal requiere de más investigación. La demostración de un efecto letal implicaría que TRPV1 podría tener un papel mucho más relevante a lo largo del desarrollo del que hasta el momento se ha considerado.

A este respecto, el uso de la herramienta de modificación genética CRISPR-Cas9 podría resultar realmente interesante (Brooks and Gaj, 2018; Gaj et al., 2013; Sander and Joung, 2014; Shalem et al., 2015; Wang et al., 2014; Williams et al., 2016; Zhang and McCarty, 2017; Zhou et al., 2014). La capacidad de esta técnica para generar mutaciones aleatorias, deleciones o inserciones no controladas permitiría la obtención de un amplio abanico de mutantes para el gen TRPV1. La secuenciación masiva para la identificación de las mutaciones y la posterior caracterización de los mutantes, tal vez permitiría dilucidar qué papel tiene la alteración de este gen en la posible letalidad a lo largo del desarrollo animal. Pero este estudio se aleja de los objetivos planteados y sólo se deja aquí reflejado como una posible proyección futura. En este trabajo el uso de CRISPR-Cas9 se planteó inicialmente para la generación del modelo YFP-TRPV1 ante las complicaciones surgidas en la localización de un clon recombinante.

La relativa simplicidad del proceso para con la selección de las dianas y construcción de vectores (Harms et al., 2014) derivó en el desarrollo de los plásmidos para la creación, junto con el modelo YFP-TRPV1, de un modelo CFP-TRPA1 y otro modelo TRPM8-mRuby2. La selección de las secuencias diana resultó un proceso rápido gracias al uso de herramientas web. Son cada vez más numerosas las herramientas de este tipo creadas para la selección de secuencias diana, que además están en continua actualización, en consonancia con las variantes de CRISPR desarrolladas (Ahmad and Amiji, 2018; Cui et al., 2018; Hsu et al., 2014; Labun et al., 2016; Montague et al., 2014; Zhu, 2015). Sin embargo, no todas ellas ofrecen la misma información (Ahmad and Amiji, 2018; Lee et al., 2018; Peng et al., 2016; Zhu, 2015), pero es posible realizar una comparativa de las mismas, recabar la información complementaria que arroja cada una de ellas y realizar una selección en consonancia con los objetivos, con prácticamente un coste nulo y en la mayoría de casos en tan sólo unos minutos. Éste fue el proceso seguido para la selección de las secuencias dianas, con una restricción extra a las del propio sistema, la de que el punto de corte de la endonucleasa no se alejara del punto de inserción seleccionado para la proteína fluorescente. Así, aunque se obtuvo un considerable número de potenciales secuencias diana, los criterios restrictivos dados limitaron a unas pocas las elegibles, cuya ordenación dio lugar a la selección final.

Entre los criterios de ordenación se recogió que la secuencia escogida presentara el menor número de *off-targets* posibles. La presencia de cortes en regiones no deseadas por parte de la Cas9 es uno de los principales inconvenientes del sistema CRISPR (Cong and Zhang, 2015; Hsu et al., 2014; Peng et al., 2016; Sander and Joung, 2014). Es por ello que muchas herramientas web para el diseño de los ARNsg tratan de incluir dicha información en sus resultados (Ahmad and Amiji, 2018; Cui et al., 2018). Incluso se han diseñado herramientas específicas para el análisis de dichos potenciales *off-targets* (Bae et al., 2014). En este trabajo no se analizaron los efectos de los *off-targets* en la comprobación de la eficacia de CRISPR en línea celular. Sólo se testó si alguno de los clones aislados para C2C12, con el sistema CRISPR TRPM8-mRuby, pudieran presentar fluorescencia. No se detectó ninguna señal de fluorescencia aunque, para TRPM8, la herramienta CRISPR Desing, estimó 137 potenciales *off-targets*, de los cuales 21 estarían en genes conocidos o descritos (Tabla 2). Por supuesto, esto no descarta que se produjeran modificaciones en dichos puntos y sería necesario un estudio genómico amplio para evaluar la incidencia de dichos *off-targets*. A este respecto, son diversos los estudios que trabajan en revertir o al menos minimizar la problemática de estas alteraciones indeseadas como por ejemplo, el

DISCUSIÓN

empleo de dos nicasas (Ran et al., 2013a; Shen et al., 2014) o el uso de truncados para los ARNsg (Fu et al., 2014). En ambos casos se deberían haber descartado los diseños y los vectores construidos por lo que, aunque se tienen en cuenta, son variaciones que no se desarrollaron durante este trabajo.

Además de la problemática de los *off-targets*, la selección de la secuencia diana *per se* es uno de los factores implicados en la efectividad para con el sistema CRISPR (Hsu et al., 2013; Kiani et al., 2015; Peng et al., 2016). Diversos trabajos demuestran que no todas las secuencias diana son igual de eficientes y algunas incluso inhiben a Cas9 (Doench et al., 2014; Wang et al., 2014; Xu et al., 2015). Así, el empleo del kit comercial para el testado de la eficiencia de corte de la Cas9 respecto a la secuencia diana elegida resulta una interesante prueba adicional. En este trabajo, los resultados obtenidos avalaron la selección de las secuencias diana de TRPV1 y TRPM8, en la que empleando una baja cantidad de ARNsg se consiguió un corte del molde de más del 85 % y 40 % respectivamente. Aunque con TRPA1, la eficiencia de corte fue de 0 % con una baja cantidad de ARNsg al aumentar ésta, la eficiencia resultó similar a la de TRPV1 y TRPM8. El trabajo de Kim et al. (2014) sobre CRISPR/Cas9 demuestra que una concentración 6 veces mayor de ARNsg sobre Cas9 maximiza la frecuencia de las mutaciones en el sitio deseado. Por tanto, el empleo de una cantidad elevada de ARNsg para TRPA1 no tendría por qué resultar problemática *a priori* teniendo en cuenta que la eficiencia de corte es cercana al 100 %.

En el caso de los modelos *knock-add-on* diseñados para los tres canales no fue la selección de la secuencia diana, sino la construcción de los vectores molde para la recombinación los que resultaron limitantes. Son varios los trabajos que señalan la construcción de estos moldes como una desventaja en el desarrollo de modificaciones *knock-in* al tratarse de una tarea laboriosa y específica para cada gen a modificar (Lackner et al., 2015; Nakade et al., 2014; Sawatsubashi et al., 2018). En este trabajo, el reciclaje del vector pKO-YFPTRPV1 supuso una clara desventaja frente a la posible construcción *de novo*. La introducción de puntos de restricción, las digestiones para el recorte de los brazos de recombinación y la eliminación del casete de resistencia a la Neomicina generaron diversos problemas que retrasaron mucho la obtención del vector molde YFP-TRPV1. En el caso del vector para la CFP-TRPA1 no se logró siquiera introducir el primer brazo de recombinación a pesar de los distintos intentos de optimización del clonaje. En este caso, los problemas se atribuyeron finalmente a la vejez del plásmido presente en el laboratorio y la imposibilidad de renovación del mismo por su descatalogación acabaron por descartar el diseño propuesto.

A pesar de estos inconvenientes, en la generación de modelos *knock-in*, ya sea por métodos clásicos o por el sistema CRISPR, el principal y mayor inconveniente es la baja activación del sistema de reparación por recombinación homóloga que permiten la introducción dirigida de una secuencia (Bollag et al., 1989; Maruyama et al., 2015; Peng et al., 2016; Wang et al., 2015; Yang et al., 2013). Esto lleva a tasas de inserción de entre el 0.1 al 5 % en los mejores casos. Son muchas y diversas las estrategias seguidas para aumentar dicha eficiencia como, por ejemplo: el empleo de brazos de recombinación cortos y desiguales, la activación de sistemas de reparación alternativos, la linealización de los vectores, la supresión de la vía de reparación NHEJ, etcétera. Sin embargo, estas eficiencias no han superado el 20 % en modelos animales (Aida et al., 2015; Gagnon et al., 2014; Harms et al., 2014; He et al., 2016; Li et al., 2014; Merkle et al., 2015; Nakade et al., 2014; Platt et al., 2014; Sawatsubashi et al., 2018; Shao et al., 2014; Wang et al., 2015; Yao et al., 2017). La eficiencia del sistema diseñado y creado para TRPM8-mRuby en la línea celular C2C12 se demostró relativamente elevada, con una tasa de inserción de cerca del 40 %, en línea con las tasas encontradas en líneas celulares, pero no en cigotos (Wang et al., 2015; Xue et al., 2014; Yao et al., 2017). Así, la traslación del sistema construido para la obtención de un modelo animal, no tendría por qué resultar eficiente a pesar de los resultados obtenidos en la

línea C2C12. Cabe apuntar que esta línea celular no expresa el canal TRPM8, por lo que tampoco se pudo confirmar si la expresión del canal iónico marcado con la proteína mRuby resultaba viable.

Vistos los problemas acontecidos con el modelo animal YFP-TRPV1, y la baja eficiencia del sistema CRISPR para la generación de animales *knock-in* señalada en la bibliografía, el empleo de este sistema en modelos celulares en lugar de modelos animales podría resultar en una herramienta con mayor probabilidad de éxito. La aplicación de CRISPR-Cas abre toda una vía rápida para el estudio de la nocicepción permitiendo la alteración de las vías de señalización del dolor; el tratamiento de patologías congénitas que cursan con dolor o sencillamente la creación de nuevos modelos animales y celulares (Sun et al., 2016).

Actualmente una de las principales vías para la investigación de nuevas dianas para terapia farmacológica o los mecanismos implicados en la señalización y transducción del dolor se basa en cultivos primarios a partir de DRGs (Brewer and Torricelli, 2007; Melli and Hoke, 2009; Owen and Egerton, 2012). Una de las principales ventajas de este tipo de cultivos es la presentación de características muy similares a las células *in vivo*, sin embargo, la dependencia de animales, la limitación del cultivo en el tiempo y la heterogeneidad de los mismos suponen limitaciones importantes en las investigaciones del dolor (Geuna et al., 2016; Wang and Wang, 2003).

Los intentos de solventar estos inconvenientes con el desarrollo de líneas celulares semejantes a los cultivos primarios de neuronas sensoriales han sido variados. La línea celular SH-SY5Y, por ejemplo, se corresponde con una línea celular derivada de células tumorales (Biedler et al., 1973; Biedler et al., 1978) cuya capacidad de diferenciación a tipo neuronal ha permitido el estudio de TRPV1, TRPM8 o TRPA1 en modelos celulares neuronales (Lam et al., 2007; Morgan et al., 2014). Las líneas F11 o ND se corresponden con líneas celulares procedentes de hibridomas, es decir, la fusión de células procedentes de neuroblastomas con DRGs (Platika et al., 1985a; Platika et al., 1985b; Wood et al., 1990). En ambos casos, las similitudes con las neuronas sensoriales periféricas son limitadas y aunque se han empleado para el estudio de los mecanismos de activación sensoriales, distan de ajustarse a neuronas de tipo nociceptor (Yin et al., 2016).

La línea celular MED17.11 (Doran et al., 2015), por el contrario, resulta una línea celular procedente de la selección de clones de DRGs embrionarios originarios de la cepa de ratón *Immortomouse* (Jat et al., 1991). Esta línea celular ha sido descrita como una línea capaz de diferenciarse a nociceptores maduros en menos de una semana, cuyas características la definieron como un potencial modelo de estudio de la nocicepción, del desarrollo de neuritas y del desarrollo de DRGs (Doran et al., 2015). La capacidad descrita para expresar TRPV1, sus características de nociceptores y su origen, el ratón, la convirtieron en una interesante línea celular de partida para el desarrollo de un modelo *in vitro* equiparable al modelo animal YFP-TRPV1 con los vectores CRISPR/Cas9 YFP-TRPV1 diseñados. Además de una interesante herramienta para el cribado de compuestos de carácter analgésico de alto rendimiento, podría ayudar al estudio de la posible vinculación de TRPV1 con el desarrollo neuronal.

El paso previo a la creación del modelo celular YFP-TRPV1 fue corroborar la diferenciación a nociceptores de la línea MED17.11. La replicación del protocolo de diferenciación de Doran et al. (2015) mostró que la aplicación del cóctel de factores de diferenciación empleados promovían cambios morfológicos significativos en las células. Las morfologías celulares resultantes en las MED17.11 diferenciadas fueron muy similares a los cultivos primarios de DRGs (Figura 16). Estos cambios se caracterizaron, por una parte, por una reducción significativa del tamaño celular. Así, en los días más avanzados de la diferenciación los tamaños celulares medios fueron similares a los detectados en DRGs

DISCUSIÓN

adultos medidos en este trabajo y en otros (Doran et al., 2015; Light et al., 2008; Molliver et al., 1997), aunque la variabilidad de dichos tamaños en las MED17.11 resultó mayor que la detectada en DRGs.

Por otro lado, también se apreció un progresivo crecimiento de axones y dendritas, que en fases avanzadas de diferenciación llegaban a formar intrincadas redes axonales. Este desarrollo, observado también en el trabajo de Doran et al. (2015), resulta acorde con la bibliografía que relaciona la aplicación de los distintos factores de diferenciación aquí empleados con el crecimiento de neuritas (Calabrese, 2008). Por ejemplo, el NGF es uno de los factores más estudiados y empleados en la inducción del desarrollo de neuritas (Bradshaw et al., 2017; Caillaud et al., 1995; Calabrese, 2008; Harrill and Mundy, 2011; Matsuoka et al., 1993; Pollock et al., 1990; Selvaraj et al., 2015). Su aplicación sobre la línea celular PC12, línea derivada de feocromocitomas de médula adrenal, promueve la formación de neuritas al diferenciarse éstas en células neuronales de tipo simpático (Greene and Tischler, 1976). De hecho, la aplicación del NGF sobre las PC12 está establecido como un modelo celular validado para el estudio de la neurogénesis y la neurotoxicidad (Harrill and Mundy, 2011). Este modelo celular ha permitido la investigación, junto con el NGF, del papel de otros muchos factores en el desarrollo de neuritas, entre ellos el bFGF, el cAMP o la Forskolina (Caillaud et al., 1995; Chijiwa et al., 1990; Fujita et al., 1989; Gysbers and Rathbone, 1996; Hansen et al., 2003; Ho and Raw, 1992; Mann et al., 1989; Nakagawa-Yagi et al., 1992; Pollock et al., 1990). El otro factor neurotrófico empleado, el GDNF y el inhibidor Y-27632 son factores que también se ha demostrado inducen la neurogénesis (Costantini and Isacson, 2000; Darenfed et al., 2007; Jeon et al., 2013; Jia et al., 2016; Novozhilova et al., 2015; Racchetti et al., 2010; Schafer and Mestres, 1999; Takaku et al., 2013; Yin et al., 2015; Zhang et al., 2006). En algún trabajo incluso se observa la potenciación de la coaplicación de estos factores, como es el caso del NGF y el inhibidor Y-27632 (Minase et al., 2010). Es por ello que estos factores tienen un uso extendido en diversos protocolos tanto de desarrollo axonal como de diferenciación celular a tipo neuronal (Aguilera-Castrejon et al., 2017; Boisvert et al., 2015; Eberhardt et al., 2015; Wainger et al., 2015).

La aplicación de estos factores sobre las células, además de morfológicos, también generan cambios tanto a corto como a largo plazo en la expresión de diversos receptores y canales iónicos (Bouron et al., 1999; Pollock et al., 1990). En el caso de las MED17.11, la diferenciación hacia nociceptores inducida por estos factores, sin embargo, no reflejó los cambios esperados. En Doran et al. (2015) a partir del día 7 de diferenciación las células mostraban la expresión de receptores presentes en nociceptores maduros. Por el contrario, a lo largo de nuestro trabajo, estos mismos análisis no mostraron que se obtuvieran nociceptores en ningún momento del proceso. Mientras que en las ICC ninguno de los marcadores evaluados aumentó significativamente con la diferenciación, en los análisis con RT-qPCR la expresión en las células diferenciadas fue de 2 y tres órdenes de magnitud inferiores a la expresión detectada en DRGs de ratón adulto. De hecho, las expresiones obtenidas en las células diferenciadas fueron menores que las detectadas en las MED17.11 no diferenciadas. De forma similar, los análisis de funcionalidad con imagen de calcio, mostraron que las células diferenciadas tenían una respuesta significativamente menor a todos los estímulos en comparación con los análisis en DRGs. Sólo en el caso de la respuesta al ATP, aunque variable, resultaba similar entre las MED17.11 diferenciadas y los DRGs. El receptor del ATP presente en nociceptores, el P2rx3 (Chen et al., 1995), se detectó sólo puntualmente a muy bajas concentraciones, por lo que la respuesta a este estímulo podría deberse a otras causas dado que el ATP no despolariza exclusivamente nociceptores (Burnstock, 2000; Cook et al., 1997; Ding et al., 2000; Dunn et al., 2001). En DRGs, de hecho, la respuesta exclusiva al ATP generalmente se correspondió con la repuesta por parte de células gliales presentes en el cultivo primario. Se hipotetizó así que las MED17.11 derivaran a células gliales en lugar de nociceptores, pero los marcadores de glía GAFFP, en las ICC, y Sox10 en las RT-qPCR no variaron con la diferenciación. Por

lo que esta posibilidad se desechó, aunque no se pudo descartar. Se tuvo en cuenta también que, al igual que en las RT-qPCR, funcionalmente la respuesta a KCl resultó significativamente menor en las células diferenciadas respecto a las MED17.11 no diferenciadas. Estos resultados distaban mucho de los resultados presentados por Doran et al. (2015), donde las células una vez diferenciadas mostraban respuestas a capsaicina, veratridina, ATP o KCl.

Las altas variabilidades detectadas en los distintos análisis realizados nos condujeron a evaluar si la edad de los pases pudiera afectar al proceso de diferenciación. Los pases jóvenes resultaron por lo general más similares a los valores esperados respecto a DRGs. Sin embargo, los resultados de expresión y funcionalidad seguían sin señalar que se obtuvieran nociceptores con la diferenciación, por lo que el envejecimiento de los cultivos no resultó ser el único factor condicionante de la diferenciación.

Que el protocolo aplicado tuviera efectos contrarios en la expresión de receptores y canales iónicos, así como en la funcionalidad de las MED17.11, llevó a centrar la atención en la línea celular no diferenciada. Teóricamente, las MED17.11 se corresponden con un clon celular aislado a partir de DRGs embrionarios de día E12.5 del ratón *Inmortalmouse* (Doran et al., 2015; Jat et al., 1991). En nuestros resultados las ICC mostraron que menos del 25 % de las células no diferenciadas resultaban positivas para el marcador neuronal Tuj1. Este porcentaje fue menor al observado por Hjerling-Leffler et al. (2007) en DRGs del mismo estadio embrionario con un marcaje en torno al 30 %. Sin embargo, la baja respuesta a capsaicina, resultante de la baja detección de TRPV1 tanto por RT-qPCR como por inmunocitoquímica en las MED17.11 no diferenciadas sí que resultó similar a las detecciones de este canal iónico en DRGs E12.5 (Hjerling-Leffler et al., 2007). La expresión de TRPV1 y la respuesta a capsaicina se incrementan significativamente en tan solo 2 días de desarrollo (E14.5) (Hjerling-Leffler et al., 2007), pero dicho incremento no fue detectado en nuestros resultados con las MED17.11 diferenciadas.

Los demás marcadores neuronales analizados vía RT-qPCR mostraron tampoco las expresiones esperadas en DRGs embrionarios E12.5. Las investigaciones sobre el desarrollo y diferenciación de cada uno de los tipos de neuronas sensoriales que conforman un DRG muestran que este periodo embrionario resulta muy relevante en el desarrollo y la maduración de este tipo celular (Lallemend and Ernfors, 2012; Marmigere and Carroll, 2014; Marmigere and Ernfors, 2007). En la secuencia de expresión diferencial de los distintos miembros de la familia Trk (*Tropomyosin receptor kinase*) la expresión de TrkA resulta clave para la diferenciación de nociceptores (Liu and Ma, 2011; Marmigere and Carroll, 2014; Marmigere and Ernfors, 2007). En este trabajo, la expresión de TrkA se detectó por debajo del 15 % en MED17.11 no diferenciadas y dos órdenes de magnitud por debajo de la expresión detectada en DRGs adultos, cuando en estadio E12.5 en ratón la expresión de TrkA se ha mostrado robusta (Marmigere et al., 2006; Sun et al., 2008; Zou et al., 2012). La expresión de este receptor viene a su vez regulada por el factor de transcripción Brn3a (Zou et al., 2012) con un descenso del factor Sox10, que mantiene la multipotencialidad de las células y dirige la diferenciación de las mismas a tipos gliales (Lallemend and Ernfors, 2012; Marmigere and Ernfors, 2007). En este trabajo Brn3a no es detectado en MED17.11 no diferenciadas y con una expresión 4 órdenes de magnitud por debajo de los DRGs de ratón adultos en las diferenciadas. A pesar de la repercusión de estos dos factores en el desarrollo, ni Brn3a ni TrkA son detectados en MED17.11 no diferenciadas (Doran et al., 2015). Así los resultados obtenidos en MED17.11 no diferenciadas van en consonancia a lo descrito para las MED17.11 pero apunta que esta línea celular podría adolecer de un correcto proceso de diferenciación hacia neuronas sensoriales.

El único factor de transcripción que fue detectado vía RT-qPCR con niveles de expresión similares a los de los DRGs adultos resultó ser el factor Runx1. Éste es uno de los factores de transcripción de genes relacionados con Runt (Runx) y ejerce funciones esenciales en células de tipo neuronal y no neuronal

DISCUSIÓN

(Blyth et al., 2005; Inoue et al., 2008; Levanon and Groner, 2004; Stifani and Ma, 2009; Wang and Stifani, 2017). Runx1 es necesario para la expresión de muchos de los canales y receptores claves en la transducción sensorial presentes en los nociceptores (Chen et al., 2006). Su expresión está regulada también por el factor Brn3a y, aunque este último factor no era detectado en las MED17.11 a los mismos niveles de RunX1, hay que tener en cuenta que sólo la inhibición completa de Brn3a junto con Islet1 da lugar a la extinción de la expresión de Runx1 en DRGs (Dykes et al., 2011). En el desarrollo de neuronas sensoriales, su expresión en células TrkA positivas es clave para la divergencia de nociceptores no peptidérgicos y nociceptores peptidérgicos al promover la expresión de c-Ret y reprimir la expresión del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Chen et al., 2006; Kramer et al., 2006) y la expresión del propio TrkA (Kobayashi et al., 2012). La presencia de este marcador en células no diferenciadas podría explicar la baja detección de TrkA y de CGRP, en pro de aumentar la expresión de c-Ret (Marmigere and Ernfors, 2007). Sin embargo, este último factor de transcripción, c-Ret, implicado en el desarrollo de nociceptores no peptidérgicos, se detectó 3 órdenes de magnitud por debajo de DRGs adultos (Figura 20). Tampoco se observó la expresión de canales y receptores típicos de nociceptores no peptidérgicos, ni siquiera respuesta funcional a la aplicación de KCl por lo que esta deriva se descartó.

El conjunto de estas observaciones incentivaron la aplicación de tratamientos alternativos al protocolo de diferenciación aplicado por Doran et al. (2015) y replicado en este trabajo. En diversos trabajos de obtención de neuronas sensoriales la aplicación del factor BMP4 promueve la expresión de marcadores neuronales tanto desde líneas celulares (Tremblay et al., 2010) como desde células madre o células pluripotenciales (Boisvert et al., 2015; Nayagam and Minter, 2012; Shi et al., 2007; Webb et al., 2017). Los resultados obtenidos con la aplicación de este factor en el medio de mantenimiento indicaron que no se alteró la morfología ni la viabilidad de las MED17.11. El recuento de células y las áreas analizadas no mostraron diferencias de las células no diferenciadas tratadas respecto a las no tratadas. Según el trabajo de Wu et al. (2012), el tratamiento con BMP4 induce a la astrogliogénesis en cultivos de oligodendrocitos. Esto planteaba una posible derivación de las MED17.11 hacia células gliales con la aplicación de este factor, sin embargo, el porcentaje de células positivas para GFP no se vio alterado en las MED17.11 tratadas. La expresión del marcador de glía Sox10 tampoco se vio alterado significativamente y el porcentaje de respuesta a ATP de las células disminuyó respecto a las MED17.11 no tratadas. Todo ello descartó la derivación de las MED17.11 hacia células gliales por la aplicación del BMP4. El BMP4 tampoco elevó el porcentaje de células positivas al marcador neuronal Tuj1 ni los marcadores TrkA o TRPV1 analizados en las ICC. En el trabajo de Yoshikawa et al. (2016) se refleja que el tratamiento de BMP4 reduce la formación de neuritas y aumenta la expresión de CGRP en las células Runx1 positivas. Por el contrario, en las qPCR sobre las MED17.11 lo que se observa es la reducción de la expresión de Runx1 y no se detecta expresión en ningún caso de CGRP. BMP4 resulta un factor regulador en el desarrollo de neuronas sensoriales, pero el estadio de desarrollo y la concentración de aplicación resultan condicionantes en la diferenciación hacia un tipo celular u otro (Mizuseki et al., 2003). Así, aunque no se produce una derivación a células gliales tampoco se produce una derivación a precursores de neuronas sensoriales, por lo que este tratamiento hubo de descartarse sin una caracterización más pormenorizada de las MED17.11 no diferenciadas, cuyo estadio de desarrollo, E12.5 según su origen, ya se había puesto en cuestión.

Una de las mayores problemáticas encontradas con las MED17.11 fue el aumento en la heterogeneidad morfológica que se detectó en la línea celular diferenciada. Estas diferencias morfológicas podrían ser la causa de una escasa o nula detección de los nociceptores si la tasa de diferenciación de éstos fuera baja. De forma adicional a esta heterogeneidad, se observó un mantenimiento de la proliferación en las MED17.11 con la detección de células en mitosis a día 7 de diferenciación y con el aumento

significativo del número de núcleos medidos en las ICC (Figura 17 y Figura 19). Todas estas observaciones apuntaron que no todas las células entraban en la fase de diferenciación en el mismo momento y una parte del cultivo mantenía la división celular. Aunque se planteó una sincronización de la fase celular por métodos químicos, el propio protocolo de diferenciación contempla dicha sincronización con la retirada del IFN- γ y el cambio de la incubación a temperaturas más elevadas. Esta sincronización resulta auspiciada por el origen de las MED17.11, la cepa de ratón *Immortomouse* (Doran et al., 2015; Jat et al., 1991). Esta cepa de ratón fue modificada genéticamente para la inducción condicionada de la proliferación celular (Jat et al., 1991). Así, en líneas celulares desarrolladas a partir de esta cepa de ratón, la proliferación es activada con la aplicación de IFN- γ y el mantenimiento del cultivo a 33°C. La detención del crecimiento celular y la inducción de la diferenciación se produce con la retirada de este compuesto y la elevación de la temperatura a 37°C o 39°C (Anitha et al., 2008; Dixon et al., 2011; Hawkins et al., 2013; Holley et al., 1997; Miller et al., 2003; Takacs-Jarrett et al., 1998). En el trabajo de Doran et al. (2015) no se hace referencia a un mantenimiento de la proliferación en condiciones de diferenciación, algo que, sin embargo, sí se observa en este trabajo. Si bien es cierto que el FGF es un factor que induce la generación de neuritas (Pollock et al., 1990), también está demostrado que este mismo factor induce la proliferación celular (Murphy et al., 1994). Por ello, cabría la posibilidad de que el cóctel de factores de diferenciación aplicados mantuvieran la proliferación en determinados perfiles celulares. Esto señalaría la existencia de un perfil heterogéneo en las células de partida, las MED17.11 no diferenciadas.

Si los resultados obtenidos se debían a una baja tasa de diferenciación de las MED17.11 a nociceptores se trató de comprobar con la inhibición de la proliferación celular en fases de diferenciación. En aras de conseguir un cultivo más homogéneo de nociceptores, se aplicaron los citostáticos AraC y dFUR, ampliamente usados en los cultivos neuronales para la inhibición de la proliferación celular (Camprubi-Robles et al., 2009; Hui et al., 2016; Irobi et al., 2010; Schwieger et al., 2016; Thirumangalakudi et al., 2009). Los resultados mostraron que, aunque inicialmente se redujo la variabilidad de tamaños respecto a los cultivos no tratados, a lo largo de los días, esta variabilidad resultó igual e incluso mayor que las células diferenciadas y no tratadas, como con las células a D9 tratadas con dFUR. A pesar de estas diferencias las MED17.11 no presentaron un porcentaje de respuesta significativamente superior a las células no tratadas. El tratamiento fue suspendido ante la evidencia de que la carencia de nociceptores no se supeditaba, al menos exclusivamente, a la heterogeneidad del cultivo y una baja tasa de diferenciación de nociceptores.

Se exploraron también otros tratamientos, como por ejemplo la aplicación del factor de crecimiento nervioso, NGF, en MED17.11 no diferenciadas. Ampliamente estudiado (Bradshaw et al., 2017; Levi-Montalcini, 1987; Scully and Otten, 1995) es uno de los factores más aplicados en fases tardías de diferenciación de células madre o pluripotenciales hacia estadios neuronales (Blanchard et al., 2015; Boisvert et al., 2015; Chen et al., 2007; Raymon et al., 1999; Webb et al., 2017). Su estrecha relación con la nocicepción está bastante bien caracterizada (Indo, 2012), así como su papel en el desarrollo de las neuronas sensoriales (Lallemend and Ernfors, 2012; Marmigere and Carroll, 2014; Pavan and Raible, 2012). Se ha descrito que la ausencia de NGF durante el desarrollo embrionario da lugar a la desaparición de MrgA1, MrgA3, MrgD y TRPC3 y una drástica bajada de cRet, TRPM8, TRPV1 y Runx1 en estadios postnatales, mientras que P2rx3 en estadio posnatal y Runx1 en fase embrionaria no se ven afectados (Luo et al., 2007). Estos resultados, tan similares a los observados en las MED17.11 plantearon si la carencia de este factor podría ser la causa de la falta de diferenciación hacia nociceptores de las células. Cómo ya se ha mencionado, el NGF induce la formación de neuritas, pero su aplicación no afectó a la morfología de las células no diferenciadas salvo por el aumento de su tamaño medio. Sin embargo, a nivel funcional no se apreció ningún cambio significativo en el

DISCUSIÓN

porcentaje de células que respondieron capsaicina o ATP mientras que se produjo un descenso de la respuesta a KCl. Una caracterización a través de inmunocitoquímicas o RT-qPCR de los efectos en la expresión de marcadores neuronales o el estudio de células diferenciadas tras haber sido tratadas o no con NGF aportaría información esencial para la continuidad o la suspensión de dicho tratamiento. Aunque dicho tratamiento no parece favorecer la obtención de nociceptores, ni siquiera de células de tipo neuronal dada la casi nula respuesta a KCl.

El último tratamiento explorado fue adaptado desde los protocolos de reprogramación química descritos por Chambers et al. (2009) y Chambers et al. (2012). La morfología final obtenida de la aplicación de esta adaptación, sin embargo, no se correspondió con la de los nociceptores esperados. A pesar de la retirada del Interferón y el cambio de temperatura, la proliferación celular se mantuvo y la confluencia de las células llegó rápidamente al 100%. Tras la inducción de la neuralización a partir de los compuestos LDN-193189 y SB431542 (Chambers et al., 2009) la morfología gregaria no se vio alterada por la aplicación de la combinación de SU5402, CHIR99021 y DAPT, que conjuntamente deberían dar lugar a la formación y desarrollo axonal de las células (Chambers et al., 2012). El crecimiento de neuritas sólo se observó parcialmente con la aplicación de los 4 factores tróficos NGF, GDNF, BDNF y Forskolina. Sin embargo, dicho protocolo requeriría de una caracterización más exhaustiva que el simple análisis *de visu* del cultivo. Probablemente uno de los principales problemas fue el de la aceleración en la aplicación de los distintos factores, requiriendo en los protocolos originales de unos 15 días para el cambio significativo en la expresión de marcadores neuronales y de unos 25 días para una respuesta funcional aproximada a la de los nociceptores (Chambers et al., 2012).

En su conjunto, los resultados obtenidos con la línea celular MED17.11 apoyan que ésta podría ser utilizada para el estudio de la inducción de neuritas y desarrollo axonal, sin embargo, la capacidad funcional descrita en este trabajo como neuronas o como nociceptores dista mucho de la información publicada por sus desarrolladores (Doran et al., 2015). La caracterización más pormenorizada de la línea MED17.11 no diferenciada podría responder a los efectos de la inmortalización por virus. Finalmente, su uso para la obtención de un modelo celular para el estudio de la nocicepción en general y de TRPV1 en particular quedó descartado. A pesar de todo, las necesidades en este campo siguen impulsando el desarrollo de nuevas líneas y nuevos protocolos de diferenciación y transdiferenciación hacia nociceptores (Blanchard et al., 2015; Boisvert et al., 2015; Chambers et al., 2009; Chambers et al., 2012; Chen et al., 2007; Wainger et al., 2015) que en un futuro pudieran dar lugar al modelo celular planteado para este trabajo.



UNIVERSITAS

Miguel

Alemán

CONCLUSIONES

1. En la generación de un modelo animal, la introducción de la proteína fluorescente amarilla (YFP) en el marco de lectura del gen TRPV1 por recombinación homóloga ha dado lugar a animales heterocigotos, pero no homocigotos para YFP-TRPV1.
2. En los animales heterocigotos generados no es detectada la proteína de fusión YFP-TRPV1 pudiendo deberse a una baja concentración de ésta; una modificación post-transduccional y/o post-transcripcional que altere la proteína YFP-TRPV1; o una traslocación o reordenación que haya derivado en la pérdida de la YFP del locus de TRPV1.
3. La imposibilidad de generar el modelo animal homocigoto YFP-TRPV1 pudiera deberse a una traslocación o reordenación durante el proceso de recombinación homóloga o a lo largo de los sucesivos retrocruzamientos derivando en la pérdida de la YFP del locus de TRPV1. Por otro lado, la modificación del cromosoma 11 y del locus de TRPV1 pudiera tener un efecto letal en homocigosis.
4. La regulación en la expresión de TRPV1, las modificaciones post-traduccionales y post-transcripcionales, así como la funcionalidad de TRPV1 en el desarrollo podrían ser condiciones limitantes, en conjunto o por separado, en la generación del modelo *knock-add-on*.
5. Los vectores *all-in-one* desarrollados para la aplicación del sistema de modificación genética CRISPR/Cas9 permiten la obtención de líneas mutantes para TRPV1, TRPA1 y TRPM8.
6. La combinación del vector *all-in-one* con el vector de recombinación correspondiente permite la inserción de una proteína fluorescente en marco de lectura, haciendo viable el desarrollo de los modelos celulares *knock-add-on* para TRPV1 y TRPM8.
7. En la generación del modelo celular, la línea celular MED17.11 no resulta válida como modelo *in vitro* de nociceptores ni como modelo de desarrollo de neuronas sensoriales.
8. Los resultados obtenidos con la línea celular MED 17.11 apoyan que esta línea celular podría ser utilizada para el estudio de la inducción de neuritas y el desarrollo axonal.



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y líneas celulares

A lo largo de este trabajo se han empleado distintas cepas de ratón (*Mus musculus*), tanto para el desarrollo del modelo animal como para la obtención de controles del modelo celular, trabajando así con las cepas:

C57bl/6J.Hsd.Ola (B6). Cepa procedente de los servicios del animalario de Elche. Esta cepa se utilizó para la obtención de la línea F1 heterocigota en el cruce con los animales quimera en el desarrollo del modelo animal. Denominada a lo largo de todo el trabajo como silvestre o *wild type* (wt), los animales de esta cepa también se emplearon para la obtención de cultivos primarios y extracción de muestras control de los análisis del modelo animal y modelo celular.

Ratón B6.Cg-Tg(Pgk1-flpo)10Sykr/J (FLPo-10). Cepa procedente del repositorio de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EEUU). Se usó para la eliminación del casete de resistencia a la Neomicina a través del cruce de éste con la generación F1 heterocigota obtenida en el desarrollo del modelo animal.

Todos los procedimientos experimentales seguidos con animales fueron aprobados por la Comisión de Ética en la Investigación Experimental de la Universidad Miguel Hernández de Elche de acuerdo con las guías de la Comunidad Económica Europea, el Instituto Nacional de Salud y las recomendaciones éticas de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (21-23°C) y humedad, en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con alimento y agua *ad libitum*.

Para la realización de controles, así como para el inicio del modelo animal y el desarrollo del modelo celular, a lo largo de este trabajo se han empleado las siguientes líneas celulares:

Células madre 129SvEv. Células obtenidas de la cepa de ratón 129SvEv, empleadas por la Unidad de Animales Transgénicos (UAT) del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) para la generación de clones modificados genéticamente para la creación del modelo animal *knock-add-on* YFP-TRPV1.

HEK293. Línea celular originaria de células renales humanas (Graham et al. 1977). Usada puntualmente para la obtención de stock de proteína (TRPV1, YFPTRPV1 e YFP), utilizada como control positivo en inmunoblots. El mantenimiento de estas células se llevó a cabo con medio DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (FBS, Invitrogen) y 1 % de penicilina/estreptomicina (P/S, Invitrogen) en incubador a 5 % de CO₂ y 37°C.

C2C12. Línea celular estable de mioblastos de ratón. Empleada para la comprobación de la eficacia del sistema CRISPR/Cas9 diseñado para la inserción de mRuby en el C-terminal de TRPM8. El mantenimiento de las células se realizó con medio basal compuesto por DMEM bajo en glucosa (Sigma) con 15 mM de NaHCO₃ (Sigma) y 20 mM D-Glucosa (Prolabo) suplementado con 10 % de FBS y 1 % de P/S en incubador a 5% de CO₂ y 37°C.

MED17.11. Línea celular donada al laboratorio por el grupo de M. Nassar (Universidad de Sheffield) se empleó a lo largo de este trabajo para el establecimiento de un modelo celular de nociceptores.

La línea MED17.11 era mantenida a 33°C con CO₂ al 5 % con medio de mantenimiento compuesto por DMEM/F12 + Glutamax (Gibco) suplementado con 10 % de FBS, 1 % de P/S, 0.5 % de extracto de embrión de pollo (CEE) e Interferón Gamma (IFG-γ) a una concentración final de 5 ng/ml. La siembra

MATERIALES Y MÉTODOS

para la realización de los diversos experimentos siempre se llevó a cabo a partir de esta fase del cultivo a una concentración de 5000 células por cm^2 . Las placas y cristales empleados para los distintos experimentos fueron tratados con poli-L-ornitina (Sigma) a 20 ng/ml durante al menos 2 horas a 37°C, y lavadas 2 veces con tampón fosfato salino (PBS 1X, Sigma) en todos los casos antes de la siembra de las células.

Para el proceso de diferenciación se siguió el procedimiento básico señalado por el grupo de M. Nassar (Doran et al., 2015). 24 horas después de la siembra, las células permanecían otras 24 horas sin IFN- γ ni CEE, sólo con medio basal (DMEM/F12 + Glutamax, 10 % de FBS y 1 % de P/S) a 37°C con 5 % de CO_2 . Transcurrido ese tiempo de adaptación a la diferenciación, el medio basal era reemplazado por medio de diferenciación compuesto por medio basal más el cóctel de factores de diferenciación: factor de crecimiento nervioso (NGF, Peprotech) a 100 ng/ml; factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, Peprotech) a 10 ng/ml; factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2, Peprotech) a 10 ng/ml; adenosín monofosfato-3',5' cíclico (cAMP, Sigma) a 0.5 mM; Forskolina (Sigma) a 25 μM y el compuesto Y-27632 (*Inhibitor ROCK*, Tocris) a 5 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones señaladas se corresponden con las concentraciones finales de cada factor. Cada 48-72 horas el medio de diferenciación era renovado al 50 -70 %.

A lo largo del trabajo se introdujeron modificaciones al esquema básico de diferenciación.

Por una parte, se incluyó la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4, Peprotech) a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, como factor extra al medio de mantenimiento y al medio basal.

La inhibición del crecimiento y división celular en los cultivos de MED17.11 diferenciados se testó con los compuestos citostáticos arabinósido de citosina (AraC, Sigma) y 5'-desoxi-5-fluorouridina (dFUR, Sigma) a una concentración de 0.625 $\mu\text{g/ml}$ y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente adicionándolos al día 3 de la diferenciación.

Además, se testó si la adición de NGF a una concentración de 10 ng/ml en el medio de mantenimiento y medio basal aumentaba la diferenciación a nociceptores.

Por último, se diseñó un nuevo protocolo de diferenciación basado en algunos protocolos de diferenciación de células pluripotenciales inducibles (*ips cells*). A las 24 horas de la siembra de las células, éstas eran expuestas durante otras 24 horas a Y-27632 (*Inhibitor ROCK*) a 5 $\mu\text{g/ml}$ sin presencia de IFN- γ ni CEE en el medio basal (DMEM/F12 + Glutamax, 10 % de FBS y 1 % de P/S), incubadas a 37°C y 5 % de CO_2 . Posteriormente, durante 48 horas eran mantenidas a 37°C y 5 % de CO_2 con medio basal y los compuestos LDN193189 y SB431542 a una concentración de 0.1 μM y 10 μM respectivamente. Durante las 72 horas siguientes, el medio de cultivo era reemplazado por medio basal con los compuestos CHIR99021 a una concentración de 3 μM , SU5402 a 10 μM y DAPT a 10 μM . Transcurridos 5 días, se añadieron los factores Forskolina a 25 μM , NGF, GDNF y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, Peprotech) a 20 ng/ml los tres últimos. Cada 48-72 horas este nuevo medio de diferenciación era renovado al 50 -70 %.

Plásmidos

A lo largo de este trabajo, para la obtención de proteína como control positivo en los inmunoblots se han empleado los plásmidos:

pcDNA3-TRPV1. Plásmido de expresión en líneas celulares de mamífero de TRPV1 silvestre donado amablemente por el Dr. David Julius (Physiology Department, University of California, San Francisco, USA) al laboratorio.

pCI-neo-YFPTRPV1. Plásmido de expresión en líneas celulares de mamífero de la proteína de fusión YFP-TRPV1 creada en el laboratorio a partir de la introducción del ADNc de TRPV1 silvestre en el plásmido pEYFP-C1 (Clontech) a través de los sitios de restricción HindIII (5') y Sal I (3').

pEYFP-C1 (Clontech). Plásmido para la expresión en líneas celulares de mamífero de la proteína fluorescente amarilla (YFP).

Para la utilización del sistema de modificación genética CRISPR-Cas9 se emplearon los vectores:

pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459). Vector “*all-in-one*” donado amablemente por Feng Zhang (Plásmido de Addgene #62988, (Ran et al., 2013b)). Con doble promotor, este plásmido expresa tanto la proteína Cas9 como la secuencia guía (ARNsg) siendo necesaria la introducción de las respectivas secuencias dianas de cada locus a modificar.

pcDNA3-mRuby2-M8. Plásmido de expresión de la proteína fluorescente mRuby2 donado amablemente por Michael Lin (Plásmido de Addgene #40260, (Lam et al., 2012). Modificado en el laboratorio para la introducción de los brazos de recombinación correspondientes al locus de TRPM8, tal y como se describe más adelante.

pECFP-C1 (Clontech). Plásmido para la expresión en líneas celulares de mamífero de la proteína fluorescente azul (CFP).

pKO-YFPTRPV1. Plásmido construido en el laboratorio para llevar a cabo la modificación de las células ES129Sv en la construcción del modelo animal. Descripción en los siguientes apartados.

Creación del modelo animal

La creación del modelo animal siguió una estrategia de recombinación homóloga. Para ello, se estableció un contrato-convenio con la Unidad de Animales Transgénicos (UAT) del Centre de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) con la que en colaboración se obtuvieron y generaron ratones quimera a través de la inyección a blastocistos C57BL/6J.Ola.Hsd (B6) de células madre embrionarias (ES cells) de ratón 129SvEv recombinantes *knock-in* YFP-TRPV1.

Vector de recombinación pKO-YFPTRPV1

El diseño y obtención del vector de recombinación para la modificación de las células madre corrió a cargo de nuestro grupo de laboratorio. Partiendo del vector pKO como base estructural, se introdujeron los brazos de recombinación correspondientes a 4 kilobases (Kb) cada uno de ellos de secuencia genómica del locus de TRPV1 de ratón (Figura 33). El brazo de recombinación 5' corresponde a la

MATERIALES Y MÉTODOS

secuencia aguas arriba del codón de inicio (ATG) abarcando parte del exón 2 y el exón 1 del gen TRPV1. El brazo de recombinación 3' se corresponde con la secuencia aguas abajo del codón de inicio y abarca desde parte del exón 2 hasta el exón 7 del gen TRPV1. Entre los brazos de recombinación se integró el ADNc de la proteína fluorescente amarilla (YFP) así como el casete de resistencia a la Neomicina flanqueado por secuencias FRT para su posterior eliminación.

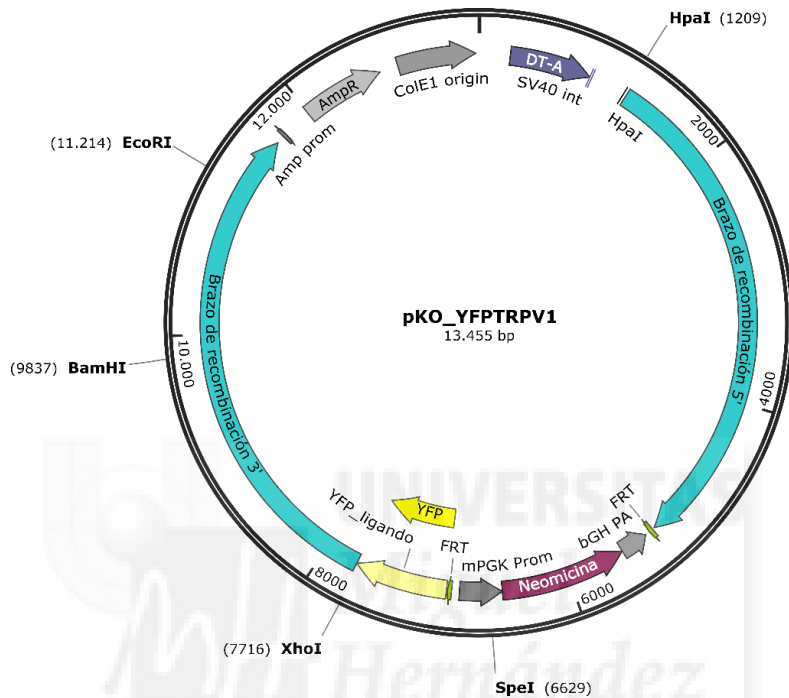


Figura 33. Esquema del vector pKO-YFPTRPV1 para la recombinación homóloga e inserción de la proteína YFP en el locus de TRPV1 de ratón. Se señalan en naranja el brazo de recombinación 5' correspondiente a la secuencia aguas arriba del ATG del gen de TRPV1 y el brazo de recombinación 3' correspondiente a la secuencia aguas abajo del ATG del gen de TRPV1, ambas en azul. En amarillo se señala la ubicación de la YFP entre los brazos de recombinación. Entre las secuencias FRT se marcan el promotor mPGK para la expresión de la resistencia a la Neomicina, señalada a continuación de él. En gris se señalan las secuencias de regulación para la replicación (ColE1 Origin), expresión en células mamíferas (DT-A) y selección (AmpR, resistencia a la ampicilina) correspondientes al propio plásmido. Las flechas señalan la orientación 5' - 3' de las secuencias de nucleótidos.

Recombinación homóloga

La obtención de clones modificados genéticamente se llevó a cabo por la UAT-CBATEG a través de la transfección de las células madre de la cepa 129SvEv con el vector pKO-YFP-TRPV1 y la selección de clones positivos a la recombinación homóloga con la aplicación de Neomicina. Los clones seleccionados y aislados se crecieron y expandieron hasta una confluencia del 100 % en placas de 12 pocillos, preservadas a -20°C , y enviados a nuestro laboratorio para la identificación de clones con la integración del vector en el locus de TRPV1 en sentido 5' - 3'.

Identificación del clon recombinante

Extracción de ADN genómico (ADNg)

La extracción de ADNg se llevó a cabo a partir de los clones 129SvEv asilados. Para ello se siguió un protocolo estándar de extracción de ácidos nucleicos con fenol: cloroformo.

De forma resumida, tras un lavado de los pocillos con tampón fosfato salino (PBS, de sus siglas en inglés *Phosphated Buffer Saline*) frío, se procedió con la lisis de las células con tampón de lisis (100 mM Tris – HCl, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 mM NaCl, 100 µg/ml de Proteinasa K y 40 µg/ml RNAsa) incubando 16 horas a 55°C. Para la separación en fases de los distintos componentes celulares se añadió un volumen equivalente al tampón de lisis de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1, v/v, Sigma) se centrifugó 5 minutos a 11000 rpm, y se transfirió sólo la fase superior acuosa a un nuevo tubo. Para la precipitación del ADN se añadió un volumen equivalente de Isopropanol (Sigma). El ADN genómico precipitado se lavó 2 veces con Etanol frío al 70 % (v/v) y tras dejar secar a temperatura ambiente (Ta) para la eliminación por evaporación de residuos de etanol, el pellet obtenido se resuspendió en agua miliQ estéril.

La cuantificación del ADNg obtenido para cada clon se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Europa).

Southern blot

El Southern blot se empleó para la localización de clones con la inserción en el locus de TRPV1. Para la creación del pul de ácidos nucleicos de cada clon y empleando como control ADNg de células ES no recombinantes, se digirieron entre 10 µg y 30 µg de ADNg con las enzimas EcoRV y SpeI (Thermo Scientific). La concentración de enzima y tiempo de digestión fueron determinados empíricamente. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en geles de agarosa del 0.8 % y se transfirieron a una membrana de nylon (Roche) previo tratamiento de depurinización. El ADNg transferido se fijó a las membranas mediante la aplicación de luz ultravioleta durante 1 minuto. Las sondas (Tabla 5) diseñadas y sintetizadas en nuestro laboratorio por amplificación a partir de ADNg de células ES no recombinantes, fueron enviadas junto a las membranas a los servicios técnicos del CBATEG para el marcaje, hibridación y resolución.

Tabla 5. Sondas empleadas en los Southern blots. Secuencia de los cebadores sentido y antisentido empleados para cada sonda junto con el tamaño de las sondas obtenidas a partir de ADNg de células ES129Sv no modificadas.

	<i>Cebador sentido (5' – 3')</i>	<i>Cebador antisentido (5' – 3')</i>	<i>Tamaño sonda (pb)</i>
<i>Sonda 0</i>	GTGCTAGGACTGTAAGC	CAGAGATTTTCAGCTCCC	569
<i>Sonda 1</i>	CAAGGTTAGGATCTTGTGGAC	AACAACACAGTGACAGGGATTGG	910
<i>Sonda 2</i>	GCAGATAACACAGCTGACAAACACC	ATCAAGATCCACAGAGCTGC	780

MATERIALES Y MÉTODOS

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se llevaron a cabo PCRs para la localización clones con la inserción de YFP en el locus de TRPV1 a través de la amplificación de las secuencias del locus de TRPV1 con el inserto.

PCR Larga

Se diseñaron parejas de cebadores localizadas entre la región “aguas arriba” del brazo de recombinación 5' y la región 5' del brazo de recombinación 3', así como entre la región 3' del brazo de recombinación 5' y la región “aguas abajo” del brazo de recombinación 3' (ANEXO I, Tabla I y Figura I). Los diseños se llevaron a cabo inicialmente manualmente siguiendo criterios estándar (cebadores de aproximadamente 20 nt, temperatura de *melting* (T_m) similar entre ellos con una desviación menor de 3°C, que no dimerizaran y sin estructura secundaria. Posteriormente se llevaron a cabo diseños empleando el software online Primer-BLAST (Ye et al., 2012) con las condiciones por defecto del programa salvo el tamaño del amplificado, fijando éste en más de 5 kb. Debido al gran tamaño de los brazos de recombinación se emplearon polimerasas especializadas en amplificaciones largas que permitieran amplificaciones superiores a las 5 kilobases (Kb). Así se comenzó empleando la enzima Kapa HiFi (Kapa Biosystems) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y ajustando las concentraciones de ADN molde, las temperaturas de hibridación y los tiempos de elongación según el amplicón y la pareja de cebadores (ANEXO I, Tabla II). La enzima JumpStart™ AccuTaq™ LA (Sigma) se utilizó con la pareja de cebadores p334/p3.3 como sentido y p381 antisentido (Tabla 6). Siguiendo las recomendaciones de la casa comercial se emplearon 200 ng de molde, cebadores a 0.4 μM y 25 μl de reacción final. A lo largo del proceso de optimización de las condiciones y del testado de pareja de cebadores se usó también la enzima Expand™ Long Template PCR System (Roche) con la pareja de cebadores p451/p452 en sentido y antisentido respectivamente (Tabla 6). Para esta PCR larga se empleó, siguiendo las indicaciones de la casa comercial, 300 ng de molde y 0.3 μM de cebadores para un volumen de 50 μl de reacción final. Para resolver el tamaño de los amplificados se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %.

Maria Hernández

Tabla 6. PCRs largas llevadas a cabo para la localización del clon recombinante con YFP en el locus de TRPV1 en sentido 5'-3'. Secuencia de cebadores sentido y antisentido empleados, enzima empleada para las amplificaciones y condiciones de las amplificaciones. Se especifican además los tamaños en pares de bases (pb) de los amplificadores esperados para el alelo TRPV1 no modificado (wt) y el alelo recombinante YFPTRPV1 (inserto).

Cebador sentido (5' - 3')	Cebador antisentido (5' - 3')	Enzima	Condiciones PCR	Tamaño (pb) alelo wt/inserto
GCAGCTGCTGCC ATTGC (p334)			Inicial: 96 °C 30''	4872/7394
CAGAGTGGTTGT GTCCTGA (p3.3)	CTAGAGGGGCTA GGCAT (p381)	JumpStart™ AccuTaq™ LA (Sigma)	30 ciclos: 94°C 10'' 63 °C 30'' 68 °C 8' 30'' Final: 68°C 9'	5923/8445
TGCACGTACTCC CTGAAAGA (p451)	TGACATTTAACG GAGGTGTTAGC (p452)	Expand™ Long Template PCR System (Roche)	Inicial: 94 °C 2' 10 ciclos: 94°C 10'' 63 °C 30'' 68 °C 6' 20 ciclos: 94°C 15'' 63 °C 30'' 68 °C 6' + 20'' por ciclo Final: 68°C 7'	5079/7593

PCR anidada

Se llevó a cabo una segunda PCR a partir del amplificado obtenido con las PCRs largas realizadas. Para ello se extrajeron los amplificadores de los geles de agarosa con los kits QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen) y E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega-Biotek) siguiendo las instrucciones de las casas comerciales. La PCR se realizó con la enzima GoTaq G2 (Promega) a partir de 100 ng de molde, 0.5 µM de los cebadores p308 (5'-GACGACGGCAACTACAA-3') y p380 (5'-TACCTGAGACAGGTAGGT-3') y 2 mM de MgCl₂ para una reacción final de 50 µl. Siguiendo las condiciones recomendadas por el

MATERIALES Y MÉTODOS

fabricante, se realizó la amplificación con 30 ciclos, una temperatura de hibridación de 57°C y una elongación de 1 minuto.

El tamaño del amplificado (728pb) se resolvió con una electroforesis en gel de agarosa al 2 %. El amplificado obtenido para cada una de las PCRs se extrajo del gel con el E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega-Biotek), cuantificado en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Europa) y enviado a secuenciar a Secugen S.L.

Generación de los ratones quimera

Llevada a cabo por los Servicios de Animales Transgénicos del CBATEG de la UAB se resume en la inyección de células madre embrionarias de ratón (*ES cell*) 129SvEv recombinantes, identificadas como *knock-in* positivas para YFP-TRPV1, en blastocistos C57BL/6J.Ola.Hsd SPF (*Specific Pathogen Free*). Se realizó la transferencia de los blastocitos inyectados en hembras pseudogestantes (SPF) que se mantuvieron hasta el parto y la finalización de lactancia (3 semanas) de los animales obtenidos. La identificación de los animales quimera se realizó por el color del pelaje.

PCR (Genotipado)

El genotipado de la generación F1 y siguientes para la identificación de los animales heterocigotos, los animales sin el casete de resistencia a la Neomicina y los animales homocigotos se llevó a cabo a partir de la extracción de ADN_g desde tejido de cola de los animales. El protocolo seguido se corresponde con la extracción con Hidróxido de Sodio y Tris descrito en Truett et al. (2000).

Para la PCR se empleó la enzima GoTaq G2 (Promega) adaptando el protocolo dado por el fabricante para una reacción final de 25 µL. Cada reacción se ajustó a una concentración final de 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada cebador (Tabla 7) y 2 µL de ADN_g obtenido en la extracción. Para los controles negativos y positivos de cada pareja de cebadores se empleó ADN_g de ratones silvestres (B6) y heterocigotos (YFP-TRPV1*) extraído de hígado por el método estándar de Fenol: Cloroformo descrito anteriormente.

Tabla 7. Cebadores empleados para el genotipado del modelo animal. Parejas de cebadores empleadas en las generaciones F1, N1, N2 y F1' para confirmar la transmisión de la YFP en los 4 casos, la eliminación o permanencia de la resistencia a la Neomicina en N1 y N2, y la presencia o ausencia del alelo silvestre en la F1' (véase Figura 9). Se señala el tamaño del amplificado esperado para cada PCR. En el caso del TRPV1 silvestre las condiciones de la PCR amplificaban dicho alelo (749 pb) además del alelo con la inserción YFP sin la resistencia a la Neomicina (1554 pb).

Diana	Cebador FW (5' - 3')	Cebador RV (5' - 3')	Tamaño de amplificado (pb)
YFP-TRPV1	GACGACGGCAACTACAA	TACCTGAGACAGGTAGGT	728
casete NeoR	AGTTCCTCCACAATGCGTCT	CTATCGCCTTCTTGACGAGT	750
TRPV1 silvestre (wt)	AGTTCCTCCACAATGCGTCT	TGACATTTAACGGAGGTGTTA GC	749 / 1554

El programa de termociclador empleado se resume en: 2' a 95°C de desnaturalización previa, 30 ciclos con 1' a 95°C de desnaturalización, 30'' a 57°C (para la pareja YFP-TRPV1) a 60°C (para las otras dos parejas de cebadores) de hibridación y 1' a 73°C de elongación finalizando con 3' a 73°C de elongación final. Las PCR se resolvieron a través de electroforesis en geles de agarosa al 2 %.

Extracción del tejido neuronal: cerebro, médula espinal y DRGs

Para el análisis y caracterización de la expresión de la proteína de fusión YFP-TRPV1 esperada en el modelo animal *knock-add-on* se empleó el tejido neuronal de animales de la generación heterocigota con y sin casete de resistencia a la Neomicina usando como control el tejido neuronal de animales *wt*. Se eligió este tejido por la alta expresión de nuestra proteína de interés en el mismo (Diez-Roux et al., 2011).

Se emplearon animales adultos de entre 7 y 15 semanas de edad de ambos sexos a partir de los cuales, previa anestesia y decapitación, se abrió cráneo y columna vertebral. Se extrajeron cerebro y médula espinal y se diseccionaron bilateralmente todos los DRGs estableciendo un pul de los mismos. Los tres órganos se lavaron 2 veces con solución salina (NaCl 0.9 %) para eliminar los posibles residuos de sangre. Los tejidos se conservaron secos a -20°C cuando se destinó a la extracción proteica y a -80°C cuando se destinó a la extracción de ARN.

Cultivo de DRGs

Para la caracterización de la expresión de YFP-TRPV1 a través de inmunocitoquímica se llevó a cabo el cultivo de DRGs. Al igual que en la extracción de este tejido, se diseccionaron bilateralmente todos los DRGs estableciendo un pul que se mantuvo en medio DMEM+Glutamax suplementado con 1 % de P/S. Tras retirar las raíces axonales se llevó a cabo la digestión enzimática con Colagenasa IX (5 mg/ml, Sigma) y Dispasa (10 mg/ml, GIBCO) en medio INC Mix (155 mM de NaCl, 1.5mM de K₂HPO₄, 5.6 mM de HEPES, 4.8 mM de NaHEPES, 5 mM de glucosa), durante una hora a 37°C con CO₂ al 5 %. La digestión enzimática se inactivó con 1 ml de medio de cultivo completo (DMEM-Glutamax + 10 % de FBS + 1 % de P/S) procediendo con la digestión mecánica con pipeta Pasteur hasta la disgregación completa del tejido. Se concentraron las células para su recolección centrifugando a 2000 rpm durante

10 minutos. Tras retirar el medio con los residuos, se resuspendió el pellet de células en medio de cultivo completo suplementado con NGF (Promega) a 50 ng/ml de concentración final. La siembra se llevó a cabo en placas de 24 pocillos con cristal previamente tratadas con poli-L-lisina (Sigma) a una concentración final de 8.33 µg/ml durante 30 minutos a 37°C y al 5 % de CO₂; se lavaron 2 veces con D-PBS (*Dubbelco's Phosphate Buffer Saline*, Sigma) y se incubaron a 37°C con CO₂ al 5 % toda la noche (o/n) con laminina (Sigma) a una concentración de 5 µg/ml. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 48-72 horas hasta su uso en Inmunocitoquímica.

Inmunocitoquímica (ICC)

Las inmunocitoquímicas se llevaron a cabo a partir de cultivos de DRGs y de MED17.11 fijados con solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente tras ser lavados con D-PBS frío para eliminar todos los posibles residuos del medio de cultivo, así como restos celulares. La autofluorescencia generada por el tipo de fijación fue neutralizada (*quenching*) con una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente de 50 mM de cloruro de amonio para reducir en la medida de lo posible interferencias con el marcaje. Tras el lavado con D-PBS frío se procedió con la permeabilización y bloqueo de las células con 0.1 % de Tritón X-100, 3 % de Albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) y 5 % de Suero normal de cabra (NGS, Sigma) durante 1 hora a Ta en el caso de las MED17.11. Para los DRGs se realizó una permeabilización con 0.3 % de Tritón X-100 durante 3 minutos seguido de un bloqueo con 5 % de NGS de una hora a temperatura ambiente. En ambos casos se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario diluido en 5 % de NGS (Tabla 8). Tras la incubación se realizaron lavados con PBS-T (0.05 % de Tween-20 en tampón fosfato salino, PBS) para continuar con la incubación del anticuerpo secundario en 5% de NGS a temperatura ambiente durante una hora (Tabla 8). La tinción de los núcleos celulares se realizó con una incubación de 2 minutos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Molecular Probes) lavando el exceso con PBS-T. En el caso de los DRGs sembrados en cristal de 12 mm de diámetro se llevó a cabo el montaje del cristal sobre portaobjetos con Mowiol para su posterior visualización en microscopio confocal invertido (Zeiss LSM 5 Pascal, Carl Zeiss). Las imágenes tomadas de las células fueron analizadas con el programa Zen lite 2012 (Zeiss). En el caso de las MED17.11 no se requirió montaje habiendo llevado a cabo la siembra y la fijación de las células en placas de 96 pocillos y realizando la visualización en el equipo InCell (GE Healthcare). Se tomaron imágenes de 8 campos por pocillo con el aumento 40x.

El análisis de las imágenes se llevó a cabo posteriormente con el programa ImageJ v1.51p (NIH). El conteo del número total de células por campo se realizó de forma automática a partir de las imágenes de DAPI contando el número de núcleos presentes. El conteo del número de células positivas para cada uno de los marcajes se llevó a cabo de forma manual. El porcentaje de células positivas se calculó a partir del número de células totales contadas por campo aplicando un factor de corrección de 0.8. El factor de corrección fue calculado a través de la razón entre el número de células totales obtenidas a partir del conteo automático respecto al conteo manual.

Tabla 8. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en las ICC. En el caso de los anticuerpos primarios se señalan contra qué proteína se sintetizaron y la especie en la que se crearon. Para los anticuerpos secundarios se señalan contra la especie sobre la que se sintetizaron y el conjugado fluorescente. En ambos casos se especifica la dilución empleada, la temperatura y el tiempo de incubación, siendo la temperatura ambiente (Ta) de aproximadamente 24°C y toda la noche (o/n) unas 16 horas, y la casa comercial de la que se obtuvieron.

Anticuerpo primario	Especie	Dilución	Incubación	Casa comercial
<i>TRPV1</i>	Conejo	1:500	4°C o/n	Alomone
<i>GFP</i>	Ratón	1:200	4°C o/n	Santa Cruz
<i>GFP</i>	Conejo	1:200	4°C o/n	Life Technologies
<i>GAFP pAB</i>	Conejo	1:200	4°C o/n	Abcam
<i>IB4-568</i>	/	1:200	Ta 1 hora	Molecular Probes
<i>TrkA</i>	Conejo	1:200	4°C o/n	Millipore
<i>Tuj1</i>	Conejo	1:200	4°C o/n	Abcam
Anticuerpo secundario	Conjugado	Dilución	Incubación	Casa comercial
<i>Anti-Mouse</i>	Alexa-488	1:200	Ta 1 hora	Molecular probes
<i>Anti-Rabbit</i>	Alexa-568	1:200	Ta 1 hora	Molecular Probes
<i>Anti-Rabbit</i>	Alexa-FITC	1:200	Ta 1 hora	Sigma

Extracción de ARN y retro-transcripción (RT)

Para el análisis de expresión de YFP-TRPV1 frente a TRPV1 en el caso del modelo animal y de marcadores neuronales en el modelo celular se llevó a cabo la extracción y retrotranscripción del ARN total. En ambos casos se empleó el kit E.Z.N.A.TM HP Total RNA (Omega Bio-Tek) siguiendo las indicaciones de la casa comercial salvo en la lisis de los tejidos en la que se llevó a cabo la disgregación de hasta 10 mg de tejido conservado a -80°C con tampón de lisis a través de secuencia de jeringuillas 21G, 23G, 25G y 27G. Tras la elución en agua estéril libre de DNAsas y RNAsas se cuantificó el ARN con el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Europa).

Se empleó 1 µg de ARN para la retrotranscripción con el kit Gene Amp[®] RNA PCR (Applied Biosystems) en el caso de tejido y 1 µg - 500 ng de ARN para la retrotranscripción con el kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) previa digestión con DNasa I (Invitrogen) para las muestras de MED17.11. En ambos casos la retrotranscripción se llevó a cabo empleando Hexámeros Aleatorios proporcionados en los respectivos kits, así, el ADNc obtenido se corresponde con el ARN total de las muestras.

PCR semicuantitativa y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

El análisis de expresión de TRPV1/ YFP-TRPV1 se realizó a partir de 20 ng de ADNc obtenido de los distintos tejidos nerviosos con una PCR a tiempo final. Se empleó la polimerasa GoTaq (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron los cebadores (p348: 5'-CCAGCAGAACACCCCC -3'/ p3.71: 5'-GATCATAGAGCCTTGGGGGC-3') para la amplificación específica de la YFP-TRPV1 y los cebadores (p3.70: 5'-GAGGCCACTCTTACCACACAG-3'/p3.71: 5'-GATCATAGAGCCTTGGGGGC-3') para la amplificación de TRPV1 (467 pb). Como control de la retrotranscripción y cuantificación se llevó a cabo una PCR de forma paralela del gen endógeno β -Actina con los cebadores (R21: 5'-TCTGGAAAGGTTCTGAAGTTCCT-3'/ R22: 5'-CTGGAAAGGATGGAGAAATGG-3'). Todas las PCRs se realizaron con controles sin molde para determinar la no contaminación de los reactivos.

Los niveles de expresión de los distintos marcadores neuronales implicados en el desarrollo neuronal y/o presentes en subpoblaciones neuronales maduras se analizaron en la línea celular MED17.11 a través de PCRs a tiempo real (RT-qPCR). Los cebadores específicos para cada gen se extrajeron desde bibliografía o empleando la base de datos PrimerBank (Spandidos et al., 2014; Wang et al., 2012) (Tabla 9). Para la amplificación se empleó el PowerUP™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) de acuerdo a las indicaciones de fabricante a partir de 5 ng de ADNc de cada muestra. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en el termociclador ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems) con un ciclo de 2 minutos a 50°C y 2 minutos a 95°C seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Además, se incluyó un paso adicional de disociación para obtener la curva de disociación o curva de *melting*. Los datos se normalizaron con el valor Ct (ciclo basal) obtenido para el gen endógeno GAPDH y se relativizaron los niveles de expresión respecto a los valores obtenidos en DRGs siguiendo el método de Livak (Livak and Schmittgen, 2001).

Miguel Hernández

Tabla 9. Marcadores neuronales analizados en las MED17.11. Se especifica el factor de transcripción, el receptor o el canal iónico analizado y en el caso de divergencia nominal, el gen entre paréntesis. Se indica el código de indexado correspondiente a Genbank sobre el que se basó la búsqueda y el diseño, así como los cebadores sentido y antisentido empleados. Se especifica el tamaño del amplificado esperado en pares de bases y la referencia de la cual se extrajeron las secuencias de cebadores.

Diana (gen)	Código Genbank	Cebador sentido (5' - 3')	Cebador antisentido (5' - 3')	Tamaño amplificación (bp)	Referencia
<i>SOX10</i>	NM_011437.1	ACACCTTGGGACA CGGTTTTTC	TAGGTCTTGTTCCT CGGCCAT	165	Primer bank (Spandidos et al., 2014; Wang et al., 2012)
<i>BRN3A</i> (<i>POU4F1</i>)	NM_011143.4	CGCGCAGCGTGAG AAAATG	CGGGGTTGTACGG CAAAT	123	(You et al., 2015)
<i>C-RET</i>	NM_001080780. 1	TCAAGGGATGCTT ACTGGGAG	GGTAGACGCCATA GAGATGCT	136	(Cheng et al., 2016)
<i>RUNX1</i>	NM_001111021.2	CAGGTAGCGAGAT TCAAC	TTTGATGGCTCTAT GGTAGGT	123	(Hadjab et al., 2013)
<i>TRKA</i> (<i>NTRK1</i>)	NM_001033124.1	CTCTGTCCAAGTCA GCGTCTC	GTTGAACAACCAG CGCAGAG	127	(Franck et al., 2011)
<i>P75 (NGRF)</i>	NM_033217.3	TGCCGATGCTCCTA TGGCTA	CTGGGCACTCTTCA CACACTG	133	Primer bank (Spandidos et al., 2014; Wang et al., 2012)
<i>TRPV1</i>	NM_001001445. 2	TCACCACGGCTGC TTACTATC	AACGGTGTATTTC AGCTTATAGGG	65	(Franck et al., 2011)
<i>TRPA1</i>	NM_177781.5 NM_001348288. 1	GCAGGTGGAAGT CATACCAACT	CACTTTGCGTAAAGT ACCAGAGTGG	61	(Elitt et al., 2006)
<i>TRPM8</i>	NM_134252.3	CTTTCTAAGCAATG GTATGGAG	GGTTTCTTCTCTAAA TGATACGAG	116	(Franck et al., 2011)
<i>TRPC3</i>	NM_019510.2	TCTCAATCAGCCA ACACGAT	ATTTCTTTCAGTTC ACCTTCATTCA	117	(Franck et al., 2011)
<i>CGRP</i> (<i>CALCA</i>)	NM_001033954. 3 NM_007587.2	TTTCTGGTTGTCA GCATCTT	GCGAACTTCTTCTT CACTGAGAGT		(Franck et al., 2011)
<i>SUSTANCI</i> <i>A P (TAC1)</i>	NM_001311060.1 (Iso 2) NM_009311.2 (Iso 1)	TTTTCTCGTTTCCA CTCAACTGT	TCTGCAGAAGATG CTCAAAGG	131	(Franck et al., 2011)

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 9. Continuación

Diana (gen)	Accession number	Cebador sentido (5' - 3')	Cebador antisentido (5' - 3')	Tamaño amplicón (bp)	Referencia
<i>P2RX3</i>	NM_145526.2	AAAGCTGGACCAT TGGGATCA	CGTGTCCCGCACTT GGTAG	107	Primer Bank (Spandidos et al., 2014; Wang et al., 2012)
<i>NAVI.7 (SCN9A)</i>	NM_001290674.1 (iso a) NM_001290675.1 (iso b)	CCTTGGCCCCATTA AATCTCT	TGCTCCTATGAGTG CGTTGAC	106	(Hodgdon et al., 2012)
<i>NAVI.8 (SCN10A)</i>	NM_001205321.1 (iso 1) NM_009134.3 (iso 2)	TTGACACAACCTC GCTCTATTCC	ATTCACCCCTGGGT CTTCTCTCA	81	(Hodgdon et al., 2012)
<i>NAVI.9 (SCN11A)</i>	NM_011887.3	CTTCAGGATTGTCC GCTTGG	AGAGAGAGGGGA GAGACATCATCA	110	(Hodgdon et al., 2012)
<i>MRGA1</i>	NM_153095.2	GCAGATAAAGCTT ACCAGATTGTATG TAAC	ATCTTGAATAACA GAAACCAGTGGAT G	105	(Franck et al., 2011)
<i>MRGA3</i>	NM_153067.2	CTCAAGTTTACCCT ACCCAAAGG	CCGCAGAAATAAC CATCCAGAA	233	Primer bank (Spandidos et al., 2014; Wang et al., 2012)
<i>MRGD</i>	NM_203490.3	CTTCTGTGTCTATG TGCTCAACCT	GAGGCCATGCAGA ATAAGAAGAG	63	(Franck et al., 2011)
<i>GAPDH</i>	NM_001289726.1 (Iso 1) NM_008084.3 (Iso 2)	CCAATGTGTCCGTC GTGGATCT	GTTGAAGTCGCAG GAGACAACC	239	(Kosir et al., 2010)

Western Blot

Para la detección de las proteínas de interés tanto en el modelo animal como en el modelo celular se llevó a cabo inmunoblots o western blots.

Para los tejidos neuronales (cerebro y médula espinal) conservados a -20°C, la extracción de proteínas totales se llevó a cabo homogeneizando previamente con el Polytron® (PT10-35, Kinematica) en una solución Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con cóctel de inhibidor de proteasas (1:100, Sigma) en una proporción de 1 ml por cada mg de tejido. Para los DRGs, el tejido fue disgregado a través de secuencia seriada de jeringuillas reduciendo la luz de las agujas (21G, 23G, 25G y 27G) estando el tejido resuspendido en

Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con cóctel de inhibidor de proteasas (1:100). La retirada de fibras y restos tisulares no disgregados se realizó centrifugando a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante en ambos casos fue centrifugado a 13000 rpm a 4°C durante 20 minutos (los tejidos más grandes) y durante 12 minutos los DRGs para concentrar el extracto y poder proceder al lisado.

En el caso de los cultivos celulares, las células transfectadas y las MED17.11, se lavaron 2 veces con PBS 1x frío para eliminar los residuos de medio y se levantaron de las placas de siembra con una rasqueta, resuspendiéndolas en PBS 1X.

Las células se centrifugaron durante 5 min a 7000 rpm con el fin de concentrarlas. Una vez concentradas las células procedentes bien de tejido, bien de cultivo, se extrajeron las proteínas incubando entre 20 minutos y 1 hora (en base al volumen de pellet) a 4°C en agitación con tampón RIPA (50 mM Tris-HCl a pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 % NP-40; 0.1 % SDS; 0.5 % sodiodexocholate; cóctel inhibidor de proteasas 1:100, todo procedente de Sigma). Los núcleos y los restos celulares fueron retirados. Para ello, se centrifugó durante 20 minutos a 13000 rpm a 4°C. A continuación, cuantificó el extracto de proteínas totales del sobrenadante a través del ensayo de ácido bicinónico (BCA) con el kit BCA Protein Assay Reagent (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Entre 20-50 µg de proteína fueron desnaturizados con el tampón de muestras reductor 4x calentando las muestras a 95°C durante 5 minutos. El pul de proteínas se separó a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-HCl del 10 % con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) a los que se aplicaba un voltaje de 90-100V durante 1 hora 30 minutos aproximadamente. Para la exposición de proteínas a la conjugación con anticuerpos específicos, éstas fueron transferidas desde los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa (BIORAD) a través de una transferencia semiseca usando el Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell System (BIORAD) con el tampón Bjerrum and Schafer-Nielsen. Tras ello, la membrana era bloqueada con 5 % de leche desnatada en PBS-T durante una hora en agitación a temperatura ambiente para prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos primarios y/o secundarios. Tras el bloqueo, las membranas eran incubadas de forma separada con los anticuerpos primarios anti-TRPV1 (Alomone, 1:5000), anti-GFP (Santa Cruz, 1:2000) anti-GFP (Life Technologies, 1:2000) y anti-actina (Sigma, 1:1000) a 4°C o/n en agitación suave. Tras esta incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces en agitación a temperatura ambiente con PBS-T durante 10 minutos cada vez, para proceder con la incubación del anticuerpo secundario conjugado a HRP anti-conejo o anti-ratón (Sigma, 1:20000) a temperatura ambiente durante 1 hora. Todos los anticuerpos fueron preparados en leche desnatada al 3 % en PBS-T. Tras los correspondientes 3 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno se procedió con la visualización de las bandas inmunoreactivas a través de revelado manual. Empleando el sistema Amersham ECL™, la señal quimioluminiscente era capturada en películas Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) y posteriormente reveladas manualmente con líquidos de revelado y fijado de películas de rayos X.

Imagen de Calcio

Para los estudios de funcionalidad de las MED17.11 se llevó a cabo imagen de Calcio. Para ello, las células, sembradas en cristales de 12 mm de diámetro, eran incubadas con 6 µM de éster de acetoximetilo del fluoróforo sensible a Ca²⁺ Fluo-4 (Fluo4-AM, Molecular Probes) con 0.02% de ácido plurónico (Molecular Probes) disuelto en solución externa (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM D-Glucosa, 10 mM HEPES a pH 7.4) durante 1 hora a 37°C con CO₂ al 5 %. Colocadas en la cámara de imagen (RC-25, Harvard Apparatus) las células eran perfundidas de forma continua

MATERIALES Y MÉTODOS

con solución externa a temperatura ambiente a través de un sistema de perfusión gravitacional controlado automáticamente (Pc-16 Controller, Bioscience Tools). La actividad de las células trató de ser evocada aplicando Capsaicina (10 μ M), resuspendida en solución externa desde un stock a 10 mM en dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma), adenosín-5'-trifosfato (ATP, 10 μ M), resuspendido en solución externa desde un stock a 10 mM en agua destilada, y finalmente la solución externa rica en K⁺ (140 mM NaCl, 40 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM D-Glucosa, 10 mM HEPES a pH 7.4) durante 45 segundos con periodos de lavado de 4 minutos entre estímulos.

La fluorescencia fue monitorizada a través de un objetivo 10x (Microscopio invertido Axiovert 200, Carl Zeiss) con una cámara ORCA-ER CCD (Hamamatsu Photonics). El Fluo-4 AM fue excitado a 500 nm y la fluorescencia emitida filtrada a 535 nm a través de una rueda de filtros controlada automáticamente (Lambda 10-2, Sutter Instruments). Las imágenes adquiridas se procesaron con el paquete AquaCosmos (Hamamatsu Photonics).

El porcentaje de células que respondieron a los estímulos se estipuló como la razón entre el aumento de la intensidad de la fluorescencia tras la aplicación de los compuestos respecto y al nivel basal previo a la aplicación. Este valor fue corregido por la desviación estándar del nivel basal. Se aceptó como respuesta todo cambio de fluorescencia superior al 0.2 dentro del rango de aplicación de cada estímulo y segundos posteriores.

CRISPR-Cas9

Como alternativa a la recombinación homóloga empleada en la generación del modelo animal se diseñó y se estudió la eficiencia del sistema CRISPR-Cas9 para la generación de un modelo *knock-in* que expresara las proteínas de fusión YFP-TRPV1, CFP-TRPA1 y TRPM8-mRuby.

Selección de secuencias diana

El reconocimiento y la actuación de la endonucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* lleva aparejados una serie de requisitos de la secuencia ARNsg. En este trabajo se emplearon dos herramientas web de todas las disponibles (Jamal et al., 2016; Peng et al., 2016) para la búsqueda y selección de las secuencias diana de cada uno de los genes a modificar. Una primera búsqueda se llevó a cabo con la herramienta online CHOPCHOP (Labun et al., 2016; Montague et al., 2014). A partir del nombre del gen o la referencia de ARN del gen, TRPV1 (NM_001001445), TRPA1 (NM_177781) y TRPM8 (NM_134252), y dentro del genoma de *Mus musculus* (mm10/CGRm38) aportado por el programa se buscaron potenciales secuencias sin la modificación de ningún parámetro base del programa. Las secuencias arrojadas por ChopChop se acotaron a las localizadas en el exón de interés de la inserción, exón 2, exón 1 y exón 26 para TRPV1, TRPA1 y TRPM8 respectivamente.

De forma paralela y para complementar la información obtenida en la primera búsqueda se llevó a cabo la búsqueda de potenciales secuencias diana a través del programa online Optimized CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu/>), del laboratorio de Feng Zhang. Empleando una región genómica de 250 nt circundante al codón de inicio ATG de TRPV1 y TRPA1 y al codón de parada TAA de TRPM8 sobre el genoma de ratón (mm9) se realizó la búsqueda con los parámetros estándar predefinidos en el programa.

El principal criterio para la selección de la secuencia diana fue la cercanía de la misma al punto de inserción seleccionado, el codón de inicio en el caso de TRPV1 y TRPA1 y el codón de parada de TRPM8. El *score* o puntuación (algoritmo dado por cada una de las herramientas que puntúa la idoneidad de la secuencia diana) fue el criterio secundario ya que éste se basa en el número de *off-targets* (potenciales regiones cortadas por Cas9 dada la similitud de la misma a la secuencia diana), y el número y posición de *mismatches* (nucleótidos no coincidentes con la secuencia diana en regiones genómicas similares).

Test *in vitro*

El estudio de la eficiencia de corte de la Cas9 frente a la secuencia diana seleccionada para cada gen se llevó a cabo a través del kit Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems (Clontech) siguiendo el protocolo dado por la casa comercial, empleando 20 ng y aproximadamente 500 ng de ARNsg sintetizado *in vitro* para cada test.

La eficacia se definió como el porcentaje de los ng de molde digeridos por parte de la Cas9. Para la cuantificación de los mismos se realizó un análisis de densitometría a partir de las bandas observadas en una electroforesis empleando el programa de imagen ImageJ (Antiabong et al., 2016).

Generación de vectores

La creación del vector *all-in-one*, en el que se expresa tanto la endonucleasa Cas9 como el ARNsg requiere únicamente de la introducción de la secuencia diana seleccionada. Para ello, siguiendo el protocolo dado por Ran et al. (2013b), 1 µg del vector PX459 fue linealizado con la enzima de digestión Bpi I (NEB) tal y como marcaba la casa comercial. Para evitar la recircularización y facilitar la integración de los oligonucleótidos se llevó a cabo una desfosforilación del vector linealizado con la enzima FastAP (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Cada una de las parejas de oligonucleótidos de las secuencias seleccionadas a integrar en el vector (Tabla 10) fue hibridada entre sí con una concentración equimolar de cada oligo en presencia de tampón de hibridación (10 mM Tris; 50 mM NaCl ; 1 mM EDTA a un pH de 7.5-8) incubando 2 minutos a 95°C seguidos de 45 minutos a 25°C.

Tabla 10. Secuencias de oligonucleótidos sentido y antisentido empleados para inserción de las secuencias diana de TRPV1, TRPA1 y TRPM8 en el vector PX459.

Gen diana	Secuencia (5' - 3')
<i>TRPV1</i>	CACC G TCTGTCTGGAGGGTCCGGGC AAAC GCCCGGACCCTCCAGACAGA C
<i>TRPA1</i>	CACC G AGTCAATGAAGCGGGCTTG AAAC CAAGCCGCGCTTCATTGACT C
<i>TRPM8</i>	CACC G AGTAAGGCTGGCGATGCTTG AAAC CAAGCATCGCCAGCCTTACT C

MATERIALES Y MÉTODOS

La ligación con la ligasa T4 (Invitrogen) del oligonucleótido con el vector se llevó a cabo siguiendo los cálculos arrojados por la NEBioCalculator™ v 1.6.0 y testando los ratios 1:1, 1:3 y 1:5 de vector frente a ligando a fin de aumentar las probabilidades de integración.

El producto de ligación se transformó por choque térmico en cepas de *Escherichia coli* BL21, para la amplificación del vector, sembrando en LB Agar con Ampicilina (100 mg/ml) para la selección de colonias positivas al plásmido. A través de pruebas RFLP (digiriendo con la enzima Bpi I) así como secuenciando el vector se confirmó la integración del oligonucleótido tras la amplificación y la purificación del vector con el kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA.

La obtención del vector molde con YFP para TRPV1 se realizó modificando el vector PKO-YFPTRPV1 diseñado y construido para la realización del modelo animal por recombinación homóloga. Los brazos de recombinación del vector de unas 4 Kb cada uno resultaban demasiado extensos por lo que hubo de acortarlos a 2 Kb. Se diseñaron los respectivos oligonucleótidos para introducir secuencias de restricción en cada uno de los brazos por mutagénesis dirigida. Para el brazo de recombinación 3' se empleó la pareja de oligos p3.28/p329 (5'-TGGCAAGCTATCTGGATCCGACGTCAGGTGGCACT-3' / 5'-AGTGCCACCTGACGTCGGATCCAGATAGCTTGCCA - 3') y para el brazo de recombinación 5' se emplearon los oligos p3.30/p3.31 (5'- TGCTTCCAAAGCTTGTTAACCTCACAGCTTCCCG-3'/5'-CGGAAGCTGTGAGGTTAACAAGCTTTGGAAGCA-3'). De forma secuencial se llevaron a cabo las mutagénesis dirigidas a través de PCR, empleando la enzima Kapa Hifi (Kapa Biosystems) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las digestiones de cada uno de los brazos también se realizaron de forma secuencial, comenzando con el brazo de recombinación 3' para el que se empleó la enzima de digestión BamHI. Para el brazo de recombinación la digestión se llevó a cabo con la enzima HpaI. En ambos casos el vector digerido fue resuelto en un gel de agarosa para la extracción de la secuencia sin el fragmento de 2 kb y ligado con la ligasa T4 (Invitrogen). La correcta ligación del vector fue confirmada por secuenciación.

La obtención del vector molde con mRuby2 para TRPM8 se llevó a cabo a través de una clonación secuencial usando como vector base el pcDNA3 de la proteína fluorescente mRuby2 (Lam et al., 2012). Los insertos se obtuvieron por amplificación de la región genómica de TRPM8 correspondiente al codón de parada (Chr1: 88,383,173... 88,384,710 para el brazo de recombinación 5' y Chr1: 88,384,714... 88,383,786 para el brazo de recombinación 3'). En primer lugar, se llevó a cabo la integración del brazo de recombinación 3' digiriendo inserto y vector con las enzimas EcoRI / XmaI (las secuencias de restricción en el caso del inserto fueron incluidas en los cebadores de la amplificación) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Tras la confirmación por RFLP y secuenciación de la correcta integración se llevó a cabo la inserción del brazo de recombinación 5' digiriendo inserto y vector con las enzimas de restricción BglII / BamHI. En ambos casos, se procedió como con el vector PX459 para la selección y amplificación de los productos obtenidos tras la ligación de vector e inserto.

La obtención del vector molde con CFP para TRPA1 se diseñó para realizar una clonación secuencial usando como vector base el de la proteína fluorescente CFP pECFP-C1 (Clontech). Los insertos se obtuvieron por amplificación de la región genómica de TRPA1 correspondiente al codón de inicio (Chr1: 14,920,913... 14,918,836 para el brazo de recombinación 5' y Chr1: 19,918,835... 14,916,643 para el brazo de recombinación 3') incluyendo las secuencias de restricción en los oligonucleótidos empleados. Las digestiones diseñadas se realizarían de forma secuencial con las enzimas NdeI/AgeI para el brazo de recombinación 5' y BglII/AflIII para el brazo de recombinación 3'.

Comprobación de efectividad del sistema CRISPR/Cas9 en línea celular.

Empleado la línea celular de ratón C2C12 se procedió a la transfección con Lipofectamina 3000™ (Invitrogen) para la introducción de los vectores psCas9-M8 (vector all-in-one con la secuencia diana para TRPM8) y mRuby2-M8 (vector molde para la introducción de la mRuby2). Las células sembradas en placas de 6 pocillos a una concentración de 100.000 células por pocillo fueron transfectadas con 1,5 µg/pocillo y 3 µg/pocillo de spCas9-M8 y mRuby2-M8 respectivamente siguiendo las recomendaciones del fabricante. A las 48 horas de la transfección se llevó a cabo la selección de las células que habían integrado la spCas9-M8 exponiendo el cultivo a 1,5 µg/ml de Puomicina en el medio.

A los 5 días las células fueron tripsinizadas y concentradas para proceder a la selección de clones a través de la dilución seriada del stock obtenido en placas de 96 pocillos. Los clones aislados se expandieron hasta alcanzar una confluencia del 80% en placas de 12 pocillos. En esta fase se llevó a cabo la extracción del ADNg a través del kit Blood DNA Mini Kit (Omega-BioTek).

La comprobación de la inserción de la mRuby2 en cada uno de los clones se realizó a través PCR con la pareja de cebadores sentido (FW) 5'-CCATCTCTGTGTCCTGAG-3' y antisentido (RV) 5'-TGTAGACCCATAGAACACCC-3' y la enzima Kapa Hifi (Kapa Biosystems) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, con 100 ng de molde y una reacción final de 25 µl. En el protocolo del termociclador la hibridación se realizó a 63°C y la elongación se realizó durante 1 minuto. El producto de la amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% cargando sólo 10 µl de reacción enviando el resto de amplificado a secuenciar.

Análisis estadísticos

Los datos se visualizaron y analizaron empleando el paquete estadístico GraphPad Prism v6.01. Todos los datos se expresan como la media ± SD. Los análisis estadísticos aplicados se especifican en cada resultado o figura.



BIBLIOGRAFÍA

- Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* 9, 1911.
- Aguilera-Castrejon, A., Pasantes-Morales, H., Montesinos, J.J., Cortes-Medina, L.V., Castro-Manreza, M.E., Mayani, H., and Ramos-Mandujano, G. (2017). Improved proliferative capacity of NP-like cells derived from human mesenchymal stromal cells and neuronal transdifferentiation by small molecules. *Neurochem Res* 42, 415-427.
- Ahmad, G., and Amiji, M. (2018). Use of CRISPR/Cas9 gene-editing tools for developing models in drug discovery. *Drug Discov Today* 23, 519-533.
- Aida, T., Chiyo, K., Usami, T., Ishikubo, H., Imahashi, R., Wada, Y., Tanaka, K.F., Sakuma, T., Yamamoto, T., and Tanaka, K. (2015). Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol* 16, 87.
- Akopian, A.N. (2013). Approaches to cloning of pain-related ion channel genes. *Methods Mol Biol* 998, 3-19.
- Albers, E., Sbroggio, M., Martin-Gonzalez, J., Avram, A., Munk, S., and Lopez-Contreras, A.J. (2017). A simple DNA recombination screening method by RT-PCR as an alternative to Southern blot. *Transgenic Res* 26, 429-434.
- Allen, K.J., Reyes, R., Demmler, K., Mercer, J.F., Williamson, R., and Whitehead, R.H. (2000). Conditionally immortalized mouse hepatocytes for use in liver gene therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15, 1325-1332.
- Anitha, M., Joseph, I., Ding, X., Torre, E.R., Sawchuk, M.A., Mwangi, S., Hochman, S., Sitaraman, S.V., Anania, F., and Srinivasan, S. (2008). Characterization of fetal and postnatal enteric neuronal cell lines with improvement in intestinal neural function. *Gastroenterology* 134, 1424-1435.
- Antiabong, J.F., Ngoepe, M.G., and Abechi, A.S. (2016). Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: potential applications in low-income veterinary laboratories. *Vet World* 9, 935-939.
- Appel, E., Weissmann, S., Salzberg, Y., Orlovsky, K., Negreanu, V., Tsoory, M., Raanan, C., Feldmesser, E., Bernstein, Y., Wolstein, O., *et al.* (2016). An ensemble of regulatory elements controls Runx3 spatiotemporal expression in subsets of dorsal root ganglia proprioceptive neurons. *Genes Dev* 30, 2607-2622.
- Artero-Morales, M., González-Rodríguez, S., and Ferrer-Montiel, A. (2018). TRP Channels as Potential Targets for Sex-Related Differences in Migraine Pain. *Frontiers in Molecular Biosciences* 5.
- Auerbach, W., Dunmore, J.H., Fairchild-Huntress, V., Fang, Q., Auerbach, A.B., Huszar, D., and Joyner, A.L. (2000). Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-derived mouse embryonic stem cell lines. *Biotechniques* 29, 1024-1028, 1030, 1032.
- Bae, S., Park, J., and Kim, J.S. (2014). Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30, 1473-1475.
- Bandell, M., Macpherson, L.J., and Patapoutian, A. (2007). From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr Opin Neurobiol* 17, 490-497.
- Baron, R. (2009). Neuropathic pain: a clinical perspective. *Handb Exp Pharmacol*, 3-30.
- Barton, N.J., McQueen, D.S., Thomson, D., Gauldie, S.D., Wilson, A.W., Salter, D.M., and Chessell, I.P. (2006). Attenuation of experimental arthritis in TRPV1R knockout mice. *Exp Mol Pathol* 81, 166-170.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267-284.
- Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269-1282.

BIBLIOGRAFÍA

Bautista, D.M., Siemens, J., Glazer, J.M., Tsuruda, P.R., Basbaum, A.I., Stucky, C.L., Jordt, S.E., and Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* *448*, 204-208.

Benarroch, E.E. (2008). TRP channels: functions and involvement in neurologic disease. *Neurology* *70*, 648-652.

Bessou, P., and Perl, E.R. (1969). Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol* *32*, 1025-1043.

Bevan, S., Quallo, T., and Andersson, D.A. (2014). TRPV1. In *Handbook of experimental pharmacology*, B. Nilius, and V. Flockerzi, eds. (Heidelberg, Berlin: Springer), pp. 207-245.

Bhattacharya, A., Lehto, S.G., and Gavva, N.R. (2010). TRPV1 and Inflammatory Pain. In *Vanilloid Receptor TRPV1 in Drug Discovery*, A. Gomtsyan, and C.R. Faltynek, eds. (New Jersey, EEUU: John Wiley & Sons Inc. Publisher).

Bhattacharjee, A., Liao, Z., and Smith, P.G. (2014). Trophic factor and hormonal regulation of neurite outgrowth in sensory neuron-like 50B11 cells. *Neurosci Lett* *558*, 120-125.

Biedler, J.L., Helson, L., and Spengler, B.A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* *33*, 2643-2652.

Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., and Freedman, L.S. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* *38*, 3751-3757.

Blanchard, J.W., Eade, K.T., Szucs, A., Lo Sardo, V., Tsunemoto, R.K., Williams, D., Sanna, P.P., and Baldwin, K.K. (2015). Selective conversion of fibroblasts into peripheral sensory neurons. *Nat Neurosci* *18*, 25-35.

Blyth, K., Cameron, E.R., and Neil, J.C. (2005). The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer* *5*, 376-387.

Boisvert, E.M., Engle, S.J., Hallowell, S.E., Liu, P., Wang, Z.W., and Li, X.J. (2015). The specification and maturation of nociceptive neurons from human embryonic stem cells. *Sci Rep* *5*, 16821.

Bolcskei, K., Helyes, Z., Szabo, A., Sandor, K., Elekes, K., Nemeth, J., Almasi, R., Pinter, E., Petho, G., and Szolcsanyi, J. (2005). Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* *117*, 368-376.

Bollag, R.J., Waldman, A.S., and Liskay, R.M. (1989). Homologous recombination in mammalian cells. *Annu Rev Genet* *23*, 199-225.

Bonica, J.J. (1991). History of pain concepts and pain therapy. *Mt Sinai J Med* *58*, 191-202.

Bouabe, H., and Okkenhaug, K. (2013). Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol Biol* *1064*, 315-336.

Bouron, A., Becker, C., and Porzig, H. (1999). Functional expression of voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels during neuronal differentiation of PC12 cells with nerve growth factor or forskolin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* *359*, 370-377.

Bradley, A., Hasty, P., Davis, A., and Ramirez-Solis, R. (1992). Modifying the mouse: design and desire. *Biotechnology (N Y)* *10*, 534-539.

Bradshaw, R.A., Mobley, W., and Rush, R.A. (2017). Nerve growth factor and related substances: a brief history and an introduction to the International NGF Meeting Series. *Int J Mol Sci* *18*.

Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., and Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* *10*, 287-333.

Brewer, G.J., and Torricelli, J.R. (2007). Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nat Protoc* *2*, 1490-1498.

Brooks, A.K., and Gaj, T. (2018). Innovations in CRISPR technology. *Curr Opin Biotechnol* *52*, 95-101.

- Burgess, P.R., and Perl, E.R. (1967). Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J Physiol* *190*, 541-562.
- Burnstock, G. (2000). P2X receptors in sensory neurones. *Br J Anaesth* *84*, 476-488.
- Caillaud, T., Opstal, W.Y., Scarceriaux, V., Billardon, C., and Rostene, W. (1995). Treatment of PC12 cells by nerve growth factor, dexamethasone, and forskolin. Effects on cell morphology and expression of neurotensin and tyrosine hydroxylase. *Mol Neurobiol* *10*, 105-114.
- Cain, D.M., Khasabov, S.G., and Simone, D.A. (2001). Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *J Neurophysiol* *85*, 1561-1574.
- Calabrese, E.J. (2008). Enhancing and regulating neurite outgrowth. *Crit Rev Toxicol* *38*, 391-418.
- Camprubi-Robles, M., Planells-Cases, R., and Ferrer-Montiel, A. (2009). Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. *FASEB J* *23*, 3722-3733.
- Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., and Julius, D. (2013). TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* *504*, 113-118.
- Caterina, M., Park, U., and Oh, U. (2006). TRPV1: a polymodal sensor in the nociceptor terminal. *Nociceptive Membrane* *57*, 113-+.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* *288*, 306-313.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* *389*, 816-824.
- Cavanaugh, D.J., Chesler, A.T., Braz, J.M., Shah, N.M., Julius, D., and Basbaum, A.I. (2011a). Restriction of transient receptor potential vanilloid-1 to the peptidergic subset of primary afferent neurons follows its developmental downregulation in nonpeptidergic neurons. *J Neurosci* *31*, 10119-10127.
- Cavanaugh, D.J., Chesler, A.T., Jackson, A.C., Sigal, Y.M., Yamanaka, H., Grant, R., O'Donnell, D., Nicoll, R.A., Shah, N.M., Julius, D., *et al.* (2011b). Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci* *31*, 5067-5077.
- Ceredig, R.A., and Massotte, D. (2014). Fluorescent knock-in mice to decipher the physiopathological role of G protein-coupled receptors. *Front Pharmacol* *5*, 289.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* *27*, 275-280.
- Chambers, S.M., Qi, Y., Mica, Y., Lee, G., Zhang, X.J., Niu, L., Bilsland, J., Cao, L., Stevens, E., Whiting, P., *et al.* (2012). Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nat Biotechnol* *30*, 715-720.
- Chen, C.C., Akopian, A.N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., and Wood, J.N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* *377*, 428-431.
- Chen, C.L., Broom, D.C., Liu, Y., de Nooij, J.C., Li, Z., Cen, C., Samad, O.A., Jessell, T.M., Woolf, C.J., and Ma, Q. (2006). Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron* *49*, 365-377.
- Chen, J. (2011). History of pain theories. *Neurosci Bull* *27*, 343-350.
- Chen, J., Han, J.-S., Zhao, Z.-Q., Wei, F., Hsieh, J.-C., Bao, L., Chen, A.C.N., Dai, Y., Fan, B.-F., Gu, J.-G., *et al.* (2013). Pain. In *Neuroscience in the 21st Century*, D.W. Pfaff, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 965-1023.
- Chen, W., Mi, R., Haughey, N., Oz, M., and Hoke, A. (2007). Immortalization and characterization of a nociceptive dorsal root ganglion sensory neuronal line. *J Peripher Nerv Syst* *12*, 121-130.

Cheng, L.S., Graham, H.K., Pan, W.H., Nagy, N., Carreon-Rodriguez, A., Goldstein, A.M., and Hotta, R. (2016). Optimizing neurogenic potential of enteric neurospheres for treatment of neurointestinal diseases. *J Surg Res* 206, 451-459.

Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T., and Hidaka, H. (1990). Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 265, 5267-5272.

Ciarlo, M.G., and Ferrer-Montiel, A. (2017). Lipids as central modulators of sensory TRP channels. *Biochim Biophys Acta* 1859, 1615-1628.

Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524.

Colburn, R.W., Lubin, M.L., Stone, D.J., Jr., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M.R., Brandt, M.R., Liu, Y., Flores, C.M., and Qin, N. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54, 379-386.

Cong, L., and Zhang, F. (2015). Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods Mol Biol* 1239, 197-217.

Cook, S.P., Vulchanova, L., Hargreaves, K.M., Elde, R., and McCleskey, E.W. (1997). Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature* 387, 505-508.

Cosens, D.J., and Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224, 285-287.

Costantini, L.C., and Isacson, O. (2000). Immunophilin ligands and GDNF enhance neurite branching or elongation from developing dopamine neurons in culture. *Exp Neurol* 164, 60-70.

Crowley, C., Spencer, S.D., Nishimura, M.C., Chen, K.S., Pitts-Meek, S., Armanini, M.P., Ling, L.H., McMahon, S.B., Shelton, D.L., Levinson, A.D., *et al.* (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76, 1001-1011.

Cui, Y., Xu, J., Cheng, M., Liao, X., and Peng, S. (2018). Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools. *Interdiscip Sci* 10, 455-465.

Dai, Y. (2016). TRPs and pain. *Semin Immunopathol* 38, 277-291.

Darenfed, H., Dayanandan, B., Zhang, T., Hsieh, S.H., Fournier, A.E., and Mandato, C.A. (2007). Molecular characterization of the effects of Y-27632. *Cell Motil Cytoskeleton* 64, 97-109.

Das, V. (2015). An Introduction to Pain Pathways and Pain "Targets". In *Molecular and Cell Biology of Pain*, T.J. Price, and G. Dussor, eds. (San Diego: Elsevier Academic Press Inc), pp. 1-30.

Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., *et al.* (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183-187.

Dekker, L.V., Daniels, Z., Hick, C., Elsegood, K., Bowden, S., Szeszak, T., Burley, J.R., Southan, A., Cronk, D., and James, I.F. (2005). Analysis of human Nav1.8 expressed in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol* 528, 52-58.

Dhaka, A., Earley, T.J., Watson, J., and Patapoutian, A. (2008). Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J Neurosci* 28, 566-575.

Diez-Roux, G., Banfi, S., Sultan, M., Geffers, L., Anand, S., Rozado, D., Magen, A., Canidio, E., Pagani, M., Peluso, I., *et al.* (2011). A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol* 9, e1000582.

Ding, Y., Cesare, P., Drew, L., Nikitaki, D., and Wood, J.N. (2000). ATP, P2X receptors and pain pathways. *J Auton Nerv Syst* 81, 289-294.

- Dixon, B.P., Henry, J., Siroky, B.J., Chu, A., Groen, P.A., and Bissler, J.J. (2011). Cell cycle control and DNA damage response of conditionally immortalized urothelial cells. *PLoS One* *6*, e16595.
- Doench, J.G., Hartenian, E., Graham, D.B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B.L., Xavier, R.J., and Root, D.E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol* *32*, 1262-1267.
- Doetschman, T. (2009). Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. *Methods Mol Biol* *530*, 423-433.
- Donaldson, L.F., and Beazley-Long, N. (2016). Alternative RNA splicing: contribution to pain and potential therapeutic strategy. *Drug Discov Today* *21*, 1787-1798.
- Dong, X., Han, S., Zylka, M.J., Simon, M.I., and Anderson, D.J. (2001). A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* *106*, 619-632.
- Doran, C., Chetrit, J., Holley, M.C., Grundy, D., and Nassar, M.A. (2015). Mouse DRG cell line with properties of nociceptors. *PLoS One* *10*, e0128670.
- Dorfman, R., Tsui, H., Salter, M.W., and Dosch, H.M. (2010). TRPV1 Genetics. In *Vanilloid Receptor TRPV1 in Drug Discovery* A. Gomtsyan, and C.R. Faltynek, eds. (New Jersey, EEUU: John Wiley & Sons Inc., Publications), pp. 134 - 150.
- Doyle, A., McGarry, M.P., Lee, N.A., and Lee, J.J. (2012). The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res* *21*, 327-349.
- Dray, A. (1992). Mechanism of action of capsaicin-like molecules on sensory neurons. *Life Sci* *51*, 1759-1765.
- Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* *120*, 3760-3772.
- Dunn, P.M., Zhong, Y., and Burnstock, G. (2001). P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol* *65*, 107-134.
- Dussor, G., Yan, J., Xie, J.Y., Ossipov, M.H., Dodick, D.W., and Porreca, F. (2014). Targeting TRP channels for novel migraine therapeutics. *ACS Chem Neurosci* *5*, 1085-1096.
- Dykes, I.M., Tempest, L., Lee, S.I., and Turner, E.E. (2011). Brn3a and Islet1 act epistatically to regulate the gene expression program of sensory differentiation. *J Neurosci* *31*, 9789-9799.
- Earley, S., Reading, S., and Brayden, J.E. (2007). Functional Significance of Transient Receptor Potential Channels in Vascular Function. In *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, W.B. Liedtke, and S. Heller, eds. (Boca Raton (FL)).
- Eberhardt, E., Havlicek, S., Schmidt, D., Link, A.S., Neacsu, C., Kohl, Z., Hampl, M., Kist, A.M., Klingner, A., Nau, C., *et al.* (2015). Pattern of functional TTX-resistant sodium channels reveals a developmental stage of human iPSC- and ESC-derived nociceptors. *Stem Cell Rep* *5*, 305-313.
- Eid, S.R. (2011). Therapeutic targeting of TRP channels- the TR(i)P to pain relief. *Curr Top Med Chem* *11*, 2118-2130.
- Elitt, C.M., McIlwrath, S.L., Lawson, J.J., Malin, S.A., Molliver, D.C., Cornuet, P.K., Koerber, H.R., Davis, B.M., and Albers, K.M. (2006). Artemin overexpression in skin enhances expression of TRPV1 and TRPA1 in cutaneous sensory neurons and leads to behavioral sensitivity to heat and cold. *J Neurosci* *26*, 8578-8587.
- Emery, E.C., Luiz, A.P., Sikandar, S., Magnusdottir, R., Dong, X., and Wood, J.N. (2016). In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP. *Sci Adv* *2*, e1600990.
- Eng, S.R., Dykes, I.M., Lanier, J., Fedtsova, N., and Turner, E.E. (2007). POU-domain factor Brn3a regulates both distinct and common programs of gene expression in the spinal and trigeminal sensory ganglia. *Neural Dev* *2*, 3.

BIBLIOGRAFÍA

Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Matifas, A., Filliol, D., Vonesch, J.L., Koch, M., Kessler, P., Hentsch, D., Birling, M.C., *et al.* (2015). A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct Funct* *220*, 677-702.

Feng, W., Liu, H.K., and Kawauchi, D. (2018). CRISPR-engineered genome editing for the next generation neurological disease modeling. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* *81*, 459-467.

Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., Devesa, I., Gonzalez-Ros, J.M., and Ferrer-Montiel, A. (2011). New strategies to develop novel pain therapies: addressing thermoreceptors from different points of view. *Pharmaceuticals (Basel)* *5*, 16-48.

Ferrante, F.M., and VadeBoncouer, T.R. (1993). *Postoperative Pain Management* (New York: Churchill Livingstone).

Ferrer-Montiel, A., Fernandez-Carvajal, A., Planells-Cases, R., Fernandez-Ballester, G., Gonzalez-Ros, J.M., Messeguer, A., and Gonzalez-Muniz, R. (2012). Advances in modulating thermosensory TRP channels. *Expert Opin Ther Pat* *22*, 999-1017.

Flockerzi, V., and Nilius, B. (2014). TRPs: truly remarkable proteins. *Handb Exp Pharmacol* *222*, 1-12.

Franck, M.C., Stenqvist, A., Li, L., Hao, J., Usoskin, D., Xu, X., Wiesenfeld-Hallin, Z., and Ernfors, P. (2011). Essential role of Ret for defining non-peptidergic nociceptor phenotypes and functions in the adult mouse. *Eur J Neurosci* *33*, 1385-1400.

Francois, A., Schuetter, N., Laffray, S., Sanguesa, J., Pizzoccaro, A., Dubel, S., Mantilleri, A., Nargeot, J., Noel, J., Wood, J.N., *et al.* (2015). The low-threshold calcium channel Cav3.2 determines low-threshold mechanoreceptor function. *Cell Rep*.

Freichel, M., Krieps, U., Vogt, D., Mannebach, S., and Weissgerber, P. (2011). Strategies and Protocols to Generate Mouse Models with Targeted Mutations to Analyze TRP Channel Functions. In *TRP Channels*, M.X. Zhu, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis).

Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M., and Joung, J.K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* *32*, 279-284.

Fujita, K., Lazarovici, P., and Guroff, G. (1989). Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *Environ Health Perspect* *80*, 127-142.

Gagnon, J.A., Valen, E., Thyme, S.B., Huang, P., Akhmetova, L., Pauli, A., Montague, T.G., Zimmerman, S., Richter, C., and Schier, A.F. (2014). Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS One* *9*, e98186.

Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F., 3rd (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* *31*, 397-405.

Garami, A., Pakai, E., Oliveira, D.L., Steiner, A.A., Wanner, S.P., Almeida, M.C., Lesnikov, V.A., Gavva, N.R., and Romanovsky, A.A. (2011). Thermoregulatory phenotype of the Trpv1 knockout mouse: thermoeffector dysbalance with hyperkinesis. *J Neurosci* *31*, 1721-1733.

Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sanchez, E., Fernandez-Ballester, G., and Ferrer-Montiel, A. (2004). Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* *24*, 5307-5314.

Garcia-Sanz, N., Valente, P., Gomis, A., Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., Viana, F., Belmonte, C., and Ferrer-Montiel, A. (2007). A role of the transient receptor potential domain of vanilloid receptor I in channel gating. *J Neurosci* *27*, 11641-11650.

Gascon, E., and Moqrich, A. (2010). Heterogeneity in primary nociceptive neurons: from molecules to pathology. *Arch Pharm Res* *33*, 1489-1507.

Gaskin, D.J., and Richard, P. (2012). The economic costs of pain in the United States. *J Pain* *13*, 715-724.

- Gavva, N.R. (2008). Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends Pharmacol Sci* 29, 550-557.
- Gendron, L., Mittal, N., Beaudry, H., and Walwyn, W. (2015). Recent advances on the delta opioid receptor: from trafficking to function. *Br J Pharmacol* 172, 403-419.
- Geuna, S., Raimondo, S., Fregnan, F., Haastert-Talini, K., and Grothe, C. (2016). In vitro models for peripheral nerve regeneration. *Eur J Neurosci* 43, 287-296.
- Ghilardi, J.R., Rohrich, H., Lindsay, T.H., Sevcik, M.A., Schwei, M.J., Kubota, K., Halvorson, K.G., Poblete, J., Chaplan, S.R., Dubin, A.E., *et al.* (2005). Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J Neurosci* 25, 3126-3131.
- Gibson, H.E., Edwards, J.G., Page, R.S., Van Hook, M.J., and Kauer, J.A. (2008). TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron* 57, 746-759.
- Gordon, J., Amini, S., and White, M.K. (2013). General overview of neuronal cell culture. *Methods Mol Biol* 1078, 1-8.
- Gordon, J.W., Pravtcheva, D., Poorman, P.A., Moses, M.J., Brock, W.A., and Ruddle, F.H. (1989). Association of foreign DNA sequence with male sterility and translocation in a line of transgenic mice. *Somat Cell Mol Genet* 15, 569-578.
- Goswami, S.C., Mishra, S.K., Maric, D., Kaszas, K., Gonnella, G.L., Clokie, S.J., Kominsky, H.D., Gross, J.R., Keller, J.M., Mannes, A.J., *et al.* (2014). Molecular signatures of mouse TRPV1-lineage neurons revealed by RNA-Seq transcriptome analysis. *J Pain* 15, 1338-1359.
- Gottlieb, D.I. (2002). Large-scale sources of neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 25, 381-407.
- Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, 2424-2428.
- Gysbers, J.W., and Rathbone, M.P. (1996). Neurite outgrowth in PC12 cells is enhanced by guanosine through both cAMP-dependent and -independent mechanisms. *Neurosci Lett* 220, 175-178.
- Hadjab, S., Franck, M.C., Wang, Y., Sterzenbach, U., Sharma, A., Ernfors, P., and Lallemand, F. (2013). A local source of FGF initiates development of the unmyelinated lineage of sensory neurons. *J Neurosci* 33, 17656-17666.
- Hansen, T., Rehfeld, J.F., and Nielsen, F.C. (2003). KCl potentiates forskolin-induced PC12 cell neurite outgrowth via protein kinase A and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Neurosci Lett* 347, 57-61.
- Harms, D.W., Quadros, R.M., Seruggia, D., Ohtsuka, M., Takahashi, G., Montoliu, L., and Gurusurthy, C.B. (2014). Mouse genome editing using the CRISPR/Cas system. *Curr Protoc Hum Genet* 83, 15 17 11-27.
- Harrill, J.A., and Mundy, W.R. (2011). Quantitative assessment of neurite outgrowth in PC12 cells. *Methods Mol Biol* 758, 331-348.
- Hawkins, E.G., Dewey, W.L., Anitha, M., Srinivasan, S., Grider, J.R., and Akbarali, H.I. (2013). Electrophysiological characteristics of enteric neurons isolated from the Immortomouse. *Dig Dis Sci* 58, 1516-1527.
- Hay, E.A., Knowles, C., Kolb, A., and MacKenzie, A. (2017). Using the CRISPR/Cas9 system to understand neuropeptide biology and regulation. *Neuropeptides* 64, 19-25.
- He, X., Tan, C., Wang, F., Wang, Y., Zhou, R., Cui, D., You, W., Zhao, H., Ren, J., and Feng, B. (2016). Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair. *Nucleic Acids Res* 44, e85.
- Hjerling-Leffler, J., Alqatari, M., Ernfors, P., and Koltzenburg, M. (2007). Emergence of functional sensory subtypes as defined by transient receptor potential channel expression. *J Neurosci* 27, 2435-2443.

BIBLIOGRAFÍA

Ho, P.L., and Raw, I. (1992). Cyclic AMP potentiates bFGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Cell Physiol* *150*, 647-656.

Hodgdon, K.E., Hingtgen, C.M., and Nicol, G.D. (2012). Dorsal root ganglia isolated from Nf1+/- mice exhibit increased levels of mRNA expression of voltage-dependent sodium channels. *Neuroscience* *206*, 237-244.

Holley, M.C., Nishida, Y., and Grix, N. (1997). Conditional immortalization of hair cells from the inner ear. *Int J Dev Neurosci* *15*, 541-552.

Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* *157*, 1262-1278.

Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., *et al.* (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* *31*, 827-832.

Hugnot, J.P., Pilcher, H., Rashid-Doubell, F., Sinden, J., and Price, J. (2001). Regulation of glial differentiation of MHP36 neural multipotent cell line. *Neuroreport* *12*, 2237-2241.

Hui, C.W., Zhang, Y., and Herrup, K. (2016). Non-Neuronal Cells Are Required to Mediate the Effects of Neuroinflammation: Results from a Neuron-Enriched Culture System. *PLoS One* *11*, e0147134.

Hutson, M.R., Keyte, A.L., Hernandez-Morales, M., Gibbs, E., Kupchinsky, Z.A., Argyridis, I., Erwin, K.N., Pegram, K., Kneifel, M., Rosenberg, P.B., *et al.* (2017). Temperature-activated ion channels in neural crest cells confer maternal fever-associated birth defects. *Sci Signal* *10*.

Indo, Y. (2012). Nerve growth factor and the physiology of pain: lessons from congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Clin Genet* *82*, 341-350.

Inoue, K., Shiga, T., and Ito, Y. (2008). Runx transcription factors in neuronal development. *Neural Dev* *3*, 20.

Irobi, J., Almeida-Souza, L., Asselbergh, B., De Winter, V., Goethals, S., Dierick, I., Krishnan, J., Timmermans, J.P., Robberecht, W., De Jonghe, P., *et al.* (2010). Mutant HSPB8 causes motor neuron-specific neurite degeneration. *Hum Mol Genet* *19*, 3254-3265.

Irwin, M.H., Pogozelski, W.K., and Pinkert, C.A. (2014). PCR Optimization for Detection of Transgene Integration. In *Transgenic Animal Technology*, C.A. Pinkert, ed. (London: Elsevier), pp. 533-541.

Jamal, M., Khan, F.A., Da, L., Habib, Z., Dai, J., and Cao, G. (2016). Keeping CRISPR/Cas on-target. *Curr Issues Mol Biol* *20*, 1-12.

Jardin, I., Lopez, J.J., Diez, R., Sanchez-Collado, J., Cantonero, C., Albarran, L., Woodard, G.E., Redondo, P.C., Salido, G.M., Smani, T., *et al.* (2017). TRPs in pain sensation. *Front Physiol* *8*, 392.

Jat, P.S., Noble, M.D., Ataliotis, P., Tanaka, Y., Yannoutsos, N., Larsen, L., and Kioussis, D. (1991). Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 5096-5100.

Jeon, B.T., Jeong, E.A., Park, S.Y., Son, H., Shin, H.J., Lee, D.H., Kim, H.J., Kang, S.S., Cho, G.J., Choi, W.S., *et al.* (2013). The Rho-kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 protects against excitotoxicity-induced neuronal death in vivo and in vitro. *Neurotox Res* *23*, 238-248.

Jia, X.F., Ye, F., Wang, Y.B., and Feng, D.X. (2016). ROCK inhibition enhances neurite outgrowth in neural stem cells by upregulating YAP expression in vitro. *Neural Regen Res* *11*, 983-987.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* *337*, 816-821.

Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* *29*, 355-384.

- Kaneko, Y., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br J Pharmacol* *171*, 2474-2507.
- Keele, K.D. (1957). *Anatomies of Pain* (Oxford: Blackwell Scientific Publications).
- Kerr, N., Holmes, F.E., Hobson, S.A., Vanderplank, P., Leard, A., Balthasar, N., and Wynick, D. (2015). The generation of knock-in mice expressing fluorescently tagged galanin receptors 1 and 2. *Mol Cell Neurosci* *68*, 258-271.
- Khalil, M., Alliger, K., Weidinger, C., Yerinde, C., Wirtz, S., Becker, C., and Engel, M.A. (2018). Functional role of Transient Receptor Potential channels in immune cells and epithelia. *Front Immunol* *9*, 174.
- Kiani, S., Chavez, A., Tuttle, M., Hall, R.N., Chari, R., Ter-Ovanesyan, D., Qian, J., Pruitt, B.W., Beal, J., Vora, S., *et al.* (2015). Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression. *Nat Methods* *12*, 1051-1054.
- Kile, B.T., Hentges, K.E., Clark, A.T., Nakamura, H., Salinger, A.P., Liu, B., Box, N., Stockton, D.W., Johnson, R.L., Behringer, R.R., *et al.* (2003). Functional genetic analysis of mouse chromosome 11. *Nature* *425*, 81-86.
- Kim, H., Neubert, J.K., San Miguel, A., Xu, K., Krishnaraju, R.K., Iadarola, M.J., Goldman, D., and Dionne, R.A. (2004). Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. *Pain* *109*, 488-496.
- Kim, J., Lo, L., Dormand, E., and Anderson, D.J. (2003). SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* *38*, 17-31.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J., and Kim, J.S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res* *24*, 1012-1019.
- Kim, Y.S., Anderson, M., Park, K., Zheng, Q., Agarwal, A., Gong, C., Sajjilafu, Young, L., He, S., LaVinka, P.C., *et al.* (2016). Coupled Activation of Primary Sensory Neurons Contributes to Chronic Pain. *Neuron* *91*, 1085-1096.
- Kobayashi, A., Senzaki, K., Ozaki, S., Yoshikawa, M., and Shiga, T. (2012). Runx1 promotes neuronal differentiation in dorsal root ganglion. *Mol Cell Neurosci* *49*, 23-31.
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with Trk receptors. *J Comp Neurol* *493*, 596-606.
- Kolli, N., Lu, M., Maiti, P., Rossignol, J., and Dunbar, G.L. (2018). Application of the gene editing tool, CRISPR-Cas9, for treating neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* *112*, 187-196.
- Kosir, R., Acimovic, J., Golcnik, M., Perse, M., Majdic, G., Fink, M., and Rozman, D. (2010). Determination of reference genes for circadian studies in different tissues and mouse strains. *BMC Mol Biol* *11*, 60.
- Kramer, I., Sigrist, M., de Nooij, J.C., Taniuchi, I., Jessell, T.M., and Arber, S. (2006). A role for Runx transcription factor signaling in dorsal root ganglion sensory neuron diversification. *Neuron* *49*, 379-393.
- Kunert-Keil, C., Bising, F., Kruger, J., and Brinkmeier, H. (2006). Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* *7*, 159.
- Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.S., Woolf, C.J., and Corey, D.P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* *50*, 277-289.
- Labun, K., Montague, T.G., Gagnon, J.A., Thyme, S.B., and Valen, E. (2016). CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res* *44*, W272-276.

Lackner, D.H., Carre, A., Guzzardo, P.M., Banning, C., Mangena, R., Henley, T., Oberndorfer, S., Gapp, B.V., Nijman, S.M., Brummelkamp, T.R., *et al.* (2015). A generic strategy for CRISPR-Cas9-mediated gene tagging. *Nat Commun* *6*, 10237.

Lacroix-Fralish, M.L., Ledoux, J.B., and Mogil, J.S. (2007). The Pain Genes Database: an interactive web browser of pain-related transgenic knockout studies. *Pain* *131*, 3 e1-4.

Lallemend, F., and Ernfors, P. (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci* *35*, 373-381.

Lam, A.J., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J.D., Cranfill, P.J., Baird, M.A., McKeown, M.R., Wiedenmann, J., Davidson, M.W., Schnitzer, M.J., *et al.* (2012). Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat Methods* *9*, 1005-1012.

Lam, P.M., Hainsworth, A.H., Smith, G.D., Owen, D.E., Davies, J., and Lambert, D.G. (2007). Activation of recombinant human TRPV1 receptors expressed in SH-SY5Y human neuroblastoma cells increases [Ca²⁺]_i, initiates neurotransmitter release and promotes delayed cell death. *J Neurochem* *102*, 801-811.

Lamoreux, M.L., Delmas, V., Larue, L., and Bennett, D.C. (2010). Novel Mouse Pigmentary Mutants Generated by Genetic Manipulation. In *The Colors of Mice*, M.L. Lamoreux, V. Delmas, L. Larue, and D.C. Bennett, eds. (Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Ltd. Publications), pp. 209-231.

Lariviere, W.R., Chesler, E.J., and Mogil, J.S. (2001). Transgenic studies of pain and analgesia: mutation or background genotype? *J Pharmacol Exp Ther* *297*, 467-473.

Latorre, R., Zaelzer, C., and Brauchi, S. (2009). Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Q Rev Biophys* *42*, 201-246.

Ledford, H. (2015). CRISPR, the disruptor. *Nature* *522*, 20-24.

Lee, C.M., Davis, T.H., and Bao, G. (2018). Examination of CRISPR/Cas9 design tools and the effect of target site accessibility on Cas9 activity. *Exp Physiol* *103*, 456-460.

Levanon, D., and Groner, Y. (2004). Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* *23*, 4211-4219.

Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* *237*, 1154-1162.

Lewin, G.R., and Moshourab, R. (2004). Mechanosensation and pain. *J Neurobiol* *61*, 30-44.

Li, C.L., Li, K.C., Wu, D., Chen, Y., Luo, H., Zhao, J.R., Wang, S.S., Sun, M.M., Lu, Y.J., Zhong, Y.Q., *et al.* (2016). Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. *Cell Res* *26*, 83-102.

Li, K., Wang, G., Andersen, T., Zhou, P., and Pu, W.T. (2014). Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system. *PLoS One* *9*, e105779.

Liao, M., Cao, E., Julius, D., and Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* *504*, 107-112.

Light, A.R., Huguen, R.W., Zhang, J., Rainier, J., Liu, Z., and Lee, J. (2008). Dorsal root ganglion neurons innervating skeletal muscle respond to physiological combinations of protons, ATP, and lactate mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *J Neurophysiol* *100*, 1184-1201.

Linder, C.C. (2001). The influence of genetic background on spontaneous and genetically engineered mouse models of complex diseases. *Lab Anim (NY)* *30*, 34-39.

Liu, P., Zhang, H., McLellan, A., Vogel, H., and Bradley, A. (1998). Embryonic lethality and tumorigenesis caused by segmental aneuploidy on mouse chromosome 11. *Genetics* *150*, 1155-1168.

Liu, Y., and Ma, Q. (2011). Generation of somatic sensory neuron diversity and implications on sensory coding. *Curr Opin Neurobiol* *21*, 52-60.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* *25*, 402-408.

- Lotsch, J., and Geisslinger, G. (2007). Current evidence for a modulation of nociception by human genetic polymorphisms. *Pain* *132*, 18-22.
- Luo, W., Wickramasinghe, S.R., Savitt, J.M., Griffin, J.W., Dawson, T.M., and Ginty, D.D. (2007). A hierarchical NGF signaling cascade controls Ret-dependent and Ret-independent events during development of nonpeptidergic DRG neurons. *Neuron* *54*, 739-754.
- Luo, Z.D. (2012). Advancements in pain research. *Methods Mol Biol* *851*, 1-8.
- Lynn, B. (1990). Capsaicin: actions on nociceptive C-fibres and therapeutic potential. *Pain* *41*, 61-69.
- Ma, Q., Fode, C., Guillemot, F., and Anderson, D.J. (1999). Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev* *13*, 1717-1728.
- Mahon, K.A., Overbeek, P.A., and Westphal, H. (1988). Prenatal lethality in a transgenic mouse line is the result of a chromosomal translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *85*, 1165-1168.
- Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., *et al.* (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* *9*, 467-477.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S.A., Saunders, S.J., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Haft, D.H., *et al.* (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* *13*, 722-736.
- Malin, S.A., Davis, B.M., and Molliver, D.C. (2007). Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc* *2*, 152-160.
- Mann, D.A., Doherty, P., and Walsh, F.S. (1989). Increased intracellular cyclic AMP differentially modulates nerve growth factor induction of three neuronal recognition molecules involved in neurite outgrowth. *J Neurochem* *53*, 1581-1588.
- Marmigere, F., and Carroll, P. (2014). Neurotrophin signalling and transcription programmes interactions in the development of somatosensory neurons. *Handb Exp Pharmacol* *220*, 329-353.
- Marmigere, F., and Ernfors, P. (2007). Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat Rev Neurosci* *8*, 114-127.
- Marmigere, F., Montelius, A., Wegner, M., Groner, Y., Reichardt, L.F., and Ernfors, P. (2006). The Runx1/AML1 transcription factor selectively regulates development and survival of TrkA nociceptive sensory neurons. *Nat Neurosci* *9*, 180-187.
- Maruyama, T., Dougan, S.K., Truttmann, M.C., Bilate, A.M., Ingram, J.R., and Ploegh, H.L. (2015). Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol* *33*, 538-542.
- Matsui, S., Sait, S., Jones, C.A., Nowak, N., and Gross, K.W. (2002). Rapid localization of transgenes in mouse chromosomes with a combined Spectral Karyotyping/FISH technique. *Mamm Genome* *13*, 680-685.
- Matsukuma, S., Kondo, M., Yoshihara, M., Matsuda, M., Utakoji, T., and Sutou, S. (1999). Mea2/Golga3 gene is disrupted in a line of transgenic mice with a reciprocal translocation between Chromosomes 5 and 19 and is responsible for a defective spermatogenesis in homozygotes. *Mamm Genome* *10*, 1-5.
- Matsuoka, H., Kazuno, Y., Horie, T., Homma, T., and Nemoto, Y. (1993). Effect of coexisting cells on the NGF-inducing neurite growth from PC12h-R. *Cytotechnology* *11*, 59-65.
- Matuszyk, J., Ziolo, E., Plawiak, D., and Strzadala, L. (2003). Early neuronal progenitor cell line expressing solely non-catalytic isoform of TrkC. *Biochem Biophys Res Commun* *309*, 91-95.

- Melli, G., and Hoke, A. (2009). Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. *Expert Opin Drug Discov* 4, 1035-1045.
- Merkle, F.T., Neuhausser, W.M., Santos, D., Valen, E., Gagnon, J.A., Maas, K., Sandoe, J., Schier, A.F., and Egan, K. (2015). Efficient CRISPR-Cas9-mediated generation of knockin human pluripotent stem cells lacking undesired mutations at the targeted locus. *Cell Rep* 11, 875-883.
- Merskey, H., and Bogduk, N. (1994). Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms, 2nd edn (Seattle (WA): IASP Press).
- Messequer, A., Planells-Cases, R., and Ferrer-Montiel, A. (2006). Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Curr Neuropharmacol* 4, 1-15.
- Mickle, A.D., Shepherd, A.J., and Mohapatra, D.P. (2015). Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog Mol Biol Transl Sci* 131, 73-118.
- Mickle, A.D., Shepherd, A.J., and Mohapatra, D.P. (2016). Nociceptive TRP Channels: Sensory Detectors and Transducers in Multiple Pain Pathologies. *Pharmaceuticals* (Basel) 9.
- Miller, M.W., Peter, A., Wharton, S.B., and Wyllie, A.H. (2003). Proliferation and death of conditionally immortalized neural cells from murine neocortex: p53 alters the ability of neuron-like cells to re-enter the cell cycle. *Brain Res* 965, 57-66.
- Minase, T., Ishima, T., Itoh, K., and Hashimoto, K. (2010). Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by the ROCK inhibitor Y-27632: a possible role of IP(3) receptors. *Eur J Pharmacol* 648, 67-73.
- Minke, B. (2010). The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet* 24, 216-233.
- Mishra, S.K., Tisel, S.M., Orestes, P., Bhangoo, S.K., and Hoon, M.A. (2011). TRPV1-lineage neurons are required for thermal sensation. *EMBO J* 30, 582-593.
- Miyawaki, A., Nagai, T., and Mizuno, H. (2005). Engineering fluorescent proteins. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 95, 1-15.
- Mizuseki, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Muguruma, K., Ikeya, M., Nishiyama, A., Arakawa, A., Suemori, H., Nakatsuji, N., Kawasaki, H., *et al.* (2003). Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5828-5833.
- Mogil, J.S., Davis, K.D., and Derbyshire, S.W. (2010). The necessity of animal models in pain research. *Pain* 151, 12-17.
- Mogil, J.S., and Grisel, J.E. (1998). Transgenic studies of pain. *Pain* 77, 107-128.
- Mogil, J.S., Wilson, S.G., Bon, K., Lee, S.E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J.O., Hain, H.S., Belknap, J.K., Hubert, L., *et al.* (1999). Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 80, 67-82.
- Mogil, J.S., Yu, L., and Basbaum, A.I. (2000). Pain genes?: natural variation and transgenic mutants. *Annu Rev Neurosci* 23, 777-811.
- Mojica, F.J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., and Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 155, 733-740.
- Molet, J., and Pohl, M. (2013). Gene-based approaches in pain research and exploration of new therapeutic targets and strategies. *Eur J Pharmacol* 716, 129-141.
- Molliver, D.C., Wright, D.E., Leitner, M.L., Parsadanian, A.S., Doster, K., Wen, D., Yan, Q., and Snider, W.D. (1997). IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* 19, 849-861.
- Montague, T.G., Cruz, J.M., Gagnon, J.A., Church, G.M., and Valen, E. (2014). CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res* 42, W401-407.

- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005, re3.
- Montell, C., and Rubin, G.M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313-1323.
- Moore, C., Gupta, R., Jordt, S.E., Chen, Y., and Liedtke, W.B. (2018). Regulation of pain and itch by TRP channels. *Neurosci Bull* 34, 120-142.
- Moran, M.M., and Szallasi, A. (2018). Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. *Br J Pharmacol* 175, 2185-2203.
- Morgan, J.E., Beauchamp, J.R., Pagel, C.N., Peckham, M., Ataliotis, P., Jat, P.S., Noble, M.D., Farmer, K., and Partridge, T.A. (1994). Myogenic cell lines derived from transgenic mice carrying a thermolabile T antigen: a model system for the derivation of tissue-specific and mutation-specific cell lines. *Dev Biol* 162, 486-498.
- Morgan, K., Sadofsky, L.R., Crow, C., and Morice, A.H. (2014). Human TRPM8 and TRPA1 pain channels, including a gene variant with increased sensitivity to agonists (TRPA1 R797T), exhibit differential regulation by SRC-tyrosine kinase inhibitor. *Biosci Rep* 34, 469-478.
- Murphy, M., Reid, K., Ford, M., Furness, J.B., and Bartlett, P.F. (1994). FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. *Development* 120, 3519-3528.
- Nagasawa, H., Miyamoto, M., and Fujimoto, M. (1973). [Reproductivity in inbred strains of mice and project for their efficient production (author's transl)]. *Jikken Dobutsu* 22, 119-126.
- Nahin, R.L. (2015). Estimates of pain prevalence and severity in adults: United States, 2012. *J Pain* 16, 769-780.
- Nakade, S., Tsubota, T., Sakane, Y., Kume, S., Sakamoto, N., Obara, M., Daimon, T., Sezutsu, H., Yamamoto, T., Sakuma, T., *et al.* (2014). Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun* 5, 5560.
- Nakagawa-Yagi, Y., Saito, Y., Takada, Y., and Nakamura, H. (1992). Suppressive effect of carbachol on forskolin-stimulated neurite outgrowth in human neuroblastoma NB-OK1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 45-54.
- Nayagam, B.A., and Minter, R.L. (2012). A comparison of in vitro treatments for directing stem cells toward a sensory neural fate. *Am J Otolaryngol* 33, 37-46.
- Newbern, J.M. (2015). Molecular Control of the Neural Crest and Peripheral Nervous System Development. In *Neural Crest and Placodes*, P.A. Trainor, ed. (San Diego: Elsevier Academic Press Inc), pp. 201-231.
- Nilius, B., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev* 66, 676-814.
- Novozhilova, E., Englund-Johansson, U., Kale, A., Jiao, Y., and Olivius, P. (2015). Effects of ROCK inhibitor Y27632 and EGFR inhibitor PD168393 on human neural precursors co-cultured with rat auditory brainstem explant. *Neuroscience* 287, 43-54.
- Overbeek, P.A. (2014). Factors Affecting Transgenic Animal Production. In *Transgenic Animal Technology*, C.A. Pinkert, ed. (London: Elsevier), pp. 71-107.
- Owen, D.E., and Egerton, J. (2012). Culture of dissociated sensory neurons from dorsal root ganglia of postnatal and adult rats. *Methods Mol Biol* 846, 179-187.
- Park, U., Vastani, N., Guan, Y., Raja, S.N., Koltzenburg, M., and Caterina, M.J. (2011). TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J Neurosci* 31, 11425-11436.
- Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., and Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4, 529-539.

BIBLIOGRAFÍA

Patapoutian, A., Tate, S., and Woolf, C.J. (2009). Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* *8*, 55-68.

Patel, T.D., Jackman, A., Rice, F.L., Kucera, J., and Snider, W.D. (2000). Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo. *Neuron* *25*, 345-357.

Pavan, W.J., and Raible, D.W. (2012). Specification of neural crest into sensory neuron and melanocyte lineages. *Dev Biol* *366*, 55-63.

Peng, R., Lin, G., and Li, J. (2016). Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J* *283*, 1218-1231.

Perl, E.R. (2007). Timeline - Ideas about pain, a historical view. *Nature Reviews Neuroscience* *8*, 71-80.

Platika, D., Baizer, L., and Fishman, M.C. (1985a). Sensory neurons "immortalized" by fusion with neuroblastoma cells. *Trans Assoc Am Physicians* *98*, 301-304.

Platika, D., Boulous, M.H., Baizer, L., and Fishman, M.C. (1985b). Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 3499-3503.

Platt, R.J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M.J., Swiech, L., Kempton, H.R., Dahlman, J.E., Parnas, O., Eisenhaure, T.M., Jovanovic, M., *et al.* (2014). CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* *159*, 440-455.

Pollock, J.D., Kremplin, M., and Rudy, B. (1990). Differential effects of NGF, FGF, EGF, cAMP, and Dexamethasone on neurite outgrowth and Sodium-channel expression in PC12 cells. *Journal of Neuroscience* *10*, 2626-2637.

Powell, S.K., Gregory, J., Akbarian, S., and Brennand, K.J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 to the study of brain development and neuropsychiatric disease. *Mol Cell Neurosci* *82*, 157-166.

Pravtcheva, D.D., and Wise, T.L. (1995). A postimplantation lethal mutation induced by transgene insertion on mouse chromosome 8. *Genomics* *30*, 529-544.

Racchetti, G., Lorusso, A., Schulte, C., Gavello, D., Carabelli, V., D'Alessandro, R., and Meldolesi, J. (2010). Rapid neurite outgrowth in neurosecretory cells and neurons is sustained by the exocytosis of a cytoplasmic organelle, the enlargeosome. *Journal of Cell Science* *123*, 165-170.

Raja, S.N., Meyer, R.A., and Campbell, J.N. (1988). Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology* *68*, 571-590.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., *et al.* (2013a). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* *154*, 1380-1389.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013b). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* *8*, 2281-2308.

Raymon, H.K., Thode, S., Zhou, J.Y., Friedman, G.C., Pardinas, Jr., Barrere, C., Johnson, R.M., and Sah, D.W.Y. (1999). Immortalized human dorsal root ganglion cells differentiate into neurons with nociceptive properties. *Journal of Neuroscience* *19*, 5420-5428.

Rey, R. (1995). *The History of Pain* (Cambridge: Cambridge, Mass.: Harvard University Press).

Riera, C.E., Huisling, M.O., Follett, P., Leblanc, M., Halloran, J., Van Andel, R., de Magalhaes Filho, C.D., Merkwirth, C., and Dillin, A. (2014). TRPV1 pain receptors regulate longevity and metabolism by neuropeptide signaling. *Cell* *157*, 1023-1036.

Salido, G.M., Sage, S.O., and Rosado, J.A. (2009). TRPC channels and store-operated Ca(2+) entry. *Biochim Biophys Acta* *1793*, 223-230.

Sanchez, J.F., Krause, J.E., and Cortright, D.N. (2001). The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* *107*, 373-381.

- Sander, J.D., and Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* *32*, 347-355.
- Sawatsubashi, S., Joko, Y., Fukumoto, S., Matsumoto, T., and Sugano, S.S. (2018). Development of versatile non-homologous end joining-based knock-in module for genome editing. *Sci Rep* *8*, 593.
- Schafer, K.H., and Mestres, P. (1999). The GDNF-induced neurite outgrowth and neuronal survival in dissociated myenteric plexus cultures of the rat small intestine decreases postnatally. *Exp Brain Res* *125*, 447-452.
- Schaible, H.G. (2015). Emerging concepts of pain therapy based on neuronal mechanisms. *Handb Exp Pharmacol* *227*, 1-14.
- Scherrer, G., Tryoen-Toth, P., Filliol, D., Matifas, A., Laustriat, D., Cao, Y.Q., Basbaum, A.I., Dierich, A., Vonesh, J.L., Gaveriaux-Ruff, C., *et al.* (2006). Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9691-9696.
- Schildkraut, E., Schwarz, D.S., Mabuchi, M.Y., Robb, G.B., and Hornblower, B. (2017). Advertorial: Single Guide, Simplified: EnGen sgRNA Synthesis Kit, S. pyogenes (Gen: Genetic Engineering & Biotechnologies News).
- Schmidt, R., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjork, E., and Handwerker, H. (1995). Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* *15*, 333-341.
- Scholz, J., and Woolf, C.J. (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci* *5 Suppl*, 1062-1067.
- Schumacher, M.A., and Eilers, H. (2010). TRPV1 splice variants: structure and function. *Front Biosci (Landmark Ed)* *15*, 872-882.
- Schumacher, M.A., Moff, I., Sudanagunta, S.P., and Levine, J.D. (2000). Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor. Loss of N-terminal domain suggests functional divergence among capsaicin receptor subtypes. *J Biol Chem* *275*, 2756-2762.
- Schwieger, J., Esser, K.H., Lenarz, T., and Scheper, V. (2016). Establishment of a long-term spiral ganglion neuron culture with reduced glial cell number: effects of AraC on cell composition and neuron. *J Neurosci Methods* *268*, 106-116.
- Scully, J.L., and Otten, U. (1995). NGF: not just for neurons. *Cell Biol Int* *19*, 459-469.
- Selvaraj, P., Huang, J.S., Chen, A., Skalka, N., Rosin-Arbesfeld, R., and Loh, Y.P. (2015). Neurotrophic factor- α modulates NGF-induced neurite outgrowth through interaction with Wnt-3a and Wnt-5a in PC12 cells and cortical neurons. *Mol Cell Neurosci* *68*, 222-233.
- Seong, E., Saunders, T.L., Stewart, C.L., and Burmeister, M. (2004). To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends Genet* *20*, 59-62.
- Sexton, J.E., Cox, J.J., Zhao, J., and Wood, J.N. (2018). The genetics of pain: implications for therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *58*, 123-142.
- Shafer, T.J., and Atchison, W.D. (1991). Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies. *Neurotoxicology* *12*, 473-492.
- Shalem, O., Sanjana, N.E., and Zhang, F. (2015). High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet* *16*, 299-311.
- Shaner, N.C., Patterson, G.H., and Davidson, M.W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* *120*, 4247-4260.
- Shao, Y., Guan, Y., Wang, L., Qiu, Z., Liu, M., Chen, Y., Wu, L., Li, Y., Ma, X., Liu, M., *et al.* (2014). CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nat Protoc* *9*, 2493-2512.
- Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X., *et al.* (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods* *11*, 399-402.

BIBLIOGRAFÍA

Sherrington, C.S. (1903). Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus. *J Physiol* *30*, 39-46.

Sherrington, C.S. (1906). *The Integrative Action of the Nervous System* (New Haven, CT: Yale University Press).

Shi, F., Corrales, C.E., Liberman, M.C., and Edge, A.S. (2007). BMP4 induction of sensory neurons from human embryonic stem cells and reinnervation of sensory epithelium. *Eur J Neurosci* *26*, 3016-3023.

Silva, A.J., Simpson, E.M., Takahashi, J.S., Lipp, H.-P., Nakanishi, S., Wehner, J.M., Giese, K.P., Tully, T., Abel, T., Chapman, P.F., *et al.* (1997). Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. *Banbury Conference on genetic background in mice. Neuron* *19*, 755-759.

Silver, L.M. (1995). *Mouse Genetics: Concepts and Applications* (Oxford University Press).

Smith-Edwards, K.M., DeBerry, J.J., Saloman, J.L., Davis, B.M., and Woodbury, C.J. (2016). Profound alteration in cutaneous primary afferent activity produced by inflammatory mediators. *Elife* *5*.

Smith, E.S., and Lewin, G.R. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* *195*, 1089-1106.

Spandidos, A., Wang, X.W., Wang, H.J., and Seed, B. (2014). The PrimerBank resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression, detection and quantification. *Int J Mol Med* *34*, S40-S40.

St John Smith, E. (2018). Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *J Neurol* *265*, 231-238.

Stifani, S., and Ma, Q. (2009). 'Runxs and regulations' of sensory and motor neuron subtype differentiation: implications for hematopoietic development. *Blood Cells Mol Dis* *43*, 20-26.

Stover, J.D., Farhang, N., Berrett, K.C., Gertz, J., Lawrence, B., and Bowles, R.D. (2017). CRISPR Epigenome Editing of AKAP150 in DRG Neurons Abolishes Degenerative IVD-Induced Neuronal Activation. *Molecular Therapy* *25*, 2014-2027.

Sun, L., Lutz, B.M., and Tao, Y.X. (2016). The CRISPR/Cas9 system for gene editing and its potential application in pain research. *Transl Perioper Pain Med* *1*, 22-33.

Sun, Y., Dykes, I.M., Liang, X., Eng, S.R., Evans, S.M., and Turner, E.E. (2008). A central role for *Islet1* in sensory neuron development linking sensory and spinal gene regulatory programs. *Nat Neurosci* *11*, 1283-1293.

Takacs-Jarrett, M., Sweeney, W.E., Avner, E.D., and Cotton, C.U. (1998). Morphological and functional characterization of a conditionally immortalized collecting tubule cell line. *Am J Physiol* *275*, F802-811.

Takaku, S., Yanagisawa, H., Watabe, K., Horie, H., Kadoya, T., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., Poirier, F., and Sango, K. (2013). GDNF promotes neurite outgrowth and upregulates galectin-1 through the RET/PI3K signaling in cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. *Neurochem Int* *62*, 330-339.

Thebault, S., Lemonnier, L., Bidaux, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y., *et al.* (2005). Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* *280*, 39423-39435.

Thirumangalakudi, L., Rao, H.V., and Grammas, P. (2009). Involvement of PGE2 and PGDH but not COX-2 in thrombin-induced cortical neuron apoptosis. *Neurosci Lett* *452*, 172-175.

Tian, W., Fu, Y., Wang, D.H., and Cohen, D.M. (2006). Regulation of TRPV1 by a novel renally expressed rat TRPV1 splice variant. *Am J Physiol Renal Physiol* *290*, F117-126.

- Torralba, A., Miquel, A., and Darba, J. (2014). Situación actual del dolor crónico en España: iniciativa "Pain Proposal". *Revista de la Sociedad Española del Dolor* *21*, 16-22.
- Tremblay, R.G., Sikorska, M., Sandhu, J.K., Lanthier, P., Ribecco-Lutkiewicz, M., and Bani-Yaghoob, M. (2010). Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *J Neurosci Methods* *186*, 60-67.
- Truett, G.E., Heeger, P., Mynatt, R.L., Truett, A.A., Walker, J.A., and Warman, M.L. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* *29*, 52, 54.
- Tucker, A.B., and Stocker, S.D. (2016). Hypernatremia-induced vasopressin secretion is not altered in TRPV1^{-/-} rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *311*, R451-456.
- Turk, D.C., and Okifuji, A. (2009). Pain Terms and Taxonomy of Pain. In Bonica's Management of Pain, S. Fishman, J. Ballantyne, and J.P. Rathmell, eds. (Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 14-23.
- Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lonnerberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggstrom, J., Kharchenko, O., Kharchenko, P.V., *et al.* (2015). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* *18*, 145-153.
- Vay, L., Gu, C., and McNaughton, P.A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* *165*, 787-801.
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* *76*, 387-417.
- Vicente-García, C., Fernández, A., and Montoliu, L. (2014). Analysis of Transgene Integration. In *Transgenic Animal Technology*, C.A. Pinkert, ed. (London: Elsevier), pp. 513-532.
- Wainger, B.J., Buttermore, E.D., Oliveira, J.T., Mellin, C., Lee, S., Saber, W.A., Wang, A.J., Ichida, J.K., Chiu, I.M., Barrett, L., *et al.* (2015). Modeling pain in vitro using nociceptor neurons reprogrammed from fibroblasts. *Nat Neurosci* *18*, 17-24.
- Wakeland, E., Morel, L., Achey, K., Yui, M., and Longmate, J. (1997). Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol Today* *18*, 472-477.
- Wang, B., Li, K., Wang, A., Reiser, M., Saunders, T., Lockey, R.F., and Wang, J.W. (2015). Highly efficient CRISPR/HDR-mediated knock-in for mouse embryonic stem cells and zygotes. *Biotechniques* *59*, 201-202, 204, 206-208.
- Wang, C., Hu, H.Z., Colton, C.K., Wood, J.D., and Zhu, M.X. (2004). An alternative splicing product of the murine TRPV1 gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels. *J Biol Chem* *279*, 37423-37430.
- Wang, J.W., and Stifani, S. (2017). Roles of Runx Genes in Nervous System Development. In *Runx Proteins in Development and Cancer*, Y. Groner, Y. Ito, P. Liu, J.C. Neil, N.A. Speck, and A. VanWijnen, eds. (Singapore: Springer-Verlag Singapore Pte Ltd), pp. 103-116.
- Wang, L.X., and Wang, Z.J. (2003). Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev* *55*, 949-965.
- Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., and Lander, E.S. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* *343*, 80-84.
- Wang, X., Spandidos, A., Wang, H., and Seed, B. (2012). PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res* *40*, D1144-1149.
- Wang, Y.Y., Chang, R.B., Waters, H.N., McKemy, D.D., and Liman, E.R. (2008). The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J Biol Chem* *283*, 32691-32703.
- Webb, R.L., Gallegos-Cardenas, A., Miller, C.N., Solomotis, N.J., Liu, H.X., West, F.D., and Stice, S.L. (2017). Pig induced pluripotent stem cell-derived neural rosettes parallel human differentiation into sensory neural subtypes. *Cell Reprogram* *19*, 88-94.

Williams, A., Henao-Mejia, J., and Flavell, R.A. (2016). Editing the mouse genome using the CRISPR-Cas9 system. *Cold Spring Harb Protoc* 2016, pdb top087536.

Wolfer, D.P., Crusio, W.E., and Lipp, H.P. (2002). Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci* 25, 336-340.

Wong, G.T. (2002). Speed congenics: applications for transgenic and knock-out mouse strains. *Neuropeptides* 36, 230-236.

Wood, J.N., Bevan, S.J., Coote, P.R., Dunn, P.M., Harmar, A., Hogan, P., Latchman, D.S., Morrison, C., Rougon, G., Theveniau, M., *et al.* (1990). Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons. *Proc Biol Sci* 241, 187-194.

Woolf, C.J., and Ma, Q. (2007). Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron* 55, 353-364.

Wu, M., Hernandez, M., Shen, S., Sabo, J.K., Kelkar, D., Wang, J., O'Leary, R., Phillips, G.R., Cate, H.S., and Casaccia, P. (2012). Differential modulation of the oligodendrocyte transcriptome by sonic hedgehog and bone morphogenetic protein 4 via opposing effects on histone acetylation. *J Neurosci* 32, 6651-6664.

Wyatt, A., Wartenberg, P., Candlish, M., Krasteva-Christ, G., Flockerzi, V., and Boehm, U. (2017). Genetic strategies to analyze primary TRP channel-expressing cells in mice. *Cell Calcium* 67, 91-104.

Xu, H., Tian, W., Fu, Y., Oyama, T.T., Anderson, S., and Cohen, D.M. (2007). Functional effects of nonsynonymous polymorphisms in the human TRPV1 gene. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F1865-1876.

Xu, H., Xiao, T., Chen, C.H., Li, W., Meyer, C.A., Wu, Q., Wu, D., Cong, L., Zhang, F., Liu, J.S., *et al.* (2015). Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Res* 25, 1147-1157.

Xue, Q., Yu, Y., Trilk, S.L., Jong, B.E., and Schumacher, M.A. (2001). The genomic organization of the gene encoding the vanilloid receptor: evidence for multiple splice variants. *Genomics* 76, 14-20.

Xue, W., Chen, S., Yin, H., Tammela, T., Papagiannakopoulos, T., Joshi, N.S., Cai, W., Yang, G., Bronson, R., Crowley, D.G., *et al.* (2014). CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* 514, 380-384.

Yang, H., Wang, H., and Jaenisch, R. (2014). Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protoc* 9, 1956-1968.

Yang, H., Wang, H., Shivalila, C.S., Cheng, A.W., Shi, L., and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 154, 1370-1379.

Yao, X., Wang, X., Hu, X., Liu, Z., Liu, J., Zhou, H., Shen, X., Wei, Y., Huang, Z., Ying, W., *et al.* (2017). Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res* 27, 801-814.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134.

Yee, J.R., Kenkel, W., Caccaviello, J.C., Gamber, K., Simmons, P., Nedelman, M., Kulkarni, P., and Ferris, C.F. (2015). Identifying the integrated neural networks involved in capsaicin-induced pain using fMRI in awake TRPV1 knockout and wild-type rats. *Front Syst Neurosci* 9, 15.

Yekkirala, A.S., Roberson, D.P., Bean, B.P., and Woolf, C.J. (2017). Breaking barriers to novel analgesic drug development. *Nat Rev Drug Discov* 16, 545-564.

Yin, H., Hou, X., Tao, T., Lv, X., Zhang, L., and Duan, W. (2015). Neurite outgrowth resistance to rho kinase inhibitors in PC12 Adh cell. *Cell Biol Int* 39, 563-576.

Yin, K., Baillie, G.J., and Vetter, I. (2016). Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison. *Mol Pain* 12, 17.

Yoshikawa, M., Masuda, T., Kobayashi, A., Senzaki, K., Ozaki, S., Aizawa, S., and Shiga, T. (2016). Runx1 contributes to the functional switching of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) from neurite outgrowth promoting to suppressing in dorsal root ganglion. *Mol Cell Neurosci* *72*, 114-122.

You, L., Zou, J., Zhao, H., Bertos, N.R., Park, M., Wang, E., and Yang, X.J. (2015). Deficiency of the chromatin regulator BRPF1 causes abnormal brain development. *J Biol Chem* *290*, 7114-7129.

Zerbino, D.R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Bhai, J., Billis, K., Cummins, C., Gall, A., Giron, C.G., *et al.* (2018). Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res* *46*, D754-D761.

Zhang, H., and McCarty, N. (2017). CRISPR editing in biological and biomedical investigation. *J Cell Biochem* *118*, 4152-4162.

Zhang, Z., Ottens, A.K., Lerner, S.F., Kobeissy, F.H., Williams, M.L., Hayes, R.L., and Wang, K.K. (2006). Direct Rho-associated kinase inhibition [correction of inhibiton] induces cofilin dephosphorylation and neurite outgrowth in PC-12 cells. *Cell Mol Biol Lett* *11*, 12-29.

Zhou, Y., Zhu, S., Cai, C., Yuan, P., Li, C., Huang, Y., and Wei, W. (2014). High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* *509*, 487-491.

Zhu, L.J. (2015). Overview of guide RNA design tools for CRISPR-Cas9 genome editing technology. *Frontiers in Biology* *10*, 289-296.

Zou, M., Li, S., Klein, W.H., and Xiang, M. (2012). Brn3a/Pou4f1 regulates dorsal root ganglion sensory neuron specification and axonal projection into the spinal cord. *Dev Biol* *364*, 114-127.





Tabla I. Características de cebadores para la localización del clon recombinante Es129sv. Se incluye el código/nombre arbitrario dado para cada cebador, la localización del cebador respecto al locus de TRPV1 modificado, la secuencia de nucleótidos, la longitud en pares de bases de cada oligonucleótido, la temperatura de *melting* dada por la compañía de fabricación, el porcentaje de GC, la formación de estructura secundaria del cebador y la dimerización del mismo. En la localización, el símbolo entre paréntesis hace referencia a la orientación del cebador + para orientación sentido y - para la orientación antisentido. Recomb. = brazo de recombinación.

Código Cebador	Localización	Secuencia	Long. (pb)	Tm (°C)	% GC	Estruc. Secund.	Dimerización
<i>p334</i>	Aguas arriba 5' (+)	GCAGCTGCTGCCATTGC	17	67,4	64,7	Fuerte	No
<i>p335</i>	Aguas arriba 5' (+)	GCTTTGGGATCCTCTGGG	18	64,6	61,1	Ninguna	No
<i>p336*</i>	Aguas arriba 5' (+)	GTCACCTCGGCCCTG	16	67,2	75	Ninguna	No
<i>p337</i>	Aguas arriba 5' (+)	GGCTTAGGCTGGACTGG	17	61	64,7	Ninguna	No
<i>p338*</i>	Aguas arriba 5' (+)	TCCCAGTCATTTCCCT	16	56	50	Ninguna	No
<i>p3.1</i>	Aguas arriba 5' (+)	TGAAAAGCTGGTGGACTTTCC	20	64,1	50	Débil	No
<i>p3.3</i>	Aguas arriba 5' (+)	CAGAGTGGTTGTGCCCTGA	20	64	55	Débil	No
<i>p3.5</i>	Aguas arriba 5' (+)	TGGGTCCTGGAAGACCTAGA	20	63,6	55	Fuerte	No
<i>p450</i>	Aguas arriba 5' (+)	CCTTGCACGTACTCCCTGAA	20	65,1	55	Ninguna	No
<i>p451</i>	Aguas arriba 5' (+)	TGCACGTACTCCCTGAAAGC	20	65,3	55	Ninguna	No
<i>p3.8</i>	Recom. 5' (+)	CTTCCGTGGCTGGCTTCTT	20	69,7	60	Ninguna	No
<i>p3.10</i>	Recom. 5' (+)	CAGCCTGGCTCTCCACAAA	20	69,9	60	Débil	No
<i>p3.16</i>	Inserto (-)	GAAC TTCAGGGTCAGCTTGC	20	63,9	55	Ninguna	No
<i>P327</i>	Inserto (-)	GCTTCATGTGGTCGGG	16	61,4	62,5	Ninguna	No
<i>Son2_R</i>	Recom. 3' (-)	ATCAAGATCCACAGAGCTGC	20	62,1	50	Ninguna	No

ANEXO I

Tabla I. Continuación

Código Cebador	Localización	Secuencia	Long. (pb)	Tm (°C)	% GC	Estruc. Secund.	Dimerizació n
<i>T1.1_R</i>	Recom. 3' (-)	TTGATAGTGAGGACGTTGCTGG	22	66,2	50	Ninguna	No
<i>T1.2_R</i>	Recom. 3' (-)	ATGGAGTTGGGAAACTGAGTG	21	62,9	47,6	Moderada	No
<i>P380</i>	Recom. 3' (-)	TACCTGAGACAGGTAGGT	18	51,4	50	Fuerte	No
<i>P381</i>	Recom. 3' (-)	CTAGAGGGGCTAGGCAT	17	56,8	58,9	Moderada	No
<i>p3.2</i>	Recom. 3' (-)	GCGTGATCCTGCTTACACAA	20	63,9	50	Débil	No
<i>p3.4</i>	Recom. 3' (-)	CAGGTAGGAGATCCCCAATCA	20	63,9	55	Muy débil	No
<i>p3.6</i>	Recom. 3' (-)	AAC TTTCACGGGGAAAAATCC	20	63,8	45	Débil	No
<i>p3.7</i>	Recom. 3' (-)	ACTTTCACGGGGAAAAATCCT	20	63,5	45	Débil	No
<i>p452</i>	Recom. 3' (-)	TGACATTTAAACGGAGGTGTTAGC	23	63,8	43,4	Débil	No
<i>p3.9</i>	Aguas abajo 3' (-)	CCTGCCTCCGGCAGAGATTT	20	69,7	60	Fuerte	No
<i>p3.12</i>	Aguas abajo 3' (-)	GATGGCTGTCCCCGAGCTTT	20	69,7	60	Débil	No

Tabla II. Pares de cebadores testados en la localización del clon recombinante Es129sv. Código arbitrario para los cebadores empleados y referenciados en la Tabla I. En el programa de PCR se señala mediante código la polimerasa empleada, donde K= Kapa Hifi (Kapa Biosystems), KAP = Kapa Long Range (Kapa Biosystems), JS = JumpStart™ AccuTaq™ LA (Sigma) y EL = Expand™ Long Template PCR System (Roche). Las dos primeras cifras indican la temperatura de hibridación empleada (por ejemplo, 61 = 61°C). Las 2 últimas cifras indican el tiempo de elongación empleado (por ejemplo 08 = 8 minutos de elongación o 65 = 6 minutos y 30 segundos). Las 2 últimas cifras indican el número de ciclos empleados. (por ejemplo 30 = 30 ciclos). Se indica el resultado más generalizado obtenido bajo cada condición señalándose con el símbolo Ø que no se obtuvo ningún tipo de amplificado. En ADN molde se indica sobre qué tipo de genómico se realizaron las distintas pruebas siendo ES_WT = ADNg de células madre 129ESv no modificadas, Dig. SpeI = producto de la digestión con la enzima SpeI de ADNg de células madre 129ESv no modificadas, Clon = ADNg de células madre 129ESv modificadas y B6 = ADNg de extracto de hígado de ratón C57Bl/6J.Ola.Hsd.

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p334/p380</i>	K610830	ADN en pocillo	ES_WT
<i>"/"</i>	K650830	ADN en pocillo	"
<i>p334/p381</i>	K610830	Ø	"
<i>"/"</i>	K650830	ADN en pocillo	"
<i>"/"</i>	JS630630	Ø	"
<i>"/"</i>	JS638530	Ø	"
<i>p334/Son2_R</i>	K610830	Muchas bandas inespecíficas/ <i>smear</i>	"
<i>"/"</i>	K650830	Ø	"
<i>"/"</i>	K630830	ADN en pocillo	"
<i>p334/TL1_R</i>	K610830	Ø	"
<i>"/"</i>	K650830	Ø	"
<i>"/"</i>	K630820	Ø	"
<i>"/"</i>	K650830	Ø	Dig. SpeI
<i>"/"</i>	K630820	Banda muy tenue a 1,5Kb	"

ANEXO I

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p334/p380</i>	K610830	ADN en pocillo	ES_WT
"/"	K650830	ADN en pocillo	"
<i>p334/p381</i>	K610830	∅	"
"/"	K650830	ADN en pocillo	"
"/"	JS630630	∅	"
"/"	JS638530	∅	"
<i>p334/Son2_R</i>	K610830	Muchas bandas inespecificas/smear	"
"/"	K650830	∅	"
"/"	K630830	ADN en pocillo	"
<i>p334/Test.1.1_R</i>	K610830	∅	"
"/"	K650830	∅	"
"/"	K630820	∅	"
"/"	K650830	∅	Dig. SpeI
"/"	K630820	Banda muy tenue a 1,5Kb	Dig. SpeI
<i>p334/Test.1.2_R</i>	K610830	ADN en pocillo	ES_WT
"/"	K650830	∅	"
<i>p335/p380</i>	K610830	ADN en pocillo	"
"/"	K650830	ADN en pocillo	"

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p335/p381</i>	K610830	∅	ES_WT
<i>"/"</i>	K650830	∅	"
<i>p335/Son2_R</i>	K610830	ADN en pocillo	"
<i>"/"</i>	K650830	ADN en pocillo	"
<i>p335/Test1.1_R</i>	K610830	ADN en pocillo	"
<i>"/"</i>	K650830	ADN en pocillo	"
<i>p335/Test1.2_R</i>	K610830	ADN en pocillo/Smear bajo con banda a 1,5Kb	"
<i>"/"</i>	K650830	DNA en pocillo	"
<i>"/"</i>	K630830	∅	"
<i>"/"</i>	"	Mucho DNA en pocillo	Dig. SpeI
<i>p337/p380</i>	K610830	Muchas bandas inespecificas/smear	ES_WT
<i>"/"</i>	K650830	∅	"
<i>"/"</i>	K630830	ADN en pocillo	"
<i>"/"</i>	"	Mucho ADN en pocillo	Dig. SpeI
<i>p337/p381</i>	K610830	Muchas bandas inespecificas/smear	ES_WT
<i>"/"</i>	K650830	ADN en pocillo	"
<i>"/"</i>	K630830	∅	"
<i>"/"</i>	"	Mucho ADN en pocillo	Dig. SpeI

ANEXO I

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p337/Son2_R</i>	K610830	Muchas bandas inespecíficas/smear	ES_WT
<i>"/"</i>	K650830	ADN en pocillo /Smear bajo	"
<i>"/"</i>	K630830	Bandas inespecíficas/Smear	"
<i>"/"</i>	"	Mucho ADN en pocillo	Dig. SpeI
<i>p337/Test1.1_R</i>	K610830	Ø	ES_WT
<i>"/"</i>	K650830	Ø	"
<i>p337/Test1.2_R</i>	K610830	ADN en pocillo	"
<i>"/"</i>	K650830	ADN en pocillo	"
<i>p338/p380</i>	K610830	Smear en parte alta del gel	"
<i>"/"</i>	K650830	Smear en parte alta del gel	"
<i>p338/p381</i>	K610830	Smear en parte alta del gel	"
<i>"/"</i>	K650830	Ø	"
<i>p338/Son2_R</i>	K610830	Ø	"
<i>"/"</i>	K650830	Smear en parte alta del gel	"
<i>p338/Test1.1_R</i>	K610830	Ø	"
<i>"/"</i>	K650830	Smear en parte alta del gel	"
<i>p338/Test1.2_R</i>	K610830	Smear en parte alta del gel	"
<i>"/"</i>	K650830	Smear en parte alta del gel	"

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p3.1/p3.2</i>	K610830	ADN en pocillo/banda a 10Kb con bandas más bajas bien definidas	ES_WT
<i>"/"</i>	K630830	ADN en pocillo	"
<i>p3.1/p3.4</i>	K610830	∅	"
<i>"/"</i>	K630830	ADN en pocillo	"
<i>p3.1/p3.6</i>	K610830	ADN en pocillo	"
<i>"/"</i>	K630830	Smear en parte alta/banda a 10Kb y a 4Kb	"
<i>p3.1/p3.7</i>	K610830	ADN en pocillo	"
<i>"/"</i>	K630830	ADN en pocillo/banda a 10Kb y más inespecíficas	"
<i>p3.3/p3.2</i>	K610830	ADN en pocillo	"
<i>"/"</i>	K630830	ADN en pocillo	"
<i>p3.3/p3.4</i>	K610830	∅	"
<i>"/"</i>	K630830	∅	"
<i>p3.3/p3.6</i>	K610830	ADN en pocillo	"
<i>"/"</i>	K630830	ADN en pocillo/smear intenso	"
<i>p3.3/p3.7</i>	K610830	ADN en pocillo/smear bajo	"
<i>"/"</i>	K630830	ADN en pocillo/smear	"
<i>p3.5/p3.2</i>	K610830	ADN en pocillo/banda a 10Kb con bandas más bajas bien definidas	"
<i>"/"</i>	K630830	ADN en pocillo	"

ANEXO I

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p3.5/p3.2</i>	K610825	∅	ES_WT
<i>p3.5/p3.4</i>	K610830	Bandas inespecíficas/Smear	"
<i>"/"</i>	K630830	∅	"
<i>p3.5/p3.6</i>	K610830	ADN en pocillo/Smear	"
<i>"/"</i>	K630830	ADN en pocillo	"
<i>p3.5/p3.7</i>	K610830	ADN en pocillo/banda a 10Kb con bandas más bajas bien definidas	ES_WT
<i>"/"</i>	"	Bandas tenues	Clon ES
<i>"/"</i>	"	∅	PCR
<i>"/"</i>	K630830	∅	ES_WT
<i>"/"</i>	K610825	Muchas bandas inespecíficas/smear	"
<i>"/"</i>	"	Muchas bandas inespecíficas/smear	Clon ES
<i>"/"</i>	KAP0935	∅	ES_WT
<i>"/"</i>	"	∅	Clon ES
<i>p3.8/p3.9</i>	K630830	Muchas bandas inespecíficas/smear	ES_WT
<i>p3.8/p3.12</i>	K630830	Muchas bandas inespecíficas/smear	"
<i>p3.10/p3.9</i>	K630830	Muchas bandas inespecíficas/smear	"
<i>p3.10/p3.12</i>	K630830	Muchas bandas inespecíficas/smear	"
<i>p334/p3.2</i>	K630830	Banda inespecífica de 1,5KB	"

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p334/p3.2</i>	K650830	∅	ES_WT
<i>p334/p3.4</i>	K630830	∅	"
<i>"/"</i>	K650830	∅	"
<i>p334/p3.6</i>	K630830	∅	"
<i>"/"</i>	K650830	∅	"
<i>p334/p3.7</i>	K630830	Banda de 8KB con varias bandas inespecificas	"
<i>"/"</i>	K650830	∅	"
<i>p335/p3.2</i>	K630830	∅	"
<i>"/"</i>	K650830	∅	"
<i>p335/p3.4</i>	K630830	∅	"
<i>"/"</i>	K650830	∅	"
<i>p335/p3.6</i>	K630830	∅	"
<i>"/"</i>	K650830	∅	"
<i>p335/p3.7</i>	K630830	Banda bien definida de 10KB	"
<i>"/"</i>	"	Muchas bandas inespecificas/smear	Clon ES
<i>"/"</i>	K650830	∅	ES_WT
<i>p336/p3.2</i>	K630830	Smear muy tenue	"
<i>"/"</i>	K650830	Banda de 8KB con varias bandas inespecificas	"

ANEXO I

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p336/p3.4</i>	K630830	Smear muy tenue	ES_WT
<i>"/"</i>	K650830	Ø	"
<i>p336/p3.6</i>	K630830	Banda de 8KB con varias bandas inespecíficas	"
<i>"/"</i>	K650830	Banda de 10KB con varias bandas inespecíficas	"
<i>p336/p3.7</i>	K630830	Smear/ Muchas bandas inespecíficas	"
<i>"/"</i>	K650830	Banda de 10KB con varias bandas inespecíficas	"
<i>p337/p3.2</i>	K630830	Ø	"
<i>"/"</i>	K650830	Ø	"
<i>p337/p3.4</i>	K630830	Ø	"
<i>"/"</i>	K650830	Ø	"
<i>p337/p3.6</i>	K630830	Ø	"
<i>"/"</i>	K650830	Ø	"
<i>p337/p3.7</i>	K630830	Ø	"
<i>"/"</i>	K650830	Ø	"
<i>p338/p3.2</i>	K650830	Ø	"
<i>p338/p3.4</i>	K650830	Ø	"
<i>p338/p3.6</i>	K650830	Ø	"
<i>p338/p3.7</i>	K650830	Ø	"

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p3.3/p381</i>	JS630630	∅	ES_WT
"	"	∅	Clon ES
"	JS368530	∅	ES_WT
"	"	∅	Clon ES
"	EL630630	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	ES_WT
"	"	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	Clon ES
<i>p3.1/p3.16</i>	K630330	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	PCR
"	"	Amplificado inespecífico	ES_WT
"	"	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	Clon ES
"	"	Amplificado inespecífico	B6
"	JS3636530	∅	ES_WT
"	"	∅	Clon ES
"	K636530	∅	ES_WT
"	"	Amplificado inespecífico	Clon ES
"	"	Amplificado inespecífico	B6
<i>p3.5/p3.16</i>	K630330	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	ES_WT
"	JS636530	∅	"
"	"	∅	Clon ES

ANEXO I

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p3.5/p3.16</i>	K636530	Amplificado inespecífico	ES_WT
<i>"/"/</i>	"	∅	Clon ES
<i>"/"/</i>	"	Amplificado inespecífico	B6
<i>"/"/</i>	K630430	Amplificado inespecífico	ES_WT
<i>"/"/</i>	"	Amplificado inespecífico	Clon ES
<i>"/"/</i>	"	Amplificado inespecífico	B6
<i>"/"/</i>	K650430	∅	ES_WT
<i>"/"/</i>	"	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	Clon ES
<i>"/"/</i>	"	Amplificado inespecífico	B6
<i>"/"/</i>	K696530	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	Clon ES
<i>"/"/</i>	"	∅	B6
<i>"/"/</i>	JS656530	∅	Clon ES
<i>"/"/</i>	"	∅	B6
<i>"/"/</i>	EL630630	∅	ES_WT
<i>"/"/</i>	"	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	Clon ES
<i>p334/p3.16</i>	K630330	Amplificados inespecíficos	PCR
<i>p335/p3.16</i>	K630330	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	"
<i>p336/p3.16</i>	K630330	∅	"

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p337/p3.16</i>	K630330	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	PCR
<i>p338/p3.16</i>	K630330	Posible banda correcta	"
<i>p3.1/p327</i>	K630330	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	"
<i>p3.5/p327</i>	K630330	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	"
<i>"/"</i>	K630430	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	"
<i>"/"</i>	JS630730	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	"
<i>"/"</i>	JS3636530	∅	ES_WT
<i>"/"</i>	"	∅	Clon ES
<i>"/"</i>	K636530	∅	ES_WT
<i>"/"</i>	"	∅	Clon ES
<i>"/"</i>	"	∅	B6
<i>"/"</i>	K630430	∅	ES_WT
<i>"/"</i>	"	∅	Clon ES
<i>"/"</i>	"	∅	B6
<i>"/"</i>	K650430	∅	ES_WT
<i>"/"</i>	"	∅	Clon ES
<i>"/"</i>	"	∅	B6
<i>p334/p327</i>	K630330	Amplificados inespecíficos	PCR

ANEXO I

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p335/p327</i>	K630330	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	PCR
<i>p336/p327</i>	K630330	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	"
<i>"/"</i>	K630430	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	"
<i>"/"</i>	JS630730	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	"
<i>"/"</i>	JS3636530	∅	ES_WT
<i>"/"</i>	"	∅	Clon ES
<i>"/"</i>	K636530	Amplificados inespecíficos	ES_WT
<i>"/"</i>	"	Amplificados inespecíficos	Clon ES
<i>"/"</i>	"	Amplificados inespecíficos	B6
<i>p337/p327</i>	K630330	∅	PCR
<i>p338/p327</i>	K630330	∅	"
<i>"/"</i>	"	∅	"
<i>p450/p3.16</i>	K630330	∅	B6
<i>"/"</i>	"	∅	Clon ES
<i>p450/p327</i>	K630330	∅	B6
<i>"/"</i>	"	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	Clon ES
<i>"/"</i>	K630430	Amplificado inespecífico	ES_WT
<i>"/"</i>	"	Amplificado inespecífico	Clon ES

Tabla II. Continuación

Pareja de cebadores	Programa PCR	Resultado	ADN molde
<i>p450/p327</i>	K630430	Amplificado inespecífico	B6
<i>"/"/</i>	K650430	Amplificado inespecífico	ES_WT
<i>"/"/</i>	"	Amplificado inespecífico	Clon ES
<i>"/"/</i>	"	Amplificado inespecífico	B6
<i>p451/p3.16</i>	K630330	∅	B6
<i>"/"/</i>	"	∅	Clon ES
<i>p451/p327</i>	K630330	∅	B6
<i>"/"/</i>	"	∅	Clon ES
<i>p451/p452</i>	EL630630	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	ES_WT
<i>"/"/</i>	"	Amplificados inespecíficos/posible banda correcta	Clon ES
<i>"/"/</i>	JS631030	∅	B6
<i>"/"/</i>	"	∅	Clon ES
<i>"/"/</i>	K630330	Smear/ Muchas bandas inespecíficas	B6
<i>"/"/</i>	"	Smear/ Muchas bandas inespecíficas	Clon ES

Locus recombinante

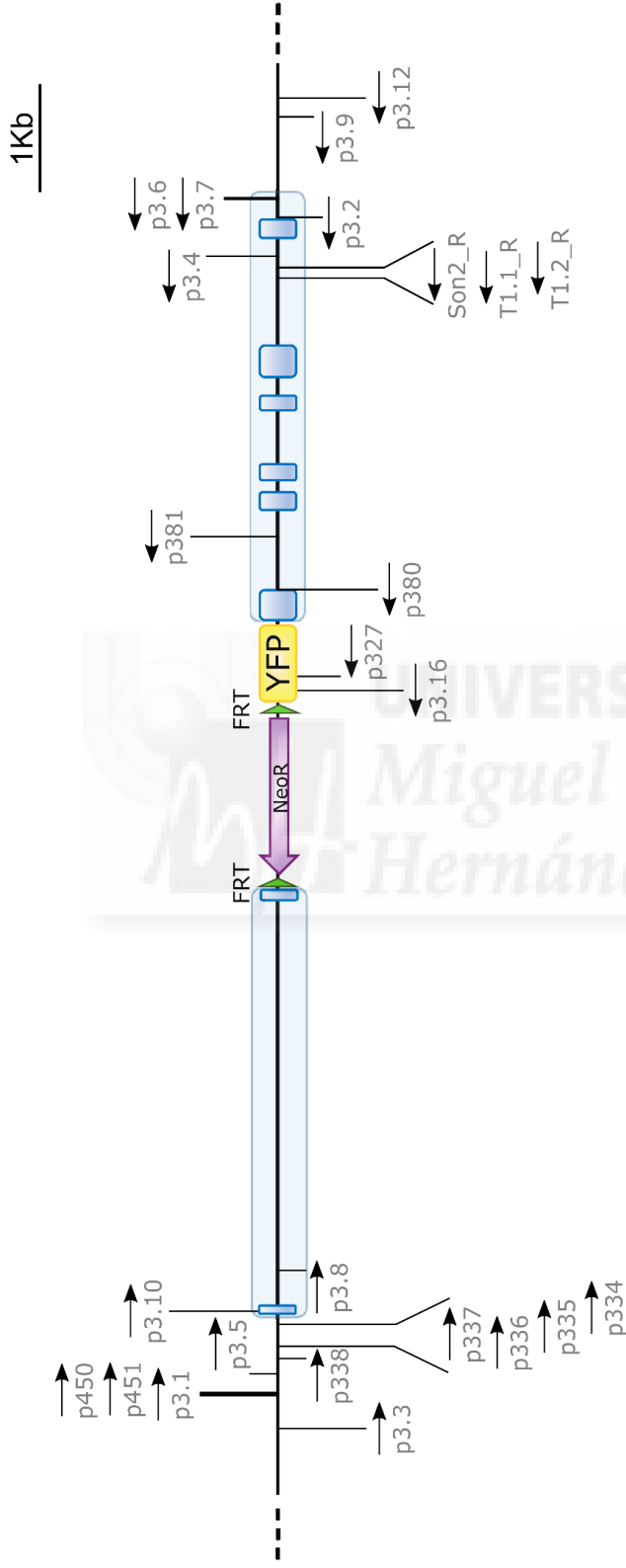


Figura 1. Ubicación de los distintos cebadores empleados en las pruebas de localización del clon recombinante ES129sv. Localizados sobre el locus de TRPV1 con el inserto completo se representan con rectángulos azules los exones de 1 a 7 de TRPV1 englobados en los brazos de recombinación 5' y 3'. Los triángulos verdes marcan las secuencias FRT, la flecha morada la resistencia a la Neomicina y el rectángulo amarillo la secuencia de la proteína fluorescente amarilla (YFP). Sobre cada cebador la orientación de la flecha señala el sentido del cebador siendo hacia la derecha un cebador sentido y hacia la izquierda un cebador antisentido.



ANEXO II
(Indicio de calidad)



TRP Channels as Potential Targets for Sex-Related Differences in Migraine Pain

Maite Artero-Morales, Sara González-Rodríguez and Antonio Ferrer-Montiel*

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universitas Miguel Hernández, Elche, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Graça Soveral,
Universidade de Lisboa, Portugal

Reviewed by:

Adalberto Merighi,
Università degli Studi di Torino, Italy
Francesco Bifari,
Università degli Studi di Milano, Italy

*Correspondence:

Antonio Ferrer-Montiel
aferrer@umh.es

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Biochemistry,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 29 March 2018

Accepted: 10 July 2018

Published: 14 August 2018

Citation:

Artero-Morales M,
González-Rodríguez S and
Ferrer-Montiel A (2018) TRP Channels
as Potential Targets for Sex-Related
Differences in Migraine Pain.
Front. Mol. Biosci. 5:73.
doi: 10.3389/fmolb.2018.00073

Chronic pain is one of the most debilitating human diseases and represents a social and economic burden for our society. Great efforts are being made to understand the molecular and cellular mechanisms underlying the pathophysiology of pain transduction. It is particularly noteworthy that some types of chronic pain, such as migraine, display a remarkable sex dimorphism, being up to three times more prevalent in women than in men. This gender prevalence in migraine appears to be related to sex differences arising from both gonadal and genetic factors. Indeed, the functionality of the somatosensory, immune, and endothelial systems seems modulated by sex hormones, as well as by X-linked genes differentially expressed during development. Here, we review the current data on the modulation of the somatosensory system functionality by gonadal hormones. Although this is still an area that requires intense investigation, there is evidence suggesting a direct regulation of nociceptor activity by sex hormones at the transcriptional, translational, and functional levels. Data are being accumulated on the effect of sex hormones on TRP channels such as TRPV1 that make pivotal contributions to nociceptor excitability and sensitization in migraine and other chronic pain syndromes. These data suggest that modulation of TRP channels' expression and/or activity by gonadal hormones provide novel pathways for drug intervention that may be useful for targeting the sex dimorphism observed in migraine.

Keywords: TRP channels, TRPV1, sex hormones, estrogens, migraine

INTRODUCTION

Chronic pain is a disease that affects more than 20% of the world's population (Breivik et al., 2006; Nahin, 2015), and is considered a social, medical, and economic burden (Patapoutian et al., 2009). Chronic pain results from complex processing of molecular and cellular signals at different levels of the peripheral (PNS) and central nervous systems (CNS), and also involves the immune system. A plethora of molecules and signaling pathways are involved in the detection, transduction, and propagation of environmental noxious stimuli by nociceptors, a specialized class of sensory neurons. These include members of the superfamily of Transient Receptor Potential (TRP) channels, which act as molecular sensors of harmful chemical and physical stimuli.

The TRP channels are non-selective cation channels expressed mainly in the plasma membrane of different cell types, as well as in the membrane of some intracellular organelles (Venkatchalam and Montell, 2007). They are implicated in a variety of sensorial functions, expanding from vision and taste to nociception (Clapham, 2003; Venkatchalam and Montell, 2007; Julius, 2013; Jardin et al., 2017). Structurally, the TRP channels are tetrameric integral membrane proteins whose

monomeric subunits display a domain structure characterized by six transmembrane segments (S1–S6), C- and N-cytosolic domains, and an aqueous pore region structured by S5 and S6 segments and their connecting loop. Both C- and N-termini exhibit particular functional domains depending on the subfamily (Ferrer-Montiel et al., 2004; Latorre et al., 2009; Cao et al., 2013; Liao et al., 2013). Currently, the TRP family is divided into six subfamilies according to sequence homology, namely canonical (TRPC), vanilloid (TRPV), ankyrin (TRPA), melastatin (TRPM), polycystic (TRPP), and mucolipin (TRPML) (Venkatchalam and Montell, 2007; Flockerzi and Nilius, 2014). In mammals, a total of 28 members have been identified, of which 4 members of TRPV (TRPV1–4), 2 members of TRPM (TRPM8 and TRPM3), and the only member of the TRPA subfamily (TRPA1) are known as thermoTRP channels, as they are environmental temperature sensors. Notably, thermoTRPs have been related to the pathophysiology of pain (Mickle et al., 2015, 2016).

Activation of thermoTRP channels in nociceptors provokes a Na⁺ and Ca²⁺ influx resulting in membrane depolarization, neuronal exocytosis, and action potential firing, as well as activation of intracellular second messenger cascades that may lead to neuronal adaptation, i.e., desensitization and/or potentiation (Ramsey et al., 2006; Ciardo and Ferrer-Montiel, 2017). All thermoTRPs are polymodal channels, being gated by a variety of chemical and physical stimuli, such as temperature, pH, osmolarity, endogenous compounds, inflammatory molecules, and natural products (Nilius and Szallasi, 2014; Dai, 2016; Moran and Szallasi, 2017). Natural compounds, such as capsaicin, menthol, and cinnamaldehyde, have been widely used to explore and understand the role of these channels in nociception and pain (Julius and Basbaum, 2001; Julius, 2013).

The ThermoTRP channels are functionally modulated by lipids (Ciardo and Ferrer-Montiel, 2017). Cholesterol has been described to be a modulator of TRPV and TRPM channels, involved in potentiating or reducing their activity (Taberner et al., 2015; Morales-Lazaro and Rosenbaum, 2017). One family of molecules derived from cholesterol metabolism is steroid hormones (Hu et al., 2010). Progestogens, estrogens, and androgens are powerful molecules that regulate a wide variety of cellular functions, and the link between them and pain vulnerability continues to grow. Several reports point to a transcriptional regulation of thermoTRPs expression by sex hormones (Jung et al., 2009; Kumar and Singru, 2017). Notably, recent studies in mice suggested a direct activation and/or modulation of thermoTRP channels by steroids (Asuthkar et al., 2015a,b; Ortiz-Renteria et al., 2018). Thus far, the link between sex hormones and pain has been mainly centered around how these hormones affect the structures in the CNS related to stress, anxiety, and pain (Aloisi and Bonifazi, 2006). It is well-established that estrogens regulate and modulate the opioid system contributing to analgesia differences in males and females at both experimental and clinical levels (Craft, 2003; Fillingim and Gear, 2004; Loyd and Murphy, 2014). Furthermore, the sex hormones appear to disturb the interrelation between the immune system and opioid receptors (Doyle and Murphy, 2017). Cumulative evidence implies a modulation of the somatosensory

system function by sex hormones that may underlie the human gender prevalence in some types of chronic pain (Mapplebeck et al., 2017; Sorge and Totsch, 2017).

As suggested by Kumar et al. (2015), the cross-talk between steroid hormones and thermoTRPs may have important implications for clinical context of human diseases. A relevant case in point is migraine, which is the seventh most prevalent medical disease and the second most disabling neurological condition in the world (GBD 2015 Disease Injury Incidence Prevalence Collaborators, 2016; GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group, 2017). This episodic primary headache is often characterized by intense, unilateral, throbbing, and pulsatile headache attacks, lasting for 4–72 h, and is frequently accompanied by nausea, vomiting, photophobia, and/or phonophobia. It is commonly divided into two main groups—with and without aura, that correspond to transient focal neurological symptoms that usually precede or sometimes accompany a headache (Headache Classification Committee of the International Headache Society, 2013). Migraine exhibits a clear sex difference in prevalence, indicating a predominant role of sex hormones as triggers *per se* or modulators of headache attacks through regulation of thermoTRP channels. Although both have separately been proposed as therapeutic targets for migraine intervention, the interrelation of sex hormones and thermoTRPs in the etiology of the disease has not been addressed in depth.

Here, we review the role of sex hormones in the activation, modulation, and regulation of the main thermoTRP channels involved in the pathophysiology of migraine. Nonetheless, we should mention that sex differences in migraine, and other chronic pain syndromes, will also be influenced by gonadal-independent X-linked gene expression that contributes to inborn sex differences in organs, tissues, and cells (immune, endothelial, and neurons), as well as by other factors (i.e., psychological and social) (review in Mogil, 2012; Bartley and Fillingim, 2013). The available information on the influence of these gonadal-independent factors on the pathophysiology of migraine, especially on the expression and activity of TRP channels, is very scarce, thus preventing us from properly addressing it in this review. Accordingly, we focus on the information regarding the direct interaction and modulation of thermoTRP channels by sex hormones, which may, at least in part, underlie the greater prevalence of the disease in women. We suggest that thermoTRPs may represent potential therapeutic targets for migraine intervention and other pain syndromes that exhibit sex dimorphism.

INFLUENCE OF SEX HORMONES IN MIGRAINE

Cumulative evidence indicates that migraine is a chronic pain disease linked to sex hormones. Firstly, ~15% of the population suffer from this, including children; however, the prevalence in women is up to three times higher than in men. Although a peak of incidence appears in individuals in the age range of 25–55 years in both genders, this remains higher in women

(Stewart et al., 1992; Lipton et al., 2001, 2007; Mathers et al., 2008; Vetvik and MacGregor, 2017). Secondly, the migraine prevalence changes across the age range. In 2003, a National Health Interview Survey, in which more than 40,000 US-citizens (70% adults and 30% children) were interviewed, showed that boys and girls shared a similar 1-year prevalence until puberty, thereafter it increased in both genders, being two or three times greater in women (Victor et al., 2010). This study also found that the largest difference in migraine prevalence occurred at the age of 30.2 years, declining from the age of 42 years (Victor et al., 2010). In women, the prevalence sharply decreased at menopause (Vetvik and MacGregor, 2017). The sex difference in the disease incidence between 15 and 50 years is probably related to the higher level of sex hormones during this age range. Most studies showed a protective role of testosterone and progesterone against migraine crisis, while the data for estrogens were more controversial. There are studies reporting that low levels of estrogens may be related to an increase in the number of migraine attacks, whereas others suggest that the application of estrogens promotes migraine episodes (see below).

In addition to the higher prevalence of migraine in females, it has also been reported that women experience more frequent, longer-lasting, and more intense attacks than men (Celentano et al., 1990; Boardman et al., 2003). The constant finding was that women, in comparison to men, have longer-lasting migraine attacks (Kallela et al., 1999; Steiner et al., 2003; Wober-Bingol et al., 2004; Kelman, 2006; Murtaza et al., 2009; Franconi et al., 2014; Bolay et al., 2015), as well as longer photophobia, phonophobia, nausea, vomiting, and cutaneous allodynia (Steiner et al., 2003; Murtaza et al., 2009; Bolay et al., 2015). One study, which analyzed 2,082 migraine adult patients (1,804 women and 278 men), reported that the headache intensity in women changed in an age-dependent manner and the duration and intensity of each attack achieved a peak above the age of 30 years. None of these variations were detected in men (Bolay et al., 2015). Therefore, these changes in the frequency and/or intensity seemed related to changes in women's reproductive status (puberty, pregnancy, or menopause) (Gupta et al., 2007), which were associated with fluctuating levels of estrogen and progesterone in the menstrual cycle. In support of this tenet, it has been shown that there is a significantly increased risk in women to suffer a migraine episode between 2 days before and 3 days after menstruation, which could be related to the lowest concentration of estrogen and progesterone (reviewed in Gupta et al., 2007; Macgregor, 2014; Vetvik and MacGregor, 2017). Furthermore, the headache classification set out by the Committee of the International Headache Society (2013) indicated that migraine without aura was often related to the menstrual cycle, thus categorizing it as pure menstrual migraine if the attack occurred only during the cycle, and menstrual-related migraine if there were additional episodes with or without aura during the menstrual cycle. Although the first phenomenon is not common (Gupta et al., 2007), menstrual-related migraine has been reported in more than 50% of women with migraine (Martin, 2004). Akin to menstruation, treatments involving the intake of hormonal contraceptives have been

related to a higher frequency of migraine episodes (MacGregor, 2013).

Perimenstrual estrogen withdrawal seems to be a trigger for migraine without aura. Based on this finding, perimenstrual estrogen supplements (estradiol patches) to 22 migraineur women significantly reduced the number of menstrual-related migraine attacks and also the intensity of the attacks during the months of treatment, as compared with placebo (Dennerstein et al., 1988). Similarly, in another pilot clinical trial with 20 migraineur women, estradiol gel reduced the duration and intensity of the migraine attacks when compared to a placebo gel (de Lignieres et al., 1986). Interestingly, an inverse association between migraine and estrogen levels in urine was found (MacGregor et al., 2006a). However, this study did not establish a threshold for estrogen withdrawal to trigger a migraine attack. Another study with 21 migraineur women reported that transdermal estradiol patches induced a slightly preventive effect for migraine crisis in women with induced menopause, thereby concluding that a low amount of estradiol in serum is sufficient to evoke migraine (Martin et al., 2003). During pregnancy, when estrogen and progesterone are 10 times higher than in non-pregnant states, an improvement in the disease was reported, especially in women suffering from menstrual-related migraine, although in some cases migraine with aura worsened in the first month of pregnancy (Macgregor, 2014).

The prevalence of migraine during perimenopause (period of 2–8 years prior to menopause and 1 year after the end of menses) appears to be higher among women who had suffered from menstrual-related migraine (Mattsson, 2003; Wang et al., 2003). In a clinic-epidemiologic report, which analyzed 556 migraineur women, two-thirds of women suffering from migraine reported an improvement in the disease after spontaneous menopause. However, it worsened in women after surgical menopause (Neri et al., 1993). During this period, the treatment of choice for migraine was transdermal estrogen patches or an estrogen gel, since there was evidence that oral pharmacological treatment could worsen migraine because of a greater systemic hormonal fluctuation (MacGregor et al., 2006b). Overall, there is an increased risk of migraine during the reproductive years, which decreases in the post-menopause phase (Ripa et al., 2015). Nonetheless, to confirm the effect of menstrual hormones on migraine, longitudinal studies are required.

A study by Li et al. (2018) analyzing 119 migraineurs, 42 patients with tension-type headache, and 30 healthy controls tried to relate sex hormones with migraine clinical outcomes in men and menopausal, perimenopausal, and reproductive-aged women. In this study, testosterone appeared to be lower in all migraineur women categories when compared to healthy controls, while progesterone appeared to be lower in both men and postmenopausal women. High estrogen levels in men and reproductive women appear to correlate with the least incapacitating migraine attacks. However, high estrogen levels were positively related to the duration of the migraine episode in post-reproductive women during the luteal phase (Li et al., 2018). With several limitations, similar to previous prospective studies, this study

suggested a complex role of sex hormones in the etiology of migraine.

PATHOPHYSIOLOGY OF MIGRAINE

Several events that occur in the CNS and PNS during a migraine attack, particularly in the trigeminal ganglia (TG), have been described. To mention a few: (i) a neuronal hyperexcitability in cortical regions (Welch, 2005; Aurora and Wilkinson, 2016); (ii) a cortical spreading depression (CSD) likely connected with the aura phase (Iadecola, 2002; Eikermann-Haerter et al., 2009, 2011; Zhang et al., 2010); (iii) the activation and sensitization of trigeminal nociceptors at the peripheral and central levels (Buzzi and Moskowitz, 1992; Goadsby and Edvinsson, 1993; Bolay et al., 2002); (iv) a cranial vasodilatation and meningeal inflammation (Moskowitz and Macfarlane, 1993; Williamson and Hargreaves, 2001; Levy, 2009).

Some of these events have been reported as a consequence of others, without clarifying which is the main cause or the trigger of a migraine episode. Meningeal blood vessels are located in the dura mater of the meninges in the CNS. The role of these vessels and their vasodilation in migraine has been widely studied (Humphrey and Goadsby, 1994; Goadsby et al., 2002; Parsons and Strijbos, 2003). Various studies in animals indicate that meningeal inflammation is the driving event of nociceptor sensitization (Williamson and Hargreaves, 2001; Levy, 2009, 2012). Accordingly, it was thought that vasodilation of these meningeal blood vessels was responsible for migraine triggers and therefore, some vasoconstrictors were developed to treat acute migraine (Villalon et al., 2003). However, other researches suggested that vasodilation of meningeal blood vessels was the consequence of trigeminal system activation rather than the major trigger. Thus, it was reported that the trigeminal sensitization caused cranial vasodilation in both humans and cats as a result of the production of nitric oxide (NO) that promoted the release of neuropeptides, such as substance P (SP) and α -calcitonin gene-related peptide (α -CGRP) (Goadsby and Edvinsson, 1993; Goadsby et al., 2009). The secretion of these vasoactive neuropeptides underlies the vasodilation characteristic of a migraine attack (Waeber and Moskowitz, 2005). In 2008, Schoonman and colleagues published a paper in which they induced migraine in migraineurs and healthy individuals by injecting the vasodilator nitroglycerin, a NO donor. Contrary to the widespread belief, they observed that only the control subjects experienced vasodilation of the meningeal vessels (Schoonman et al., 2008). Thus, the vasodilation of meningeal vessels seemed not to be the main cause of migraine pathophysiology, although it pivotally contributes to the symptomatology of the disorder. On the other hand, many studies have shown that CSD promotes trigeminal sensitization (Bolay et al., 2002; Zhang et al., 2010). Hence, the precise molecular and cellular mechanisms underlying migraine attacks remain largely elusive (Goadsby et al., 2009).

The triggering event in migraine is still under intense debate (Burstein and Jakubowski, 2005; Levy et al., 2009; Messlinger, 2009; Olesen et al., 2009; Charles, 2010; Levy, 2010, 2012; Bolay,

2012). Several groups postulated that the CNS is the starting point of the migraine attack, but other groups suggested that migraine is initiated by the activation of the trigeminal system. One data point that supports a peripheral triggering event is that during a migraine attack, elevated levels of inflammatory mediators, such as nerve growth factor (NGF), bradykinin, prostaglandins, and eicosanoids, are observed (Goadsby and Edvinsson, 1993; Sarchielli et al., 2006). This “inflammatory soup” has been largely postulated to be a key factor that sensitizes the TRPV1 and TRPA1 channels. Sensitization of these thermoTRP channels promotes the release of α CGRP in trigeminal terminals that in turn induces cranial vasodilatation (Meents et al., 2010; Benemei et al., 2013, 2014). Similarly, the application of capsaicin in the trigeminal system has been used as an experimental model of migraine (Gazerani et al., 2005). However, in a different study, capsaicin was shown as a relief for migraine attacks by depleting vasoactive neuropeptides (Benemei and Geppetti, 2013). Besides capsaicin, other TRP channel agonists have been described as migraine triggers (Kunkler et al., 2011), thereby placing TRPV1, TRPA1, and TRPM8 in the therapeutic spotlight for the development of migraine treatments (Nassini et al., 2010; Oxford and Hurley, 2013; Dussor et al., 2014). Interestingly, some chemical agents such as cigarette smoke, ammonia, formaldehyde, and chlorine can induce migraine attacks—all these compounds are TRPA1 agonists (Benemei et al., 2012). The headache produced by these environmental agents has been shown to be mediated by the secretion of α CGRP that increases cerebral blood flow (Kunkler et al., 2011). Additionally, low levels of magnesium in early embryonic development, which is able to permeate TRPM6 and TRPM7 channels, have also been reported as triggering migraine episodes (Komiya and Runnels, 2015).

In several meta-analysis and genome-wide association studies (GWAS) the TRPM8 locus has been related to susceptibility to migraine (Chasman et al., 2011; Esserlind et al., 2016; Gormley et al., 2016; Key et al., 2018). Also, genetic variations in single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TRPV1 and TRPV3 loci in a Spanish cohort were linked to a genetic predisposition to migraine (Carreño et al., 2012) (review in Zorina-Lichtenwalter et al., 2016). Thus, these studies implicate thermoTRPs as pivotal contributors to migraine, and suggest that they may be interesting targets for the treatment of migraine (Dussor et al., 2014; Tso and Goadsby, 2014).

TRPV1 AND ESTROGENS

TRPV1 channels, along with other thermoTRPs, are localized predominantly in peripheral and central nerve terminals of dorsal root ganglia (DRGs) and TGs (Caterina et al., 1997; Ichikawa and Sugimoto, 2001; Peier et al., 2002; Story et al., 2003; Bae et al., 2004; Okazawa et al., 2004; Roberts et al., 2004; Bautista et al., 2005; Kobayashi et al., 2005; Shimizu et al., 2007; Huang et al., 2012). Notably, TRPV1 is highly co-expressed with α CGRP (Ichikawa and Sugimoto, 2001; Bae et al., 2004), as well as with Substance P (SP) and P2X3 purinergic receptors. TRPV1 colocalizes with TRPA1 as well (Story et al., 2003; Bautista et al., 2005), whereas TRPM8 is expressed in a different subpopulation

of nociceptors (Peier et al., 2002; Story et al., 2003; Okazawa et al., 2004; Ren et al., 2018).

TRPV1 is also present in the brain, particularly in the hypothalamus, thalamus, amygdala, periaqueductal gray, insula, and a number of other regions in the brain of humans and rodents (Mezey et al., 2000; Roberts et al., 2004; Steenland et al., 2006; Cavanaugh et al., 2011). Interestingly, brain regions expressing TRPV1 are targets of sex hormones. Imaging studies in 44 adult migraineurs (22 women and 22 men) showed that migraineur women exhibited a thicker posterior insula and precuneus cortices compared to male migraineurs and the healthy controls of both sexes (Maleki et al., 2012). The authors suggested that these morphological alterations might underlie the different responses of both genders to migraine attacks, as well as the effect of sexual hormones and the differential impact of anti-migraine drugs such as triptans (Maleki et al., 2012).

In addition to the presence of TRPV1 channels in the brain regions that are influenced by sex hormones, some studies have demonstrated the expression of estrogen receptors (ER α , ER β y GPR30) in sensory neurons (Papka et al., 1997; Papka and Storey-Workley, 2002; Takanami et al., 2010) where they colocalize with TRPV1 channels (Bennett et al., 2003). This co-expression in nociceptors has led to the hypothesis of a modulation of pain transduction by sexual hormones (Bennett et al., 2003; Chaban, 2013). In support of this hypothesis, there is experimental and clinical evidence relating the function of estrogens with TRPV1 activity. For instance, it has been reported that women experience more pain-related sensations on exposure to TRPV1 agonists than men (Jensen and Petersen, 2006; Gazerani et al., 2007).

Some studies analyzed the effects of steroid hormones on capsaicin-evoked currents in rodent nociceptors. Although a differentiation between sexes was not established, these studies detected that 17 β -estradiol, the dominant estrogen during a woman's reproductive phase, is an important enhancer of capsaicin responses evoked *in vitro* in primary cultures of rodent nociceptors (Chen et al., 2004). This observation was also seen *in vivo*, where the threshold of the nociceptive responses to capsaicin injection was significantly reduced in rodent females (Lu et al., 2009). Although both sexes showed sensitivity to capsaicin, males required a four-fold higher dose of capsaicin than females for a similar response (Lu et al., 2009). It should be noted that the differences in capsaicin sensitivity observed between sexes may be caused by differential estrogen levels and influenced by the distinct percentage of estrogen receptors in male and female nociceptors (Takanami et al., 2010).

When estrogen levels were monitored, either as a function of the estral cycle or its replacement after ovariectomy in rodents, it was observed that under low levels of 17 β -estradiol, capsaicin produced a mild nocifensive response (Lu et al., 2009; Yamagata et al., 2016). In marked contrast, high levels of 17 β -estradiol (proestrus) resulted in a lower mechano- and thermo-nociceptive threshold, thereby promoting mechanical and thermal sensitization (Payrits et al., 2017). This nociceptive sensitization was not observed in TRPV1 knock-out mice, implying a link between estrogen nociceptor sensitization and TRPV1 *in vivo* (Payrits et al., 2017).

At the cellular level, it has been proposed that nociceptor sensitization induced by estrogens could be provoked by an alteration of nociceptor excitability. Flake et al. (2005) demonstrated that estrogens reduced the threshold of action potential firing and increased their spontaneous activity. They speculated that these changes in nociceptor excitability may be associated with membrane depolarization provoked by estrogen-induced activation of thermoTRP channels, particularly TRPV1. In this study, however, the authors did not find a significant difference in the proportion of nociceptors that responded to capsaicin between ovariectomized females treated with vehicle and those treated with estrogens after ovariectomy (Flake et al., 2005). In contrast, Yazgan and Naziroglu (2017) showed that ovariectomy led to higher capsaicin-induced current densities. Replacement therapy with 17 β -estradiol reduced capsaicin responses to a level similar to that of mock-operated animals (Yazgan and Naziroglu, 2017).

Curiously, some studies show that TRPV1 sensitization by 17 β -estradiol was stereospecific. However, the 17 β -estradiol induced TRPV1 potentiation, the stereoisomer, 17 α -estradiol, did not affect the activity of the channel in sensory neurons (Chen et al., 2004; Lu et al., 2009). Similarly, 17 α -estradiol did not affect the vasorelaxation induced by anandamide, an endogenous TRPV1 agonist (Ho, 2013). It should be noted, however, that this observation is still under debate as this stereospecificity was not observed in another study (Xu et al., 2008).

The molecular mechanisms involved in 17 β -estradiol-induced sensitization of TRPV1 appeared to include both a genomic regulation of channel expression and a functional modulation. Regarding the long-term effect of estrogens in females, several studies showed a transcriptional-induced expression of TRPV1 by 17 β -estradiol in nociceptors (Yamagata et al., 2016; Kumar et al., 2017; Payrits et al., 2017). Even sensory neurons derived from female mouse stem cells showed that the application of 17 β -estradiol increased the expression of TRPV1 mRNA (Greaves et al., 2014). Similarly, Cho and Chaban (2012) published another study that showed the relationship between estrogens and TRPV1 expression. Notably, they reported a reduction of TRPV1 expression in ER α and ER β null lines. Estradiol-induced TRPV1 expression has been observed not only in neuronal samples (Wu et al., 2010; Kumar and Singru, 2017) but also in non-neuronal tissues such as peritoneum (Greaves et al., 2014), endometrium (Pohoczky et al., 2016), and synoviocytes (Wu et al., 2015). Although still limited, some genomic studies imply the presence of a putative functional estrogen response element in the TRPV1 promoter (Greaves et al., 2014; Kumar and Singru, 2017).

In addition to the genomic regulation, there are several studies that have provided evidence for the modulation and/or a direct effect of 17 β -estradiol on TRPV1 based on the rapid responses that can be induced by estrogens. An *in vivo* study in rodents reported a fast onset of 17 β -estradiol on capsaicin sensitization when instilled locally in the ipsilateral paw, without an effect on the contralateral paw (Lu et al., 2009). Furthermore, pre-incubation with PKC or PKA inhibitors did not enhance

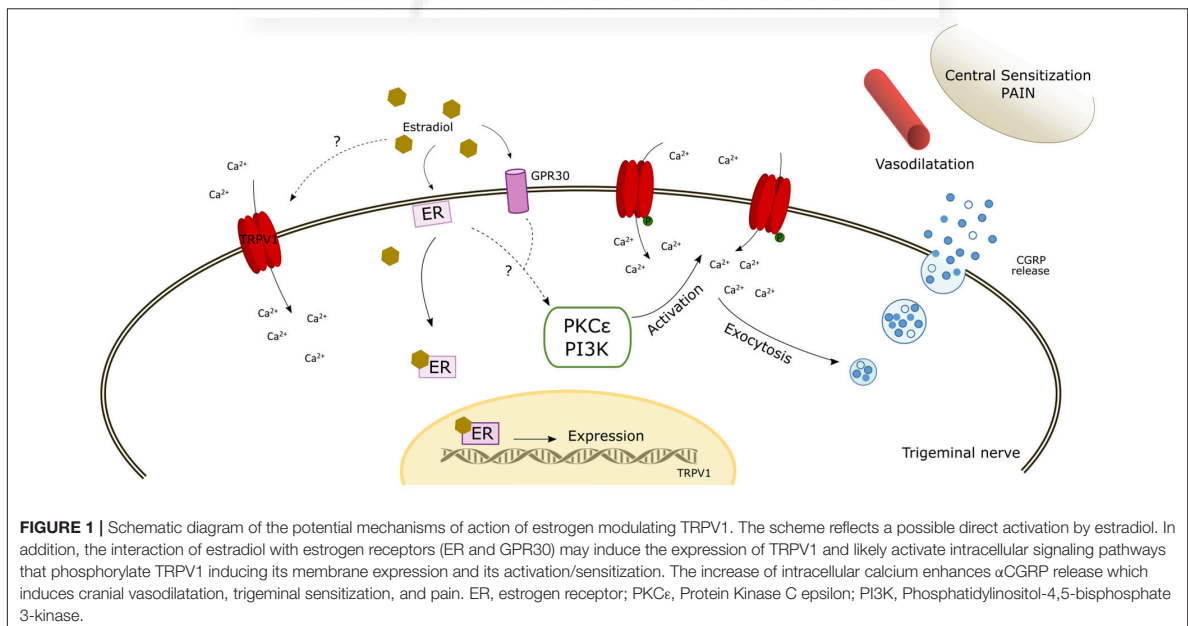
capsaicin responses, thereby suggesting a direct effect of 17 β -estradiol on TRPV1 activity (Lu et al., 2009). In support of this, other studies have suggested that the effect of estrogens on TRPV1 activity was mediated by PKC ϵ phosphorylation of Ser-800, which enhances channel activity (Hucho et al., 2006; Kuhn et al., 2008; Goswami et al., 2011). Through a TRPV1-dependent mechanism, but independent of its ion channel activity, PKC ϵ may promote cytoskeletal destabilization that in turn may produce mechanical nociceptor sensitization (Goswami et al., 2011). In contrast, Payrits et al. (2017) suggested that 17 β -estradiol-induced TRPV1 sensitization in nociceptors may be indirectly produced through the TrkA pathway as the application of inhibitors of this pathway abolished TRPV1 sensitization by estrogen (Figure 1).

However, to add more confusion to the field, not all studies have shown that 17 β -estradiol enhances the expression and sensitization of TRPV1 channel in nociceptors. Indeed, there are studies that imply a preventive or analgesic effect of estrogens. For instance, Yazgan and Naziroglu (2017) observed that deprivation of 17 β -estradiol was related to an excessive production of mitochondrial oxygen free radicals and a high Ca²⁺ influx through TRPV1, TRPA1, and TRPM2 channels, which appears to be one of the main causes of neurodegenerative disease in postmenopausal women. This study also showed that TRPV1 levels decrease as a result of 17 β -estradiol administration, and ovariectomy produced capsaicin sensitization in line with a previous study (Sanoja and Cervero, 2005). Another study reported that a long-term incubation with 17 β -estradiol reduced the activation of TRPV1 (Xu et al., 2008). Similarly, Thompson et al. (2008) pointed out that the anti-nociceptive action of 17 β -estradiol depended on the concentration used, as high

doses of 17 β -estradiol benzoate produced a low nociceptive response in females. Clearly, additional studies are needed to further unveil estrogen-mediated modulation of thermoTRPs in sensory neurons and other cell types involved in migraine. Furthermore, attention has to be paid to the experimental conditions used in *in vitro* studies as these may have a notable influence on the final modulatory effect of gonadal hormones. For instance, nociceptor subpopulations should be considered, as they may exhibit differential sensitivity to these hormones.

TRPV1 AND PROGESTERONE

Progesterone is the other steroid hormone that, together with estradiol, regulates the estral cycle in rodents and the menstrual cycle in humans. There are a plethora of studies linking progesterone to anti-nociception in neuropathic pain models (Coronel et al., 2011, 2016; Verdi et al., 2013; Jarahi et al., 2014; Liu et al., 2014). In this context, the few studies that investigated the putative effects of progesterone in the expression and functional modulation of thermoTRPs showed mainly an inhibitory role of this hormone. For example, it was observed that progesterone, acting through its receptor, reduced the expression of TRPV4 in sensory neurons (Jung et al., 2009). Recently, Ortiz-Renteria et al. (2018) reported a new molecular mechanism through which progesterone and the Sig-1R chaperon promoted TRPV1 down-regulation in nociceptors. The interaction of progesterone with the Sig-1R chaperon inhibited its binding to the TRPV1 promoter, resulting in a transcriptional inhibition of TRPV1 expression and consequently a lower nociceptive response to capsaicin. This *in vivo* observation is in disagreement



with Chen et al. (2004) who observed that progesterone did not modify capsaicin-induced currents in DRGs cultures. Similarly, Lu et al. (2009) found that the therapeutic replacement of progesterone in ovariectomized rats did not change the nociceptive response to capsaicin application.

Akin to estrogens, it is plausible that progesterone nociceptive effects are concentration-dependent, being stronger at high concentrations. This may account for the lack of a clear anti-nociceptive effect of the hormone during the estral cycle, where it is present at low concentration. On the other hand, progesterone seemed to mediate anti-nociceptive responses during pregnancy (Ortiz-Renteria et al., 2018). Furthermore, progesterone is a direct agonist of TRPM3 channels (Majeed et al., 2012; Miehe et al., 2012; Kumar et al., 2015) and it appears to regulate TRPC3 channels (Majeed et al., 2011). As with estrogens, more studies are needed to fully understand the potential role of progesterone modulation of nociceptor excitability in contributing to migraine episodes.

TRPV1 AND OTHER SEX-RELATED HORMONES

Prolactin is a peptide hormone secreted by the anterior pituitary gland that plays a role in osmoregulation, metabolism, the immune system, and the stimulation of lactogenesis and galactopoiesis. Prolactin is also involved in inflammatory responses (Costanza et al., 2015; Pereira Suarez et al., 2015). In TG neurons, a prolactin receptor is highly expressed in TRPV1 nociceptors, where it potentiates capsaicin-evoked currents, calcium influx, and α CGRP release (Patil et al., 2014). Diogenes et al. (2006) reported that 17 β -Estradiol produced a notable increase of prolactin in TG overlapping with TRPV1-expressing sensory neurons. Notably, prolactin enhanced the capsaicin-evoked responses in TG nociceptors, both *in vitro* and *in vivo*, in a 17 β -Estradiol-dependent manner. Furthermore, prolactin significantly augmented the capsaicin-induced nociceptive responses in female rats at proestrus and in ovariectomized females after estradiol treatment (Diogenes et al., 2006). In a subsequent study, the same group demonstrated that the short prolactin receptor signaling pathway mediated the activation of TRPV1 via PKC and PI3K, thereby affecting the action potential threshold and excitability of nociceptors (Belugin et al., 2013; Patil et al., 2013a,b, 2014).

In addition to prolactin, there is increasing interest in oxytocin because it may become an analgesic target for various chronic pain pathologies due to its role in pain modulation (Gonzalez-Hernandez et al., 2014; Rash et al., 2014; Tracy et al., 2015; Valstad et al., 2016). The nociceptive modulation exerted by this neuropeptide is mediated through two main pathways. Firstly, the endogenous opioid system plays an important indirect role in the modulation of pain by oxytocin. Specifically, the activation of opioid receptors appears to drive oxytocin central analgesic effects (Rash et al., 2014). Secondly, the activation of GABAergic inhibitory interneurons directly inhibits nociceptive C and A δ fibers at the spinal cord (Gonzalez-Hernandez et al., 2014; Rash et al., 2014). The relative importance of this system

remains elusive because it is still unknown whether there are oxytocin receptors in nociceptors. In addition, the peripheral contribution of vasopressin 1a receptors might also explain the oxytocin nociception regulation. Clearly, information about the receptors involved in the antinociceptive effects of oxytocin, at the peripheral nociceptors endings and supraspinal levels, remains a key research area in pain science (Gonzalez-Hernandez et al., 2014), which requires urgent investigation.

There are several attempts to apply intranasal oxytocin as an analgesic therapy, and even as a migraine treatment (Wang et al., 2013; Tracy et al., 2015). However, the intranasal application of oxytocin is often not effective. For instance, some women reported an increase in the perceived intensity of noxious heat stimuli after oxytocin inhalation (Tracy et al., 2017). In this context, a recent report describing, in both sexes, the direct agonist action of oxytocin on TRPV1 is a significant step toward disentangling the mechanism of action of oxytocin on nociceptors (Nersesyan et al., 2017). These results provide an explanation for the hot pain intensity reported by women patients under oxytocin therapy. Furthermore, oxytocin anti-nociceptive activity may be due to TRPV1 desensitization in nociceptors, similar to that induced by capsaicin and resiniferatoxin. Interestingly, the different physicochemical characteristics of oxytocin and capsaicin suggest a distinct receptor binding site for the hormone. However, it appears that oxytocin may bind to an outer transmembrane site located in the interfacial region between two adjacent subunits (Nersesyan et al., 2017), distant from the capsaicin binding site (Cao et al., 2013; Darre and Domene, 2015; Yang and Zheng, 2017). The discovery of this novel binding site in the TRPV1 channel opens new avenues for the design of novel receptor antagonists for the treatment of migraine.

TRPV1, TRPM8, AND TESTOSTERONE

The lower prevalence of chronic migraine in men is also characterized by a lower intensity and/or shorter duration of pain symptoms as compared to women (Bartley et al., 2015), thereby suggesting a role of testosterone. There are clinical studies showing that testosterone replacement therapy reduces pain outcomes and improves the quality of life of patients with hypogonadism (Aloisi et al., 2011), thereby supporting the hypothesis that testosterone may have an anti-nociceptive role. However, some studies suggest that testosterone is necessary for a small nociceptive response (Thompson et al., 2008; Glaser et al., 2012; Schertzing et al., 2017). According to these studies, low levels of testosterone are related to high discomfort, anxiety, and pain in response to noxious hot stimuli (Choi et al., 2017). In another study, Fanton et al. (2017) concluded that the protective effect of testosterone is due to the activation of androgen receptors by the hormone instead of an androgenic action of a testosterone derivative (i.e., dihydrotestosterone) during CNS development. These observations are in agreement with the testosterone effect observed in nociceptors. For example, the application of androgenic hormones to nociceptors showed an inhibitory

effect on capsaicin-induced currents (Chen et al., 2004). In addition, a recent study observed the significant differences between male and female mice in the expression of TRPV1 channels in TG, after an inflammatory insult, and provided data suggesting that testosterone may be an important contributor to the sensitization of TRPV1 in chronic inflammatory pain (Bai et al., 2018). This study observed a decrease of TRPV1 expression with testosterone replacement after gonadectomy. Although more studies are needed, this report further supports that sex hormones play a central role in modulation of the activity of TRPV1 channels.

Apart from TRPV1, it is worth mentioning that testosterone is also a regulator of TRPM8, a thermoTRP channel involved in cold nociception. Zhang and Barritt (2004) found that the promoter of TRPM8 contains a putative androgen-response element motif. Notably, this channel is highly expressed in the prostate and appears overexpressed in prostate cancer by a testosterone-mediated mechanism. The dependence of TRPM8 expression on androgens was demonstrated, which showed that the replacement of testosterone after gonadectomy induced the recovery of TRPM8 expression (Yang et al., 2012). Testosterone and TRPM8 are not just linked by genomic regulation, as testosterone is a potent TRPM8 agonist (Asuthkar et al., 2015a,b,c). These studies report the first evidence describing an endogenous modulator of this thermoTRP channel, although additional studies are needed to unveil the contribution of testosterone to cold allodynia and other nociceptive conditions promoted by TRPM8 activity. It is worth noting that TRPM8 has been recently proposed as an interesting therapeutic target for migraine due to the analgesic ability of some of its agonists (Dussor and Cao, 2016).

CONCLUSIONS

There is no doubt about the existence of a sex difference prevalence in chronic pain conditions such as migraine, where the prevalence in women is two or three times greater than in men. Although the specific molecular and

cellular mechanisms underlying this sex dimorphism are still under intense investigation, a pivotal role of sex hormones regulating the somatosensory system appears clear. It was believed that sex hormones mainly acted to regulate the immune system, but evidence is building up on a direct role modulating nociceptor signaling. This modulation appears mediated by the action of these hormones on thermoTRP channels, such as TRPV1, TRPA1, TRPM3, TRPV4, and TRPM8, and probably others that are still to be investigated. Sex hormones can regulate the expression of these channels, acting at a transcriptional level and/or their channel activity and/or through activation of intracellular signaling pathways that sensitize their activity. Understanding the role of sex hormones modulating the somatosensory system, and unraveling their impact on the long-term nociceptor excitability that underlies chronic pain, will pave the way to the design and development of novel and more efficient therapies that consider sex differences in pain perception. Nonetheless, it should be taken into consideration that sex hormones may not be the only players in determining sexual dimorphism in migraine pain, as this is a very complex phenomenon involving both gonadal-dependent and independent mechanisms that most likely complement each other in defining sex differences in migraine and chronic pain disorders.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MA-M and SG-R have written parts of the review. AF-M conceived the project and has reviewed and edited the manuscript.

FUNDING

This work has been funded by grant SAF2015-66275-C2-1-R from the AEI-MINECO and PROMETEO 2014/011 and the EU through FEDER funds—One way of building Europe. MA-M was a recipient of a Fellowship from MINECO (BES-2013-063227).

REFERENCES

- Aloisi, A. M., and Bonifazi, M. (2006). Sex hormones, central nervous system and pain. *Horm. Behav.* 50, 1–7. doi: 10.1016/j.yhbeh.2005.12.002
- Aloisi, A. M., Ceccarelli, I., Carlucci, M., Suman, A., Sindaco, G., Mameli, S., et al. (2011). Hormone replacement therapy in morphine-induced hypogonadic male chronic pain patients. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9:26. doi: 10.1186/1477-7827-9-26
- Asuthkar, S., Demirkhanyan, L., Sun, X., Elustondo, P. A., Krishnan, V., Baskaran, P., et al. (2015a). The TRPM8 protein is a testosterone receptor II. Functional evidence for an ionotropic effect of testosterone on TRPM8. *J. Biol. Chem.* 290, 2670–2688. doi: 10.1074/jbc.M114.610873
- Asuthkar, S., Elustondo, P. A., Demirkhanyan, L., Sun, X., Baskaran, P., Velpula, K. K., et al. (2015b). The TRPM8 protein is a testosterone receptor I. Biochemical evidence for direct TRPM8-testosterone interactions. *J. Biol. Chem.* 290, 2659–2669. doi: 10.1074/jbc.M114.610824
- Asuthkar, S., Velpula, K. K., Elustondo, P. A., Demirkhanyan, L., and Zakharian, E. (2015c). TRPM8 channel as a novel molecular target in androgen-regulated prostate cancer cells. *Oncotarget* 6, 17221–17236. doi: 10.18632/oncotarget.3948
- Aurora, S. K., and Wilkinson, F. (2016). The brain is hyperexcitable in migraine. *Cephalalgia* 27, 1442–1453. doi: 10.1111/j.1468-2982.2007.01502.x
- Bae, Y. C., Oh, J. M., Hwang, S. J., Shigenaga, Y., and Valtchanoff, J. G. (2004). Expression of vanilloid receptor TRPV1 in the rat trigeminal sensory nuclei. *J. Comp. Neurol.* 478, 62–71. doi: 10.1002/cne.20272
- Bai, X., Zhang, X., and Zhou, Q. (2018). Effect of testosterone on TRPV1 expression in a model of orofacial myositis pain in the rat. *J. Mol. Neurosci.* 64, 93–101. doi: 10.1007/s12031-017-1009-7
- Bartley, E. J., and Fillingim, R. B. (2013). Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *Br. J. Anaesth.* 111, 52–58. doi: 10.1093/bja/aet127
- Bartley, E. J., Palit, S., Kuhn, B. L., Kerr, K. L., Terry, E. L., DelVentura, J. L., et al. (2015). Natural variation in testosterone is associated with hypoalgesia in healthy women. *Clin. J. Pain* 31, 730–739. doi: 10.1097/AJP.00000000000000153
- Bautista, D. M., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H. E., Sterner, O., Högestätt, E. D., et al. (2005). Pungent products from garlic activate the

- sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12248–12252. doi: 10.1073/pnas.0505356102
- Belugin, S., Diogenes, A. R., Patil, M. J., Ginsburg, E., Henry, M. A., and Akopian, A. N. (2013). Mechanisms of transient signaling via short and long prolactin receptor isoforms in female and male sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 288, 34943–34955. doi: 10.1074/jbc.M113.486571
- Benemei, S., De Cesaris, F., Fusi, C., Rossi, E., Lupi, C., and Geppetti, P. (2013). TRPA1 and other TRP channels in migraine. *J. Headache Pain* 14, 71. doi: 10.1186/1129-2377-14-71
- Benemei, S., Fusi, C., Trevisan, G., and Geppetti, P. (2014). The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2552–2567. doi: 10.1011/bph.12512
- Benemei, S., and Geppetti, P. (2013). Migraine relief by chilis and other alternative medications: evidence indicates a central role for trp channels. *Headache* 53, 1162–1163. doi: 10.1111/head.12132
- Benemei, S., Rossi, E., and Geppetti, P. (2012). Airborne agents, TRP channels, and headache. *Headache* 52, 322–323. doi: 10.1111/j.1526-4610.2011.02064.x
- Bennett, H. L., Gustafsson, J. A., and Keast, J. R. (2003). Estrogen receptor expression in lumbosacral dorsal root ganglion cells innervating the female rat urinary bladder. *Auton. Neurosci.* 105, 90–100. doi: 10.1016/s1566-0702(03)00044-4
- Boardman, H. F., Thomas, E., Croft, P. R., and Millson, D. S. (2003). Epidemiology of headache in an English district. *Cephalalgia* 23, 129–137. doi: 10.1046/j.1468-2982.2003.00468.x
- Bolay, H. (2012). The first phase of a migraine attack resides in the cortex. *J. Neural Transm.* 119, 569–574. doi: 10.1007/s00702-012-0789-8
- Bolay, H., Ozge, A., Saginc, P., Orekici, G., Uludüz, D., Yalin, O., et al. (2015). Gender influences headache characteristics with increasing age in migraine patients. *Cephalalgia* 35, 792–800. doi: 10.1177/0333102414559735
- Bolay, H., Reuter, U., Dunn, A. K., Huang, Z., Boas, D. A., and Moskowitz, M. A. (2002). Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat. Med.* 8, 136–142. doi: 10.1038/nm0202-136
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., and Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur. J. Pain* 10, 287–333. doi: 10.1016/j.ejpain.2005.06.009
- Burstein, R., and Jakubowski, M. (2005). Unitary hypothesis for multiple triggers of the pain and strain of migraine. *J. Comp. Neurol.* 493, 9–14. doi: 10.1002/cne.20688
- Buzzi, M. G., and Moskowitz, M. A. (1992). The trigemino-vascular system and migraine. *Pathol. Biol.* 40, 313–317.
- Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., and Julius, D. (2013). TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 504, 113–118. doi: 10.1038/nature12823
- Carreño, O., Corominas, R., Fernandez-Morales, J., Camina, M., Sobrido, M. J., Fernández-Fernández, J. M., et al. (2012). SNP variants within the vanilloid TRPV1 and TRPV3 receptor genes are associated with migraine in the Spanish population. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 159B, 94–103. doi: 10.1002/ajmg.b.32007
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.
- Cavanaugh, D. J., Chesler, A. T., Bráz, J. M., Shah, N. M., Julius, D., and Basbaum, A. I. (2011). Restriction of transient receptor potential vanilloid-1 to the peptidergic subset of primary afferent neurons follows its developmental downregulation in nonpeptidergic neurons. *J. Neurosci.* 31, 10119–10127. doi: 10.1523/jneurosci.1299-11.2011
- Celentano, D. D., Linet, M. S., and Stewart, W. F. (1990). Gender differences in the experience of headache. *Soc. Sci. Med.* 30, 1289–1295.
- Chaban, V. (2013). Estrogen modulation of visceral nociceptors. *Curr. Trends Neurol.* 7, 51–55.
- Charles, A. (2010). Does cortical spreading depression initiate a migraine attack? Maybe Not. *Headache* 50, 731–733. doi: 10.1111/j.1526-4610.2010.01646.x
- Chasman, D. I., Schürks, M., Antilla, V., de Vries, B., Schminke, U., Launer, L. J., et al. (2011). Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat. Genet.* 43, 695–698. doi: 10.1038/ng.856
- Chen, S. C., Chang, T. J., and Wu, F. S. (2004). Competitive inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by dehydroepiandrosterone in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 529–536. doi: 10.1124/jpet.104.069096
- Cho, T., and Chaban, V. V. (2012). Expression of P2X3 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons from estrogen receptors-alpha and estrogen receptor-beta knockout mice. *Neuroreport* 23, 530–534. doi: 10.1097/WNR.0b013e328353fabc
- Choi, J. C., Park, Y. H., Park, S. K., Lee, J. S., Kim, J., Choi, J. I., et al. (2017). Testosterone effects on pain and brain activation patterns. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 61, 668–675. doi: 10.1111/aas.12908
- Ciarlo, M. G., and Ferrer-Montiel, A. (2017). Lipids as central modulators of sensory TRP channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1859(9 Pt B), 1615–1628. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.04.012
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517–524. doi: 10.1038/nature02196
- Coronel, M. F., Labombarda, F., Roig, P., Villar, M. J., De Nicola, A. F., and González, S. L. (2011). Progesterone prevents nerve injury-induced allodynia and spinal NMDA receptor upregulation in rats. *Pain Med.* 12, 1249–1261. doi: 10.1111/j.1526-4637.2011.01178.x
- Coronel, M. F., Sánchez Granel, M. L., Raggio, M. C., Adler, N. S., De Nicola, A. F., Labombarda, F., et al. (2016). Temporal changes in the expression of the translocator protein TSPO and the steroidogenic enzyme 5alpha-reductase in the dorsal spinal cord of animals with neuropathic pain: effects of progesterone administration. *Neurosci. Lett.* 624, 23–28. doi: 10.1016/j.neulet.2016.04.067
- Costanza, M., Binart, N., Steinman, L., and Pedotti, R. (2015). Prolactin: a versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology. *Autoimmun. Rev.* 14, 223–230. doi: 10.1016/j.autrev.2014.11.005
- Craft, R. M. (2003). Sex differences in opioid analgesia: “from mouse to man”. *Clin. J. Pain* 19, 175–186. doi: 10.1097/0002508-200305000-00005
- Dai, Y. (2016). TRPs and pain. *Semin. Immunopathol.* 38, 277–291. doi: 10.1007/s00281-015-0526-0
- Darré, L., and Domene, C. (2015). Binding of capsaicin to the TRPV1 ion channel. *Mol. Pharm.* 12, 4454–4465. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00641
- de Lignières, B., Vincens, M., Mauvais-Jarvis, P., Mas, J. L., Touboul, P. J., and Bousser, M. G. (1986). Prevention of menstrual migraine by percutaneous oestradiol. *Br. Med. J.* 293, 1540.
- Dennerstein, L., Morse, C., Burrows, G., Oats, J., Brown, J., and Smith, M. (1988). Menstrual migraine: a double-blind trial of percutaneous estradiol. *Gynecol. Endocrinol.* 2, 113–120. doi: 10.3109/09513598809023619
- Diogenes, A., Patwardhan, A. M., Jeske, N. A., Ruparel, N. B., Goffin, V., Akopian, A. N., et al. (2006). Prolactin modulates TRPV1 in female rat trigeminal sensory neurons. *J. Neurosci.* 26, 8126–8136. doi: 10.1523/jneurosci.0793-06.2006
- Doyle, H. H., and Murphy, A. Z. (2017). Sex differences in innate immunity and its impact on opioid pharmacology. *J. Neurosci. Res.* 95, 487–499. doi: 10.1002/jnr.23852
- Dussor, G., and Cao, Y. Q. (2016). TRPM8 and Migraine. *Headache* 56, 1406–1417. doi: 10.1111/head.12948
- Dussor, G., Yan, J., Xie, J. Y., Ossipov, M. H., Dodick, D. W., and Porreca, F. (2014). Targeting TRP channels for novel migraine therapeutics. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 1085–1096. doi: 10.1021/cn500083e
- Eikermann-Haerter, K., Dileköz, E., Kudo, C., Savitz, S. I., Waerber, C., Baum, M. J., et al. (2009). Genetic and hormonal factors modulate spreading depression and transient hemiparesis in mouse models of familial hemiplegic migraine type 1. *J. Clin. Invest.* 119, 99–109. doi: 10.1172/JCI36059
- Eikermann-Haerter, K., Yuzawa, I., Qin, T., Wang, Y., Baek, K., Kim, Y. R., et al. (2011). Enhanced subcortical spreading depression in familial hemiplegic migraine type 1 mutant mice. *J. Neurosci.* 31, 5755–5763. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5346-10.2011
- Esserlind, A. L., Christensen, A. F., Steinberg, S., Grarup, N., Pedersen, O., Hansen, T., et al. (2016). The association between candidate migraine susceptibility loci and severe migraine phenotype in a clinical sample. *Cephalalgia* 36, 615–623. doi: 10.1177/0333102415570492
- Fanton, L. E., Macedo, C. G., Torres-Chávez, K. E., Fischer, L., and Tambeli, C. H. (2017). Activational action of testosterone on androgen receptors protects males preventing temporomandibular joint pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 152, 30–35. doi: 10.1016/j.pbb.2016.07.005

- Ferrer-Montiel, A., García-Martínez, C., Morenilla-Palao, C., García-Sanz, N., Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., et al. (2004). Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur. J. Biochem.* 271, 1820–1826. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04083.x
- Fillingim, R. B., and Gear, R. W. (2004). Sex differences in opioid analgesia: clinical and experimental findings. *Eur. J. Pain* 8, 413–425. doi: 10.1016/j.ejpain.2004.01.007
- Flake, N. M., Bonebrake, D. B., and Gold, M. S. (2005). Estrogen and inflammation increase the excitability of rat temporomandibular joint afferent neurons. *J. Neurophysiol.* 93, 1585–1597. doi: 10.1152/jn.00269.2004
- Flockerzi, V., and Nilius, B. (2014). TRPs: truly remarkable proteins. *Handb. Exp. Pharmacol.* 222, 1–12. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2_1
- Franconi, F., Finocchi, C., Allais, G., Omboni, S., Tullo, V., Campesi, I., et al. (2014). Gender and triptan efficacy: a pooled analysis of three double-blind, randomized, crossover, multicenter, Italian studies comparing frovatriptan vs. other triptans. *Neurol. Sci.* 35(Suppl. 1), 99–105. doi: 10.1007/s10072-014-1750-4
- Gazerani, P., Andersen, O. K., and Arendt-Nielsen, L. (2005). A human experimental capsaicin model for trigeminal sensitization. Gender-specific differences. *Pain* 118, 155–163. doi: 10.1016/j.pain.2005.08.009
- Gazerani, P., Andersen, O. K., and Arendt-Nielsen, L. (2007). Site-specific, dose-dependent, and sex-related responses to the experimental pain model induced by intradermal injection of capsaicin to the foreheads and forearms of healthy humans. *J. Orofac. Pain* 21, 289–302.
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388, 1545–1602. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31678-6
- GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group (2017). Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol.* 16, 877–897. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30299-5
- Glaser, R., Dimitrakakis, C., Trimble, N., and Martin, V. (2012). Testosterone pellet implants and migraine headaches: a pilot study. *Maturitas* 71, 385–388. doi: 10.1016/j.maturitas.2012.01.006
- Goadsby, P. J., Charbit, A. R., Andreou, A. P., Akerman, S., and Holland, P. R. (2009). Neurobiology of migraine. *Neuroscience* 161, 327–341. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.03.019
- Goadsby, P. J., and Edvinsson, L. (1993). The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann. Neurol.* 33, 48–56. doi: 10.1002/ana.410330109
- Goadsby, P. J., Lipton, R. B., and Ferrari, M. D. (2002). Migraine—current understanding and treatment. *N. Engl. J. Med.* 346, 257–270. doi: 10.1056/NEJMra010917
- González-Hernández, A., Rojas-Piloni, G., and Condés-Lara, M. (2014). Oxytocin and analgesia: future trends. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 549–551. doi: 10.1016/j.tips.2014.09.004
- Gormley, P., Anttila, V., Winsvold, B. S., Palta, P., Esko, T., Pers, T. H., et al. (2016). Meta-analysis of 375,000 individuals identifies 38 susceptibility loci for migraine. *Nat. Genet.* 48, 856–866. doi: 10.1038/ng.3598
- Goswami, C., Kuhn, J., Dina, O. A., Fernández-Ballester, G., Levine, J. D., Ferrer-Montiel, A., et al. (2011). Estrogen destabilizes microtubules through an ion-conductivity-independent TRPV1 pathway. *J. Neurochem.* 117, 995–1008. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07270.x
- Greaves, E., Grieve, K., Horne, A. W., and Saunders, P. T. (2014). Elevated peritoneal expression and estrogen regulation of nociceptive ion channels in endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E1738–E1743. doi: 10.1210/jc.2014-2282
- Gupta, S., Mehrotra, S., Villalón, C. M., Perusquia, M., Saxena, P. R., and MaassenVanDenBrink, A. (2007). Potential role of female sex hormones in the pathophysiology of migraine. *Pharmacol. Ther.* 113, 321–340. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.08.009
- Headache Classification Committee of the International Headache Society. (2013). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 33, 629–808. doi: 10.1177/0333102413485658
- Ho, W. S. V. (2013). Modulation by 17 beta-estradiol of anandamide vasorelaxation in normotensive and hypertensive rats: a role for TRPV1 but not fatty acid amide hydrolase. *Eur. J. Pharmacol.* 701, 49–56. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.002
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., and Azhar, S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr. Metab.* 7:47. doi: 10.1186/1743-7075-7-47
- Huang, D., Li, S., Dhaka, A., Story, G. M., and Cao, Y. Q. (2012). Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Mol. Pain* 8:66. doi: 10.1186/1744-8069-8-66
- Hucho, T. B., Dina, O. A., Kuhn, J., and Levine, J. D. (2006). Estrogen controls PKC epsilon-dependent mechanical hyperalgesia through direct action on nociceptive neurons. *Eur. J. Neurosci.* 24, 527–534. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04913.x
- Humphrey, P. P., and Goadsby, P. J. (1994). The mode of action of sumatriptan is vascular? A debate. *Cephalalgia* 14, 401–410; discussion 393. doi: 10.1046/j.1468-2982.1994.1406401.x
- Iadecola, C. (2002). From CSD to headache: a long and winding road. *Nat. Med.* 8, 110–112. doi: 10.1038/nm0202-110
- Ichikawa, H., and Sugimoto, T. (2001). VR1-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res.* 890, 184–188. doi: 10.1016/S0006-8993(00)03253-4
- Jarahi, M., Sheibani, V., Safakhah, H. A., Torkmandi, H., and Rashidy-Pour, A. (2014). Effects of progesterone on neuropathic pain responses in an experimental animal model for peripheral neuropathy in the rat: a behavioral and electrophysiological study. *Neuroscience* 256, 403–411. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.043
- Jardín, I., López, J. J., Diez, R., Sánchez-Collado, J., Cantonero, C., Albarrán, L., et al. (2017). TRPs in pain sensation. *Front. Physiol.* 8:392. doi: 10.3389/fphys.2017.00392
- Jensen, M. T., and Petersen, K. L. (2006). Gender differences in pain and secondary hyperalgesia after heat/capsaicin sensitization in healthy volunteers. *J. Pain* 7, 211–217. doi: 10.1016/j.jpain.2005.10.013
- Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 355–384. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155833
- Julius, D., and Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210. doi: 10.1038/35093019
- Jung, C., Fandos, C., Lorenzo, I. M., Plata, C., Fernandes, J., Gené, G. G., et al. (2009). The progesterone receptor regulates the expression of TRPV4 channel. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 459, 105–113. doi: 10.1007/s00424-009-0706-7
- Kallela, M., Wessman, M., Färkkilä, M., Palotie, A., Koskenvuo, M., Honkasalo, M. L., et al. (1999). Clinical characteristics of migraine in a population-based twin sample: similarities and differences between migraine with and without aura. *Cephalalgia* 19, 151–158. doi: 10.1046/j.1468-2982.1999.1903151.x
- Kelman, L. (2006). Pain characteristics of the acute migraine attack. *Headache* 46, 942–953. doi: 10.1111/j.1526-4610.2006.00443.x
- Key, F. M., Abdul-Aziz, M. A., Mundry, R., Peter, B. M., Sekar, A., D'Amato, M., et al. (2018). Human local adaptation of the TRPM8 cold receptor along a latitudinal cline. *PLoS Genet.* 14:e1007298. doi: 10.1371/journal.pgen.1007298
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., et al. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with A delta/C-fibers and colocalization with trk receptors. *J. Comp. Neurol.* 493, 596–606. doi: 10.1002/cne.20794
- Komiya, Y., and Runnels, L. W. (2015). TRPM channels and magnesium in early embryonic development. *Int. J. Dev. Biol.* 59, 281–288. doi: 10.1387/ijdb.150196lr
- Kuhn, J., Dina, O. A., Goswami, C., Suckow, V., Levine, J. D., and Hucho, T. (2008). GPR30 estrogen receptor agonists induce mechanical hyperalgesia in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1700–1709. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06131.x
- Kumar, A., Kumari, S., Majhi, R. K., Swain, N., Yadav, M., and Goswami, C. (2015). Regulation of TRP channels by steroids: implications in physiology and diseases. *Gen. Comp. Endocrinol.* 220, 23–32. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.10.004
- Kumar, S., and Singru, P. (2017). “Estrous cycle-related changes in transient receptor potential vanilloid (TRPV) ion channels gene expression in mouse brain,” in *ISN-ESN 2017 Meeting* (Paris: Journal of Neurochemistry).
- Kumar, V., Sur, V. P., Guha, R., Konar, A., and Hazra, S. (2017). Estrogen modulates corneal nociception and maintains corneal homeostasis in rat eye. *Cornea* 37, 508–514. doi: 10.1097/ico.0000000000001437

- Kunkler, P. E., Ballard, C. J., Oxford, G. S., and Hurley, J. H. (2011). TRPA1 receptors mediate environmental irritant-induced meningeal vasodilatation. *Pain* 152, 38–44. doi: 10.1016/j.pain.2010.08.021
- Latorre, R., Zaelzer, C., and Brauchi, S. (2009). Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Q. Rev. Biophys.* 42, 201–246. doi: 10.1017/s0033583509990072
- Levy, D. (2009). Migraine pain, meningeal inflammation, and mast cells. *Curr. Pain Headache Rep.* 13, 237–240. doi: 10.1007/s11916-009-0040-y
- Levy, D. (2010). Migraine pain and nociceptor activation—where do we stand? *Headache* 50, 909–916. doi: 10.1111/j.1526-4610.2010.01670.x
- Levy, D. (2012). Endogenous mechanisms underlying the activation and sensitization of meningeal nociceptors: the role of immuno-vascular interactions and cortical spreading depression. *Curr. Pain Headache Rep.* 16, 270–277. doi: 10.1007/s11916-012-0255-1
- Levy, D., Strassman, A. M., and Burstein, R. (2009). A critical view on the role of migraine triggers in the genesis of migraine pain. *Headache* 49, 953–957. doi: 10.1111/j.1526-4610.2009.01444.x
- Li, W., Diao, X., Chen, C., Li, C., Zhang, Y., and Li, Y. (2018). Changes in hormones of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in migraine patients. *J. Clin. Neurosci.* 50, 165–171. doi: 10.1016/j.jocn.2017.11.011
- Liao, M., Cao, E., Julius, D., and Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107–112. doi: 10.1038/nature12822
- Lipton, R. B., Bigal, M. E., Diamond, M., Freitag, F., Reed, M. L., Stewart, W. F., et al. (2007). Migraine prevalence, disease burden, and the need for preventive therapy. *Neurology* 68, 343–349. doi: 10.1212/01.wnl.0000252808.97649.21
- Lipton, R. B., Stewart, W. F., Diamond, S., Diamond, M. L., and Reed, M. (2001). Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache* 41, 646–657. doi: 10.1046/j.1526-4610.2001.041007646.x
- Liu, X., Li, W., Dai, L., Zhang, T., Xia, W., Liu, H., et al. (2014). Early repeated administration of progesterone improves the recovery of neuropathic pain and modulates spinal 18kDa-translocator protein (TSPO) expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143, 130–140. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.02.017
- Lloyd, D. R., and Murphy, A. Z. (2014). The neuroanatomy of sexual dimorphism in opioid analgesia. *Exp. Neurol.* 259, 57–63. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.04.004
- Lu, Y. C., Chen, C. W., Wang, S. Y., and Wu, F. S. (2009). 17 beta-Estradiol mediates the sex difference in capsaicin-induced nociception in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331, 1104–1110. doi: 10.1124/jpet.109.158402
- MacGregor, E. A. (2013). Contraception and headache. *Headache* 53, 247–276. doi: 10.1111/head.12035
- Macgregor, E. A. (2014). Headache in pregnancy. *Continuum* 20, 128–147. doi: 10.1212/01.CON.0000443841.40933.9e
- MacGregor, E. A., Frith, A., Ellis, J., Aspinall, L., and Hackshaw, A. (2006a). Incidence of migraine relative to menstrual cycle phases of rising and falling estrogen. *Neurology* 67, 2154–2158. doi: 10.1212/01.wnl.0000233888.18228.19
- MacGregor, E. A., Frith, A., Ellis, J., Aspinall, L., and Hackshaw, A. (2006b). Prevention of menstrual attacks of migraine: a double-blind placebo-controlled crossover study. *Neurology* 67, 2159–2163. doi: 10.1212/01.wnl.0000249114.52802.55
- Majeed, Y., Amer, M. S., Agarwal, A. K., McKeown, L., Porter, K. E., O'Regan, D. J., et al. (2011). Stereoselective inhibition of transient receptor potential TRPC5 cation channels by neuroactive steroids. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1509–1520. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01136.x
- Majeed, Y., Tumova, S., Green, B. L., Seymour, V. A., Woods, D. M., Agarwal, A. K., et al. (2012). Pregnenolone sulphate-independent inhibition of TRPM3 channels by progesterone. *Cell Calcium* 51, 1–11. doi: 10.1016/j.ceca.2011.09.005
- Maleki, N., Linnman, C., Brawn, J., Burstein, R., Becerra, L., and Borsook, D. (2012). Her versus his migraine: multiple sex differences in brain function and structure. *Brain* 135(Pt 8), 2546–2559. doi: 10.1093/brain/aww175
- Mapplebeck, J. C., Beggs, S., and Salter, M. W. (2017). Molecules in pain and sex: a developing story. *Mol. Brain* 10:9. doi: 10.1186/s13041-017-0289-8
- Martin, V. T. (2004). Menstrual migraine: a review of prophylactic therapies. *Curr. Pain Headache Rep.* 8, 229–237. doi: 10.1007/s11916-004-0057-1
- Martin, V., Wernke, S., Mandell, K., Zoma, W., Bean, J., Pinney, S., et al. (2003). Medical oophorectomy with and without estrogen add-back therapy in the prevention of migraine headache. *Headache* 43, 309–321. doi: 10.1046/j.1526-4610.2003.03065.x
- Mathers, C., Fat, D. M., and Boerma, J. T. (2008). *The Global Burden of Disease: 2004 Update*. Geneva: World Health Organization.
- Mattsson, P. (2003). Hormonal factors in migraine: a population-based study of women aged 40 to 74 years. *Headache* 43, 27–35. doi: 10.1046/j.1526-4610.2003.03005.x
- Meents, J. E., Neeb, L., and Reuter, U. (2010). TRPV1 in migraine pathophysiology. *Trends Mol. Med.* 16, 153–159. doi: 10.1016/j.molmed.2010.02.004
- Messlinger, K. (2009). Migraine: where and how does the pain originate? *Exp. Brain Res.* 196, 179–193. doi: 10.1007/s00221-009-1756-y
- Mezey, E., Tóth, Z. E., Cortright, D. N., Arzubi, M. K., Krause, J. E., Elde, R., et al. (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3655–3660. doi: 10.1073/pnas.060496197
- Mickle, A. D., Shepherd, A. J., and Mohapatra, D. P. (2015). Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 131, 73–118. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.01.002
- Mickle, A. D., Shepherd, A. J., and Mohapatra, D. P. (2016). Nociceptive TRP channels: sensory detectors and transducers in multiple pain pathologies. *Pharmaceuticals* 9, 2–26. doi: 10.3390/ph9040072
- Miehe, S., Crause, P., Schmidt, T., Löhn, M., Kleemann, H. W., Licher, T., et al. (2012). Inhibition of diacylglycerol-sensitive TRPC channels by synthetic and natural steroids. *PLoS ONE* 7:e35393. doi: 10.1371/journal.pone.0035393
- Mogil, J. S. (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 859–866. doi: 10.1038/nrn3360
- Morales-Lázaro, S. L., and Rosenbaum, T. (2017). Multiple mechanisms of regulation of transient receptor potential ion channels by cholesterol. *Curr. Top. Membr.* 80, 139–161. doi: 10.1016/bs.ctm.2017.05.007
- Moran, M. M., and Szallasi, A. (2017). Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. *Br. J. Pharmacol.* 175, 2185–2203. doi: 10.1111/bph.14044
- Moskowitz, M. A., and Macfarlane, R. (1993). Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 5, 159–177.
- Murtaza, M., Kisan, M., Daniel, H., and Sonawalla, A. B. (2009). Classification and clinical features of headache disorders in Pakistan: a retrospective review of clinical data. *PLoS ONE* 4:e5827. doi: 10.1371/journal.pone.0005827
- Nahin, R. L. (2015). Estimates of pain prevalence and severity in adults: United States, 2012. *J. Pain* 16, 769–780. doi: 10.1016/j.jpain.2015.05.002
- Nassini, R., De Cesaris, F., Pedretti, P., and Geppetti, P. (2010). TRPs and migraine. *Open Drug Discov. J.* 2, 55–63. doi: 10.2174/1877381801002030055
- Neri, I., Granella, F., Nappi, R., Manzoni, G. C., Facchinetti, F., and Genazzani, A. R. (1993). Characteristics of headache at menopause: a clinico-epidemiologic study. *Maturitas* 17, 31–37.
- Nersesyan, Y., Demirkhanyan, L., Cabezas-Bratesco, D., Oakes, V., Kusuda, R., Dawson, T., et al. (2017). Oxytocin modulates nociception as an agonist of pain-sensing TRPV1. *Cell Rep.* 21, 1681–1691. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.063
- Nilius, B., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol. Rev.* 66, 676–814. doi: 10.1124/pr.113.008268
- Okazawa, M., Inoue, W., Hori, A., Hosokawa, H., Matsumura, K., and Kobayashi, S. (2004). Noxious heat receptors present in cold-sensory cells in rats. *Neurosci. Lett.* 359, 33–36. doi: 10.1016/j.neulet.2004.01.074
- Olesen, J., Burstein, R., Ashina, M., and Tfelt-Hansen, P. (2009). Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitisation. *Lancet Neurol.* 8, 679–690. doi: 10.1016/s1474-4422(09)70090-0
- Ortiz-Rentería, M., Juárez-Contreras, R., González-Ramírez, R., Islas, L. D., Sierra-Ramírez, F., Llorente, I., et al. (2018). TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E1657–E1666. doi: 10.1073/pnas.1715972115
- Oxford, G. S., and Hurley, J. H. (2013). The role of TRP channels in migraine. *Open Pain J.* 6, 37–49. doi: 10.2174/1876386301306010037
- Papka, R. E., Srinivasan, B., Miller, K. E., and Hayashi, S. (1997). Localization of estrogen receptor protein and estrogen receptor messenger RNA in peripheral autonomic and sensory neurons. *Neuroscience* 79, 1153–1163. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00076-6

- Papka, R. E., and Storey-Workley, M. (2002). Estrogen receptor- α and - β coexist in a subpopulation of sensory neurons of female rat dorsal root ganglia. *Neurosci. Lett.* 319, 71–74. doi: 10.1016/S0304-3940(01)02562-9
- Parsons, A. A., and Strijbos, P. J. (2003). The neuronal versus vascular hypothesis of migraine and cortical spreading depression. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 73–77. doi: 10.1016/S1471-4892(02)00016-4
- Patapoutian, A., Tate, S., and Woolf, C. J. (2009). Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 55–68. doi: 10.1038/nrd2757
- Patil, M. J., Green, D. P., Henry, M. A., and Akopian, A. N. (2013a). Sex-dependent roles of prolactin and prolactin receptor in postoperative pain and hyperalgesia in mice. *Neuroscience* 253, 132–141. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.035
- Patil, M. J., Henry, M. A., and Akopian, A. N. (2014). Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels* 8, 10. doi: 10.4161/chan.28946
- Patil, M. J., Ruparel, S. B., Henry, M. A., and Akopian, A. N. (2013b). Prolactin regulates TRPV1, TRPA1, and TRPM8 in sensory neurons in a sex-dependent manner: contribution of prolactin receptor to inflammatory pain. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305, E1154–E1164. doi: 10.1152/ajpendo.00187.2013
- Payrits, M., Sághy, É., Cseko, K., Pohóczy, K., Bölskei, K., Ernsts, D., et al. (2017). Estradiol sensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in pain responses. *Endocrinology* 158, 3249–3258. doi: 10.1210/en.2017-00101
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., et al. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705–715. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00652-9
- Pereira Suarez, A. L., López-Rincón, G., Martínez Neri, P. A., and Estrada-Chávez, C. (2015). Prolactin in inflammatory response. *Adv. Exp. Med. Biol.* 846, 243–264. doi: 10.1007/978-3-319-12114-7_11
- Pohóczy, K., Kun, J., Szalontai, B., Szoke, É., Sághy, É., Payrits, M., et al. (2016). Estrogen-dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium. *J. Mol. Endocrinol.* 56, 135–149. doi: 10.1530/jme-15-0184
- Ramsey, I. S., Delling, M., and Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 619–647. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431
- Rash, J. A., Aguirre-Camacho, A., and Campbell, T. S. (2014). Oxytocin and pain: a systematic review and synthesis of findings. *Clin. J. Pain* 30, 453–462. doi: 10.1097/AJP.0b013e31829f57df
- Ren, L., Chang, M. J., Zhang, Z., Dhaka, A., Guo, Z., and Cao, Y. Q. (2018). Quantitative analysis of mouse dull afferent neurons expressing TRPM8, VGLUT3, and NF200. *Headache* 58, 88–101. doi: 10.1111/head.13188
- Ripa, P., Ornello, R., Degan, D., Tiseo, C., Stewart, J., Pistoia, F., et al. (2015). Migraine in menopausal women: a systematic review. *Int. J. Womens. Health* 7, 773–782. doi: 10.2147/IJWH.S70073
- Roberts, J. C., Davis, J. B., and Benham, C. D. (2004). [3 H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res.* 995, 176–183. doi: 10.1016/j.brainres.2003.10.001
- Sanoja, R., and Cervero, F. (2005). Estrogen-dependent abdominal hyperalgesia induced by ovariectomy in adult mice: a model of functional abdominal pain. *Pain* 118, 243–253. doi: 10.1016/j.pain.2005.08.021
- Sarchielli, P., Alberti, A., Baldi, A., Coppola, F., Rossi, C., Pierguidi, L., et al. (2006). Proinflammatory cytokines, adhesion molecules, and lymphocyte integrin expression in the internal jugular blood of migraine patients without aura assessed ictally. *Headache* 46, 200–207. doi: 10.1111/j.1526-4610.2006.00337.x
- Schertzinger, M., Wesson-Sides, K., Parkitny, L., and Younger, J. (2017). Daily fluctuations of progesterone and testosterone are associated with fibromyalgia pain severity. *J. Pain* 19, 410–417. doi: 10.1016/j.jpain.2017.11.013
- Schoonman, G. G., van der Grond, J., Kortmann, C., van der Geest, R. J., Terwindt, G. M., and Ferrari, M. D. (2008). Migraine headache is not associated with cerebral or meningeal vasodilatation—a 3T magnetic resonance angiography study. *Brain* 131(Pt 8), 2192–2200. doi: 10.1093/brain/awn094
- Shimizu, T., Toriumi, H., Sato, H., Shibata, M., Nagata, E., Gotoh, K., et al. (2007). Distribution and origin of TRPV1 receptor-containing nerve fibers in the dura mater of rat. *Brain Res.* 1173, 84–91. doi: 10.1016/j.brainres.2007.07.068
- Sorge, R. E., and Totsch, S. K. (2017). Sex Differences in Pain. *J. Neurosci. Res.* 95, 1271–1281. doi: 10.1002/jnr.23841
- Steenland, H. W., Ko, S. W., Wu, L. J., and Zhuo, M. (2006). Hot receptors in the brain. *Mol. Pain* 2:34. doi: 10.1186/1744-8069-2-34
- Steiner, T. J., Scher, A. I., Stewart, W. F., Kolodner, K., Liberman, J., and Lipton, R. B. (2003). The prevalence and disability burden of adult migraine in England and their relationships to age, gender and ethnicity. *Cephalalgia* 23, 519–527. doi: 10.1046/j.1468-2982.2003.00568.x
- Stewart, W. F., Lipton, R. B., Celentano, D. D., and Reed, M. L. (1992). Prevalence of migraine headache in the United States. Relation to age, income, race, and other sociodemographic factors. *JAMA* 267, 64–69.
- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112, 819–829. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00158-2
- Taberner, F. J., Fernández-Ballester, G., Fernández-Carvajal, A., and Ferrer-Montiel, A. (2015). TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1848, 1818–1827. doi: 10.1016/j.bbame.2015.03.022
- Takanami, K., Sakamoto, H., Matsuda, K., Hosokawa, K., Nishi, M., Prossnitz, E. R., et al. (2010). Expression of G protein-coupled receptor 30 in the spinal somatosensory system. *Brain Res.* 1310, 17–28. doi: 10.1016/j.brainres.2009.11.004
- Thompson, A. D., Angelotti, T., Nag, S., and Mokha, S. S. (2008). Sex-specific modulation of spinal nociception by $\alpha(2)$ -adrenoceptors: differential regulation by estrogen and testosterone. *Neuroscience* 153, 1268–1277. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.008
- Tracy, L. M., Georgiou-Karistianis, N., Gibson, S. J., and Giummarra, M. J. (2015). Oxytocin and the modulation of pain experience: implications for chronic pain management. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 55, 53–67. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.04.013
- Tracy, L. M., Labuschagne, I., Georgiou-Karistianis, N., Gibson, S. J., and Giummarra, M. J. (2017). Sex-specific effects of intranasal oxytocin on thermal pain perception: a randomised, double-blind, placebo-controlled cross-over study. *Psychoneuroendocrinology* 83, 101–110. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.05.028
- Tso, A. R., and Goadsby, P. J. (2014). New targets for migraine therapy. *Curr. Treat. Options Neurol.* 16, 318. doi: 10.1007/s11940-014-0318-1
- Valstad, M., Alvares, G. A., Andreassen, O. A., Westlye, L. T., and Quintana, D. S. (2016). The relationship between central and peripheral oxytocin concentrations: a systematic review and meta-analysis protocol. *Syst. Rev.* 5, 49. doi: 10.1186/s13643-016-0225-5
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387–417. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819
- Verdi, J., Jafari-Sabet, M., Mokhtari, R., Mesdaghinia, A., and Banafshe, H. R. (2013). The effect of progesterone on expression and development of neuropathic pain in a rat model of peripheral neuropathy. *Eur. J. Pharmacol.* 699, 207–212. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.052
- Vetvik, K. G., and MacGregor, E. A. (2017). Sex differences in the epidemiology, clinical features, and pathophysiology of migraine. *Lancet Neurol.* 16, 76–87. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30293-9
- Victor, T. W., Hu, X., Campbell, J. C., Buse, D. C., and Lipton, R. B. (2010). Migraine prevalence by age and sex in the United States: a life-span study. *Cephalalgia* 30, 1065–1072. doi: 10.1177/0333102409355601
- Villalón, C. M., Centurión, D., Valdivia, L. F., de Vries, P., and Saxena, P. R. (2003). Migraine: pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 1, 71–84. doi: 10.2174/1570161033386826
- Waeber, C., and Moskowitz, M. A. (2005). Migraine as an inflammatory disorder. *Neurology* 64(10 Suppl. 2), S9–15. doi: 10.1212/WNL.64.10_suppl_2.S9
- Wang, S. J., Fuh, J. L., Lu, S. R., Juang, K. D., and Wang, P. H. (2003). Migraine prevalence during menopausal transition. *Headache* 43, 470–478. doi: 10.1046/j.1526-4610.2003.03092.x
- Wang, Y. L., Yuan, Y., Yang, J., Wang, C. H., Pan, Y. J., Lu, L., et al. (2013). The interaction between the oxytocin and pain modulation in headache patients. *Neuropeptides* 47, 93–97. doi: 10.1016/j.npep.2012.12.003
- Welch, K. M. (2005). Brain hyperexcitability: the basis for antiepileptic drugs in migraine prevention. *Headache* 45, S25–S32. doi: 10.1111/j.1526-4610.2005.4501008.x

- Williamson, D. J., and Hargreaves, R. J. (2001). Neurogenic inflammation in the context of migraine. *Microsc. Res. Tech.* 53, 167–178. doi: 10.1002/jemt.1081
- Wöber-Bingöl, C., Wöber, C., Karwautz, A., Auerth, A., Serim, M., Zebenholzer, K., et al. (2004). Clinical features of migraine: a cross-sectional study in patients aged three to sixty-nine. *Cephalalgia* 24, 12–17. doi: 10.1111/j.1468-2982.2004.00621.x
- Wu, Y. W., Bi, Y. P., Kou, X. X., Xu, W., Ma, L. Q., Wang, K. W., et al. (2010). 17-beta-estradiol enhanced allodynia of inflammatory temporomandibular joint through upregulation of hippocampal TRPV1 in ovariectomized rats. *J. Neurosci.* 30, 8710–8719. doi: 10.1523/jneurosci.6323-09.2010
- Wu, Y. W., Hao, T., Kou, X. X., Gan, Y. H., and Ma, X. C. (2015). Synovial TRPV1 is upregulated by 17-beta-estradiol and involved in allodynia of inflamed temporomandibular joints in female rats. *Arch. Oral Biol.* 60, 1310–1318. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.05.011
- Xu, S., Cheng, Y., Keast, J. R., and Osborne, P. B. (2008). 17beta-estradiol activates estrogen receptor beta-signalling and inhibits transient receptor potential vanilloid receptor 1 activation by capsaicin in adult rat nociceptor neurons. *Endocrinology* 149, 5540–5548. doi: 10.1210/en.2008-0278
- Yamagata, K., Sugimura, M., Yoshida, M., Sekine, S., Kawano, A., Oyamaguchi, A., et al. (2016). Estrogens exacerbate nociceptive pain via up-regulation of TRPV1 and ANO1 in trigeminal primary neurons of female rats. *Endocrinology* 157, 4309–4317. doi: 10.1210/en.2016-1218
- Yang, F., and Zheng, J. (2017). Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein Cell* 8, 169–177. doi: 10.1007/s13238-016-0353-7
- Yang, Z., Wang, X., Zhu, G., Zhou, Z., Wang, Y., Chen, D., et al. (2012). Effect of surgical castration on expression of TRPM8 in urogenital tract of male rats. *Mol. Biol. Rep.* 39, 4797–4802. doi: 10.1007/s11033-011-1271-7
- Yazgan, Y., and Naziroglu, M. (2017). Ovariectomy-induced mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and calcium ion influx through TRPA1, TRPM2, and TRPV1 are prevented by 17 beta-estradiol, tamoxifen, and raloxifene in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Mol. Neurobiol.* 54, 7620–7638. doi: 10.1007/s12035-016-0232-5
- Zhang, L., and Barritt, G. J. (2004). Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64, 8365–8373. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2146
- Zhang, X., Levy, D., Nosedá, R., Kainz, V., Jakubowski, M., and Burstein, R. (2010). Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J. Neurosci.* 30, 8807–8814. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0511-10.2010
- Zorina-Lichtenwalter, K., Meloto, C. B., Khoury, S., and Diatchenko, L. (2016). Genetic predictors of human chronic pain conditions. *Neuroscience* 338, 36–62. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.04.041

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Artero-Morales, González-Rodríguez and Ferrer-Montiel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Agradecimientos

Llegados a este punto toca hacer balance y hay muchas personas a las que debo agradecer haber llegado hasta aquí.

En primer lugar, gracias a mi director de tesis, Antonio Ferrer, por darme la oportunidad de entrar a su laboratorio, por apoyarme, guiarme y reconducir tantos <<no sale>>, por su paciencia conmigo y por apostar por mi trabajo en todo momento.

Gracias a Gregorio por ser mi sufrido tutor y supervisar tantos informes y textos. Gracias a Asia por todo el apoyo y ánimo. Gracias a ambos por todos los consejos y por su buen humor con todas mis irrupciones en sus despachos para contestar mis preguntas “tontas”.

Gracias a la Comisión del Programa de Doctorado que me ha ayudado a evolucionar y mejorar como doctoranda. En especial a Ricardo Mallavia, por todo su apoyo, por su disposición a ayudarme en todas las vicisitudes de la nueva normativa y sentarse conmigo para aprender de aplicaciones informáticas.

Gracias a la secretaria del IBMC, los que estuvieron cuando empecé, May, Javier, Carmen y Raquel y los que les tomaron el relevo, Salva, Vicente y Pepi. Muchísimas gracias por toda la ayuda que me habéis prestado, por hacerlo todo más fácil y por el excelente trabajo que realizáis.

Gracias a los servicios del CBATEG, y mi enlace directo Anna, sin los que hubiera sido imposible generar las quimeras. A los servicios del animalario de Elche que cuidaron de los animales. Gracias al Dr. Nassar y su grupo que cedió la línea celular MED17.11 y permitió la investigación de un modelo celular para esta tesis. Gracias a todos los colaboradores y servicios externos que permitieron tener controles, generar plásmidos para el sistema CRISPR/Cas9 y que de una u otra forma son parte de esta tesis.

Gracias a todos y cada uno de los Loramiguicos (Ainara, Christoph, Cloti, Efrén, Gema, Isa, Jan-Albert, Lucía, May, Maria Grazia, Mónica, Nuria, Paco, Roberto cp, Roberto sp, Sakthi, Vero, Ángeles (Wen), incluso Aaron, Pier, Carol y Estefanía. ¡¡¡La última incorporación al grupo finaliza su tesis y os tengo tanto que agradecer!!! Gracias por recibirme y acogerme como una más incluso sin coincidir con algunos de vosotros, por enseñarme que el tiempo, la distancia o las idas y venidas de la vida son detalles sin importancia frente a la gran familia que conformáis (que conformamos), por todas las risas, bromas y lecciones que me habéis dado. Es imposible no quereros y no echaros un poco de menos en el día a día.

Gracias a todos los que han estado en el laboratorio de una u otra forma, enseñándome, alentándome y animándome.

Gracias a Paco, mi primer mentor en la bancada ferrerina. Gracias por enseñarme tantísimo, por tu infinita paciencia conmigo, por orientarme cuando he estado tan perdida, incluso desde la distancia y por tener siempre un <<prueba con...>>, incluso cuando los astros no estaban de nuestra parte. Nadie se imagina cuántas condiciones encierra una purificación o una “simple” PCR.

Gracias a Antonio Zafra, por toda su ayuda, por hacerme el trabajo más llevadero, gracias por todas esas horas compartidas en barrera, por todos los ánimos y por esas llamadas al café matutino tan necesarias.

Gracias a Isa por escucharme y saber cuándo dejarme hablar hasta que yo misma me contestaba. Tu capacidad de trabajo y tu razonamiento analítico siempre serán un ejemplo para mí.

Gracias a Cloti por enseñarme a pelear con el confocal y con los western blot. Gracias por tu brutal sinceridad y por no dejar que faltara a PMC.

Gracias a Gema por enseñarme cultivos, por tus llamamientos al orden y la limpieza y por mostrarme que un buen baidoteo lo arregla casi todo.

Gracias a Verónica por todos los mimos, las palabras de aliento y los masajes, por tu cálida energía y por ser mi compañera de exámenes.

Gracias a Ainara, Maria Grazia, Sakthi y Roberto cp por regalarme tantos buenos momentos dentro del laboratorio, y tantísimos fuera de él. Porque hicisteis muy fácil pasar días enteros en el laboratorio, porque aprendí mucho en todas esas charlas, disfruté de todas esas cenas y me divertí aún más en las excursiones. Gracias por esa comida “quemada”, ese poco español que lanzaba grandes verdades y “meter tanta mierda”. Gracias por hacer muchísimo más llevadero el duro camino, por hacerme llorar y reír al mismo tiempo, por vuestra inestimable amistad y por ser parte hoy y siempre de mi vida.

Gracias a Roberto sp por su lógica aplastante y por todas las lecciones de vida y de saber estar. Gracias por darme perspectiva tantas veces y hacerme reír tantísimas otras.

Gracias a Ángeles, Angelina, la mama, Wendy, la no ferrerina, la WEN. Gracias por esas comidas de los viernes y no viernes, por llevarlo todo *beyond*, por compartir tu rico mundo interior y por ser un ejemplo de esfuerzo. Porque a pesar de tus cansados suspiros, tu capacidad para no parar y cumplir con tu vorágine de agenda me sigue fascinando.

Gracias a los ferrerines 2.0, versión actualizada. Gracias a Eva, Laura, Maggie, “Sandra”, “Dani”, Gloria y Simona. Gracias por vuestra infinita paciencia conmigo, aguantar mis interminables explicaciones, mis airados cabreos y mis manías de veterana. Por apoyarme, animarme y consolarme tantas veces. Gracias por montar una segunda “familia” cuando todo el laboratorio cambió y más desubicada me encontré.

Gracias a Sara por dejarse liar para el artículo, por su inestimable ayuda, por darme a conocer a Las Chillers y junto con David gracias por todas las correcciones y recomendaciones para esta tesis.

Gracias a las “antalgénicas”, Tania, Ana, Moni, Cristina, Luci, Isa, Nuria y Vero, por venir a “robar” con tanta gracia y salero, hacerme sonreír tantas veces y por ser vosotras. Sois fantásticas.

Más allá del laboratorio, infinitas gracias a mis padres y a mi hermana. Porque me han enseñado a perseguir siempre lo que más me gustara, pasara lo que pasara. Porque es por ellos que soy una cabezota redomada, que pone todo su esfuerzo para que las cosas estén bien hechas. Porque incluso sin entender muy bien qué hacía con los ratones, por qué estaba hasta las tantas en el laboratorio o por qué tenía que venir los domingos, me han apoyado y animado cada segundo. Gracias por toda vuestra confianza, amor y por ser mi mayor y mejor ejemplo de vida.

Gracias a mis “marcianos”, Encarni, Cristina, Pepelu, Mari Jose y en especial gracias a Laura. Gracias por estar siempre ahí, por recordarme que no todo es ciencia y por saber cuándo regañarme o darme ánimo.

Y un GRACIAS en mayúsculas a ti, David. Porque esta tesis es tan tuya como mía. Porque si yo he puesto la mente y el trabajo, tú has puesto todo el corazón y aliento que has sido capaz para hacerme aguantar y seguir. Por todas las veces que me has ayudado en mis “inseguritis”, que me has consolado en los días malos o frustrantes y por obligarme a celebrar cada pequeño éxito. Por todos los abrazos, los mimos y los ánimos. Gracias por acompañarme en cada paso y ayudarme en todo momento. Te quiero infinito.

Gracias a todos los que me he podido dejar en el tintero pero que me han ayudado en todo este tiempo.

Y gracias a Sam, a Jack y a Roquefort. Siempre tendréis un rincón especial en mi corazón.