

Caracterización morfológica, inmunocitoquímica y funcional de cultivos primarios de neuronas del ganglio de la raíz dorsal de rata adulta *in vitro*

Diana Marcela Leon¹, Sandra Milena Duitama¹, Zulma Casas¹ Yolima Torres¹, Sonia Luz Albarracín¹ & Jhon J Sutachan^{1*}

¹ Grupo de Bioquímica Experimental y Computacional. Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Cra 7ª No 43-82, Bogotá D.C., Colombia.

*sutacj01@javeriana.edu.co

Palabras claves: Neuronas, DRG, dolor, TRPV1, TRPA1

Resumen

El dolor es uno de los síntomas más prevalentes en diversas enfermedades. TRPV1 (Receptor de potencial transitorio vaniloide 1) se ha estudiado ampliamente en la transducción del dolor. Recientemente, se ha encontrado evidencia científica de que diferentes tipos de cannabinoides utilizados para el control del dolor pueden regular TRPV1. Sin embargo, no existe evidencia suficiente para establecer los mecanismos de regulación que producen los extractos de cannabis sobre TRPV1.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto regulador de extractos de cannabis con diferentes proporciones de tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) sobre las transientes de Ca²⁺ generadas por la activación del TRPV1 expresado en neuronas nociceptivas del ganglio de la raíz dorsal de rata adulta *in vitro*.

Inicialmente, se realizó una caracterización morfológica, inmunocitoquímica y funcional con el fin de determinar las poblaciones neuronales del cultivo para establecer una correlación entre las neuronas y la respuesta evidenciada al exponerlas a los extractos. Alrededor del 90% de las neuronas tuvieron un diámetro menor o igual a 30 µm, el 75.3% fueron de tipo no peptidérgico y se evidenció una expresión de TRPV1 del 80.19%. De esta manera, el cultivo se caracterizó por estar constituido presumiblemente de neuronas nociceptivas no peptidérgicas TRPV1+.

Para determinar si los extractos tenían la capacidad de generar un aumento en la concentración neuronal de calcio intracelular [Ca²⁺]_i perse, las neuronas fueron expuestas a cada extracto a diferentes concentraciones. Se observó un aumento en la [Ca²⁺]_i cuando las neuronas fueron expuestas a un extracto rico en CBD (M10) a concentraciones de 30 y 50 µg/mL. Así mismo, se evidenció que la concentración del extracto M10 fue directamente proporcional al efecto evidenciado en las transientes de Ca²⁺, es decir que a mayor concentración del extracto mayor fue la transiente de Ca²⁺.

Para evaluar el efecto del extracto M10 sobre la actividad de TRPV1, se realizó una estimulación con capsaicina 0.2 μ M en presencia del extracto a una concentración de 1, 10, 30 y 50 μ g/mL. Se observaron cambios en la cinética de recaptación de Ca²⁺ en todas las concentraciones, lo que sugiere que el extracto modula mecanismos corrientes abajo de la activación del receptor TRPV1. Así mismo, se evidenció que el efecto generado por el extracto M10 sobre las transientes de Ca²⁺ de TRPV1 es dependiente de la concentración del extracto, dado que a una concentración de 30 μ g/mL se evidenció una atenuación de la respuesta ante el estímulo con capsaicina e inclusive la eliminación de la transiente de Ca²⁺. Sin embargo, de manera interesante a una concentración de 50 μ g/mL se obtuvieron resultados heterogéneos debido a que se observaron respuestas atenuadas y en su mayoría aumentadas ante la estimulación con capsaicina en presencia del extracto, lo que supone que los mecanismos que emplea el extracto para la modulación de las transientes de Ca²⁺ de TRPV1 tienen vías independientes de regulación dependiendo de la concentración del extracto y estas vías pueden estar sujetas al tipo de neuronas ya sea peptidérgica o no peptidérgica.

De esta forma, este estudio cumple con el propósito de poder encontrar evidencia de que los extractos de cannabis pueden tener un efecto regulador sobre la función de TRPV1. En el caso particular del estudio, el extracto rico en CBD resulta ser un candidato promisorio como futuro modulador de TRPV1 evidenciado a través de los cambios producidos en la cinética de recaptación de Ca²⁺ y en la eliminación, atenuación o aumento de la respuesta de la capsaicina cuando ha habido un pretratamiento con el extracto.

Introducción

El dolor según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con, o similar a la asociada con, daño tisular real o potencial. Es un síntoma que puede llegar a afectar aspectos biológicos, psicológicos y sociales en la vida del paciente (Pain, 2020).

Aunque el dolor puede afectar cualquier población independiente de la edad, sexo, ubicación geográfica y raza, entre otros factores, varios estudios epidemiológicos a nivel mundial han mostrado diferencias en la percepción que pueden estar asociadas a la naturaleza sensorial subjetiva del síntoma (Goldberg & McGee, 2011). Por ejemplo, la prevalencia de dolor crónico en Estados Unidos es del 20.5% (Yong et al., 2022), 26.8% en Dinamarca (Kurita et al., 2012), 13-50% en Reino Unido (Fayaz et al., 2016) y 39.3% en Japón (Inoue et al., 2015). Sin embargo, en algunos países latinoamericanos se reportan prevalencias inclusive mayores como es el caso de Colombia con un 59% (IX Estudio del dolor en Colombia, 2015) y Brasil donde puede llegar hasta un 76% (Carvalho et al., 2018). Según varios estudios, el dolor de espalda es el dolor crónico que se presenta con mayor frecuencia en el mundo (Carvalho et al., 2018; El-Metwally et al., 2019; Tsang et al., 2008;

Yong et al., 2022). Debido a las limitaciones y complicaciones que puede generar el dolor en la vida de los pacientes, el estudio sobre la carga mundial de enfermedades en 2016 catalogó al dolor como la principal causa de discapacidad a nivel mundial (Collaborators, 2017).

Teniendo en cuenta que el dolor es un problema de salud pública, existen diferentes estrategias para el manejo de este, como es el uso de analgésicos. Los analgésicos más comunes para el tratamiento del dolor son los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los opioides, antiepilépticos y los inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina (Carter et al., 2014). Aunque los fármacos mencionados han mostrado tener un efecto positivo sobre la regulación del dolor, varios de ellos se caracterizan por el desarrollo de efectos secundarios. Para el caso de los AINEs, que constituyen uno de los grupos de analgésicos más ampliamente usados, se reporta un incremento en el riesgo de desarrollo de úlceras gastrointestinales, falla renal aguda y cardíaca (Marcum & Hanlon, 2010; Vonkeman & van de Laar, 2010). Por otro lado, los efectos secundarios asociados al uso de opioides que se reportan son somnolencia, sedación, xerostomía, náuseas, vomito, constipación e incluso delirio (Corli et al., 2016; Corli et al., 2018; Tanaka et al., 2017).

Dada la existencia de efectos secundarios asociados a los fármacos usados actualmente para el manejo del dolor, los riesgos asociados al medicamento (Barth et al., 2017) y un incremento exponencial de sobredosis con desenlace fatal y fracasos en los tratamientos (Mattson et al., 2021), se hace necesaria la búsqueda de nuevas moléculas que puedan modular las vías de transducción del dolor a diferentes niveles, con el fin de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

La regulación de los nociceptores es uno de los niveles que ha cobrado importancia para la modulación de dolor. Los nociceptores son neuronas sensitivas primarias, cuyos somas se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal o en los ganglios del trigémino, que están encargadas de mediar el inicio de la señalización de un estímulo nocivo (Mickle et al., 2016). Estas neuronas se caracterizan por la expresión de receptores de potencial transitorio (TRP), que son una familia de receptores encargados de transducir estímulos nocivos (Mickle et al., 2016).

Los TRP se caracterizan por ser canales iónicos no selectivos con una permeabilidad relativamente alta a Ca^{2+} y con la particularidad de que son polimodales, es decir que diferentes tipos de estímulos sensoriales tienen la capacidad de activarlos. Existen 6 subfamilias en mamíferos que están expresados en diferentes tejidos (Hasan & Zhang, 2018). El primer receptor de potencial transitorio en ser identificado fue el receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1), por David Julius en 1997. El TRPV1 ha sido ampliamente estudiado en la transducción del dolor agudo y crónico en diferentes patologías y por esto su regulación se ha considerado como posible blanco terapéutico (Shuba, 2020).

Se ha encontrado que diferentes moléculas endógenas y exógenas pueden funcionar como agonistas o antagonistas de los receptores TRPV1. Tanto los agonistas como los antagonistas pueden tener efecto antinociceptivo, debido a que los antagonistas inhiben la función del receptor (como es el caso de la capsazepina), mientras que la estimulación repetida con agonistas pueden desensibilizar el canal, como sucede con la capsaicina (Hasan & Zhang, 2018; Shuba, 2020).

Existen diversas moléculas reguladoras del receptor TRPV1 que se encuentran en fases preclínicas o clínicas. Dentro de estas se encuentran la capsaicina (Anand & Bley, 2011), capsazepina (Hara et al., 2013), AMG9810 (Wu et al., 2013) y AZD-1386 (Gavva et al., 2008). Además, existen reportes de metabolitos extraídos de plantas diferentes a la capsaicina como la resiniferatoxina (Raisinghani et al., 2005), resveratrol (Yaodong Zhang et al., 2021), baicalina (Wang et al., 2020), quercetina (Gao et al., 2016), puerarina (Wu et al., 2019), decursina (Son et al., 2021) y extractos completos o una mezcla de varios, como es el caso de *Corydalis saxicola* (Kuai et al., 2020) y JIO17 (Mezcla de *Aconitum carmichaelii*, *Angelica gigas* y *Zingiber officinale*) (Lee et al., 2021).

A pesar de los esfuerzos que se han realizado para encontrar compuestos que puedan regular el dolor a través de la modulación de TRPV1, aún no existe un fármaco que sea seguro y eficiente debido a que los evaluados generan efectos secundarios como sensación de quemazón y eritema (Anand & Bley, 2011) o no logran tener un efecto analgésico lo suficientemente potente (Miller et al., 2014). De esta manera, surge la necesidad de buscar moléculas diferentes a las previamente evaluadas.

Recientemente, se ha demostrado que diferentes tipos de cannabinoides y terpenos provenientes de extractos de cannabis tienen la capacidad de regular los receptores TRPV1. Se ha descrito que el cannabidiol, cannabigerol y la tetrahidrocannabivarina presentes en el cannabis tienen la capacidad de modular a TRPV1, como compuestos puros y como compuestos mayoritarios en mezclas (Anand et al., 2020; De Petrocellis et al., 2011). Así mismo, terpenos como el β -mirceno, β -cariofileno y nerolidol modulan la actividad del receptor (El-Hammadi et al., 2022; Jansen et al., 2019). En ambos casos, tanto cannabinoides como terpenos se comportan como agonistas del receptor. Sin embargo, en el cannabis no sólo se encuentran los compuestos mencionados sino que existe una gran cantidad de metabolitos bastante amplia; por ejemplo, para la especie *Cannabis sativa* se han descrito más de 500 compuestos (Booth & Bohlmann, 2019), los cuales se han asociado con un efecto “entourage”, el cual se basa en la actividad sinérgica de varios compuestos que dan como resultado la modulación de una o varias vías metabólicas. El efecto mencionado representa una oportunidad para el cannabis en términos de generación de nuevas estrategias terapéuticas.

Ante la falta de estudios que evalúen la capacidad de modulación que tienen los extractos de cannabis sobre el receptor TRPV1, el objetivo de este estudio fue el de evaluar el efecto regulador que tienen extractos de cannabis con diferentes proporciones de

tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) sobre las transientes de calcio generadas por la activación de TRPV1 expresado en neuronas nociceptivas adultas del ganglio de la raíz dorsal de rata adulta in vitro.

Materiales y Métodos

Cultivo primario de neuronas nociceptivas del ganglio de la raíz dorsal de rata adulta

Se realizó la extracción de la columna de ratas Wistar machos y hembras adultas de 7 a 15 semanas de vida, con un peso de alrededor de 300-500 g, las cuales fueron previamente eutanizadas por la Unidad de Biología Comparativa (UBC) de la Pontificia Universidad Javeriana. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado de Animales (CICUA).

Los ganglios de la raíz dorsal se extrajeron desde la zona cervical hasta la zona lumbar después de realizar tres cortes en la columna, dos para poder extraer la apófisis espinosa y uno en el centro del cuerpo de la vértebra para poder acceder a los ganglios de la raíz dorsal ubicados en el orificio o foramen intervertebral (Figura 5). La extracción se hizo en buffer fosfato salino pH 7.4 (En M: NaH₂PO₄: 0.01, K₂HPO₄: 0.0018, KCl: 0.0027, NaCl: 0.137).

Después de la extracción de los GRD bajo estereoscopio se cortaron las raíces nerviosas, con el fin de evitar el crecimiento de células no neuronales. A continuación, los ganglios fueron disociados enzimáticamente con colagenasa 5mg/mL (GIBCO) durante 1 hora y posteriormente con tripsina 2,5% v/v (GIBCO) durante 10 minutos, a 37°C bajo agitación a 150 rpm. Posteriormente, se realizó una disociación mecánica con pipetas Pasteur y neutralización de las enzimas con medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% SFB (EUROBIO), 1 mM de L-Glutamina (GIBCO), 1 mM de Piruvato de sodio (GIBCO). Luego, las muestras se centrifugaron por 5 minutos a 1200 rpm, el pellet se resuspendió en DMEM suplementado y las células se sembraron en vidrios o placas previamente tratados por Poli-D-Lisina a 0.1mg/mL (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ hasta el momento del experimento.

Inmunocitoquímica

Después de 24 horas de incubación, el cultivo fue lavado con buffer fosfato salino pH 7.4 (En M: NaH₂PO₄: 0.01, K₂HPO₄: 0.0018, KCl: 0.0027, NaCl: 0.137) durante 5 minutos y posteriormente fue fijado con paraformaldehído 4% (pH 7.4) por 10 minutos. A continuación, se realizaron dos lavados con buffer fosfato salino durante 5 minutos cada lavado y se permeabilizó por 5 minutos con Tritón X-100 al 0.3%. Luego, las muestras fueron bloqueadas con BSA al 2% (Sigma-Aldrich) durante 1 hora e incubadas toda la noche con el anticuerpo primario anti-NeuN 1:1000 – (R&D Systems) a 4°C. Después de dos lavados con buffer fosfato salino fueron incubadas con el anticuerpo secundario Alexa-Fluor 488 – Goat Antirabbit (1:1000 - Invitrogen) ó Alexa-Fluor 568 Goat Antirabbit (1:1000 – Invitrogen). Finalmente, los núcleos se marcaron con Hoechst y las muestras se montaron con Prolong®

en láminas portaobjetos para ser visualizadas a 20X y 40X con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Observer acoplado a una cámara AxioScope. Las imágenes fueron procesadas en el software ImageJ.

Para la detección de neuronas isolectina B4 positivas (IB4+), el cultivo se incubó con 10 µg/mL de Isolectina B4 de Griffonia simplicifolia conjugada a Alexa Fluor 488 protegido de la luz a temperatura ambiente durante 10 minutos de. Una vez culminado el tiempo, se inició con el proceso de inmunocitoquímica previamente mencionado.

Ensayos Funcionales

Debido a que el anticuerpo anti-TRPV1 no fue específico, se realizaron ensayos de imágenes de calcio para determinar el porcentaje de neuronas del GRD que expresaron el receptor. Adicionalmente, se usaron ensayos de imágenes de calcio para determinar la capacidad que tienen los extractos de cannabis con diferentes proporciones de THC y CBD de modular la actividad de los TRPV1. Para lo anterior, las neuronas del GRD fueron cargadas con Fura-2AM (ThermoFisher) a una concentración de 3 µM durante 30 minutos a 37°C y 5% CO₂. Las neuronas fueron perfundidas con una solución extracelular estándar constituida por (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 5 NaHCO₃, 10 HEPES, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 Glucosa (pH 7.4 a 37°C). Los experimentos fueron llevados a cabo a 37°C en una cámara cerrada montada sobre un microscopio invertido Nikon Diaphot 300. Para evaluar los cambios en los niveles intracelulares de Ca²⁺, las neuronas del GRD cargadas con Fura-2AM fueron excitadas a 340 y 380 nm a una frecuencia de 500 ms. La emisión a 510 nm fue colectada usando una cámara Coolsnap HQ2.

Para la determinación del porcentaje de neuronas que expresan TRPV1, las neuronas fueron expuestas a un máximo de 2 estímulos con capsaicina a una concentración de 0.2 µM durante 1 minuto. El primer pulso se realizó con el fin de identificar qué neuronas expresaban TRPV1, seguido de un lavado durante 10 minutos y se realizó posteriormente un segundo pulso con el agonista bajo las condiciones mencionadas. El objetivo de realizar el experimento con pulsos pareados tuvo como fin determinar la proporción de neuronas que se recuperaron después del primer estímulo, así como la proporción de las que respondieron al segundo estímulo. Los registros fueron graficados y analizados usando GraphPad Prism 9.2.0.

Para la evaluación del efecto de los extractos de cannabis sobre los TRPV1, después del primer estímulo con capsaicina y del lavado, las neuronas del GRD se pretrataron durante 10 minutos con cada uno de los extractos a 0.01, 1, 10, 30 y 50 µg/mL. Posteriormente, se realizó el segundo estímulo con capsaicina en presencia del extracto. Las respuestas de los estímulos pareados fueron analizadas como se describió anteriormente. Al final del experimento se realizó una estimulación con KCl 50 mM, durante 2 minutos, para corroborar que las transientes de ca²⁺ observadas fueran generadas por neuronas (Figura 8).

Análisis estadísticos

Los resultados se presentan como promedio \pm SEM. La significancia estadística entre dos grupos fue determinada con la prueba de Mann-Whitney. Los valores de P se describen en cada prueba realizada.

Resultados

Caracterización del cultivo primario de neuronas del ganglio de la raíz dorsal en rata.

Para determinar el efecto regulador que tuvieron los extractos sobre las transientes de Ca^{2+} de las neuronas del GRD fue indispensable realizar una caracterización del cultivo con el fin de establecer el tipo de poblaciones neuronales que sobrevivían al aislamiento. Conocer el grupo de neuronas del cultivo y la forma en la cual responden a la capsaicina fue necesario para establecer y discriminar el efecto que tienen los extractos de cannabis con diferentes proporciones de THC y CBD sobre las diferentes poblaciones de DRG.

Para identificar las neuronas del GRD y realizar su caracterización por tamaño se utilizó el marcador NeuN (Proteína neuronal nuclear) el cual reconoce el núcleo y el soma de las neuronas. El análisis de tres cultivos diferentes mostro que la mediana del diámetro neuronal del soma de cada cultivo fue de 25.73, 22.10 y 21.07 μm . Así mismo, se estableció que el 89.8% de las neuronas del GRD tuvieron un diámetro \geq 30 μm (Figura 6).

Los resultados anteriores sugieren que la mayor proporción de neuronas del cultivo del GRD de rata adulta son de tipo pequeño, dado que como establece (Rostock et al., 2018) las neuronas pequeñas tienen un área del soma de 400 – 800 μm^2 , lo cual equivale a tener un diámetro del cuerpo de la neurona entre 22 y 32 μm .

Perfil de distribución de neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas

Dentro de las neuronas de tamaño pequeño que se encuentran en los GRD se ha reportado la existencia de neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas (Zylka, 2005). Para el estudio realizado fue importante determinar la proporción de cada una de estas poblaciones debido a que los péptidos perse pueden alterar la función de los TRPs a través de un mecanismo que involucra la liberación de citoquinas proinflamatorias que sensibilizan el receptor (Malek et al., 2015; Zhao et al., 2019), y promueven y/o potencializan estados inflamatorios como los fenómenos de extravasación de plasma y migración granulocitaria (Sato et al., 2018; Wick et al., 2006).

Uno de los marcadores más empleados para diferenciar las neuronas peptidérgicas de las no peptidérgicas es la isolectina B4 (IB4) que tiene la capacidad de unirse a residuos de galactosa ubicados en la superficie de la membrana de las neuronas no peptidérgicas. Con el fin de identificar el porcentaje de neuronas IB4 positivas (IB4+) en el cultivo, se realizó un doble marcaje con NeuN e IB4 acoplado a Alexa Fluor 488 (Figura 7A). Se encontró que un 75.3% de las neuronas eran IB4+. Debido a que el tamaño neuronal es una de las variables

que tienen más interés en el estudio dado que las neuronas del GRD de diámetro pequeño están involucradas en la nocicepción, se realizó un análisis del diámetro de las poblaciones IB4+ e IB4-.

Los resultados obtenidos muestran que existen diferencias entre los perfiles de tamaño de las poblaciones neuronales IB4+ e IB4- (Figura 7C). La población IB4+ se caracterizó porque el 95.8% tuvo un tamaño $\approx 30 \mu\text{m}$. En contraste, la población IB4- fue más heterogénea en su tamaño ya que el diámetro de las neuronas osciló de 20 a 85 μm , en donde tan solo el 32.64% correspondió a la población de un tamaño $\approx 30 \mu\text{m}$, sugiriendo que en este grupo de neuronas pueden encontrarse tanto neuronas involucradas en la transducción del dolor (neuronas pequeñas) como neuronas encargadas de sensor estímulos mecánicos y térmicos no necesariamente nocivos (neuronas grandes). De acuerdo con lo anterior, los resultados sugieren que el cultivo se caracteriza por tener un mayor número de neuronas del GRD no peptidérgicas de tamaño pequeño, con lo cual se puede inferir que posiblemente se trata de neuronas encargadas de transducir procesos nociceptivos.

Caracterización funcional de la expresión de TRPV1

La expresión de TRPV1 en las neuronas del GRD no es homogénea (Hwang et al., 2005a), por tanto se realizó una caracterización funcional del receptor. Para lo anterior, se hicieron ensayos de imágenes de calcio en los cuales se determinó el porcentaje de neuronas del GRD que expresaron los TRPV1 a través de un estímulo con capsaicina (0.2 μM). Para confirmar que la respuesta al agonista se obtuvo de una neurona, se realizó una estimulación final con KCl 50mM (Figura 9A). Cabe resaltar que la evaluación de la actividad es indirecta dado que no se evalúan las corrientes del canal, sino las transientes de Ca^{2+} generadas por la activación del receptor (Hasan & Zhang, 2018).

Los resultados obtenidos mostraron que alrededor del 80% de las neuronas del GRD de rata adulta en cultivo respondieron a la estimulación con el agonista del receptor TRPV1, capsaicina. El 94% de estas neuronas TRPV1+ tuvieron un tamaño $\approx 30 \mu\text{m}$. Por otro lado, la población TRPV1- se caracterizó por tener una distribución de tamaños más heterogénea, ya que los diámetros de las neuronas estuvieron entre 22-50 μm , donde el 61.9% tuvo un diámetro $\approx 30 \mu\text{m}$ (Figura 9).

El receptor TRPV1 se caracteriza porque puede sensibilizarse o desensibilizarse dependiendo del contexto en el que se activa, la frecuencia del estímulo y concentración del agonista. Para evaluar si los receptores se desensibilizaban o sensibilizaban ante un segundo estímulo, las neuronas del GRD fueron estimuladas con pulsos pareados de capsaicina [0.2 μM] separados por un lavado de 10 minutos con solución extracelular estándar.

Similar a lo obtenido con anterioridad, el 80% de las neuronas respondieron al primer estímulo con capsaicina. Sin embargo, tan solo el 40% de las neuronas tuvieron la capacidad de regresar a la línea base original (Figura 9A, trazo negro; Figura 10B). Adicionalmente,

no se evidenció diferencia en el tamaño de las neuronas que se recuperaron y las que no (Figura 10E). De las neuronas que tuvieron la capacidad de recuperarse, tan solo el 60% respondieron a un segundo estímulo con la capsaicina (Figura 10C).

Como los procesos de desensibilización y sensibilización de un receptor que funciona como un canal iónico se pueden ver reflejados también con la atenuación (no sólo con la ausencia) o aumento de la respuesta biológica respectivamente, se evaluaron los picos de la primera y segunda respuesta en las neuronas que se recuperaron después del primer estímulo y respondieron al segundo. Para este análisis se tuvo en cuenta que cada pico se halló como el máximo cambio detectado en la relación 340/380 nm desde la línea base. No se evidenció un cambio significativo entre los picos evaluados lo que sugiere que esta población neuronal no sufre procesos de desensibilización ni sensibilización ante un segundo estímulo con capsaicina (Figura 10G).

La caracterización funcional de TRPV1 en las neuronas del GRD de rata adulta en cultivo permitió concluir que la mayor expresión del receptor se da en las neuronas pequeñas, presumiblemente asociadas con procesos de transducción del dolor. Adicionalmente, bajo las condiciones en las que se realizaron los ensayos se evidenciaron procesos de desensibilización en algunas neuronas, los cuales se reflejan en la ausencia de respuesta ante un segundo estímulo con capsaicina.

Discusión

Los GRD se caracterizan por tener poblaciones neuronales heterogéneas que se caracterizan por transducir diferentes estímulos sensoriales y poseer tamaños y marcadores químicos diversos (Páez et al., 2021). Debido a lo anterior, se hace necesario realizar caracterizaciones del cultivo de las neuronas del GRD, ya que las poblaciones neuronales que sobreviven pueden variar con las condiciones del cultivo y la edad del individuo, lo que puede afectar la interpretación de las respuestas a diferentes estímulos. Así mismo, la caracterización cobra importancia debido a que se han reportado diferencias en el número de neuronas dependiendo de la especie. Por ejemplo, se ha reportado que los ganglios cervicales humanos C5 y C7 tienen entre 60.000 y 100.000 neuronas, respectivamente (West et al., 2012), mientras que en rata adulta los niveles C4, C5 y C6 contienen 7.508, 6.825 y 6.858 neuronas, respectivamente (Mille-Hamard et al., 1999). También existen diferencias en el número de neuronas dependiendo del nivel en el que se encuentre el GRD, es así como a diferencia de lo reportado en los niveles cervicales, en ratas se reportan de 10.500 a 11.000 neuronas en los niveles Lumbares L3 a L6 (Swett et al., 1991).

Es importante tener en cuenta, que el cultivo de GRD no sólo contiene neuronas sino también otro tipo de células como fibroblastos, linfocitos T y B, células gliales satélite y macrófagos, entre otros (Haberberger et al., 2019).

Se ha reportado una proporción alta de neuronas pequeñas en los GRD, es así como Giacobassi et al., (2020) reportó que el 94% de las neuronas presentes en el GRD de ratón

corresponden a neuronas pequeñas encargadas de la transducción del dolor, estos resultados son similares a los encontrados en este estudio, ya que alrededor del 90% de las neuronas del cultivo de GRD de rata adulta corresponden a neuronas de diámetro pequeño, es decir $\approx 30 \mu\text{m}$. Lo anterior se puede confirmar con los hallazgos encontrados por Swett et al., (1991) dado que reportó que el tamaño promedio de neuronas de rata fue de $29 \mu\text{m}$.

Por otro lado, algunas especies comparten las distribuciones de los perfiles de tamaños neuronales presentes en los GRD como es el caso de la rata y los titíes (Kudo et al., 2021),. De esta manera, los resultados de este estudio pueden servir para extrapolarse en otras investigaciones en las que se tengan como interés conocer el perfil de distribución neuronal para correlacionar los resultados encontrados con el tipo de neuronas presentes en el cultivo.

Las neuronas nociceptivas pueden ser clasificadas como peptidérgicas o no peptidérgicas. Para su identificación se utilizan diferentes marcadores como la sustancia P (SP) y el péptido del gen relacionado con la calcitonina (CGRP) para las primeras y la isolectina B4 (IB4) y P2X3R (Receptor de ATP que actúa como canal catiónico activado por ligando) para las últimas. Aunque el uso de estos marcadores es ampliamente utilizado, se ha reportado el solapamiento de estos en diferentes especies. Por ejemplo, en ratones se identificó un solapamiento de $\sim 15\%$ entre CGRP y P2X3R (Shiers et al., 2020), en humanos de un 33% entre CGRP y P2X3R (Shiers et al., 2021), en ratas alrededor del 45% entre IB4 y CGRP-SP (Price & Flores, 2007) y en esta especie incluso puede llegar a ser del 60% en neuronas del GRD a la altura de L6 (Hwang et al., 2005b).

Los marcadores mencionados anteriormente se encuentran asociados a neuronas con fibras amielínicas y en un pequeño porcentaje a neuronas con fibras mielinizadas (Bae et al., 2015), sugiriendo que su expresión principalmente se da en neuronas pequeñas asociadas con procesos de nocicepción. Tal y como se evidenció en este estudio, Fang et al., (2006) reportaron distintas distribuciones en el tamaño de las neuronas que son IB4+ e IB4-. Mientras que las neuronas IB4+ se caracterizaron por ser neuronas pequeñas, la población de neuronas IB4- estaba compuesta por neuronas pequeñas, medianas y de gran tamaño. Lo anterior tiene implicaciones en términos del manejo del dolor ya que entre mayor sea el número de neuronas nociceptivas no peptidérgicas, menor será la liberación de péptidos relacionados con la generación y mantenimiento del dolor (Schou et al., 2017).

El porcentaje de expresión de TRPV1 reportado es variable, se han determinado porcentajes del 69% en rata (Hwang et al., 2005a), 48.2% en dromedario (Javed et al., 2021) y $\sim 60\%$ en humanos (Shiers et al., 2021). Es posible que en este estudio se haya detectado una mayor cantidad de neuronas nociceptivas que expresan el receptor TRPV1 (alrededor del 80%) debido a que la evaluación fue funcional y la técnica de imágenes de Ca^{2+} puede ser más sensible que la inmunocitoquímica, donde se encontró que la distribución de los TRPV1 en GRD puede variar de acuerdo al anticuerpo usado (Buckinx et al., 2013),.

Por otro lado, en la literatura se ha reportado que los TRPV1 presentan diferentes comportamientos frente a la estimulación con capsaicina. Por ejemplo, se han descrito procesos de desensibilización que incluso dan como resultado taquifilaxia ante repetidas estimulaciones o dosis altas de capsaicina y se ha establecido que estos procesos son dependientes de Ca^{2+} (Fischer et al., 2020; Tian et al., 2019). En este estudio se sugiere que las neuronas que no respondieron al segundo estímulo sufrieron un proceso de desensibilización del receptor. Así mismo, aunque la concentración de capsaicina en este estudio no fue alta, se observó que el 60% de las neuronas no pudieron recuperar los niveles de Ca^{2+} intracelular basal, lo cual sugiere que los procesos intracelulares de recaptación de Ca^{2+} se vieron alterados o los niveles de Ca^{2+} alcanzaron un nivel de toxicidad que pudo inducir apoptosis y muerte celular (Jancsó et al., 1977).

Una de las explicaciones para la heterogeneidad de las respuestas encontradas puede ser que la expresión de TRPV1 no es similar en todas las neuronas (Kobayashi et al., 2005) y la coexpresión con otros receptores se ha demostrado puede alterar el comportamiento del receptor, como es el caso de la regulación ejercida por la activación de TRPA1 sobre los receptores TRPV1 (Masuoka et al., 2017). Incluso el tamaño de la neurona puede jugar un papel ya que entre mayor sea el tamaño hay más área para la expresión de los canales.

La capsaicina constituye una estrategia terapéutica para el manejo del dolor ya que induce analgesia a través de la desensibilización y taquifilaxia del TRPV1 (Arora et al., 2021). Por lo anterior, encontrar compuestos que puedan generar un efecto similar es de gran importancia para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el manejo del dolor. Recientemente se ha descrito que los cannabinoides y terpenos son compuestos que se comportan como agonistas de TRPV1 (De Petrocellis et al., 2008), lo que sugiere su potencial uso para regular diferentes tipos de dolor.

Otra explicación a la heterogeneidad de las respuestas observadas en las transientes de Ca^{2+} con el extracto M10, puede ser debido a que aunque el 75.3% de las neuronas del cultivo fueron no peptidérgicas, el porcentaje restante corresponde a neuronas peptidérgicas en las cuales la regulación es más compleja dado que los péptidos pueden alterar la función de TRPV1 generando procesos de sensibilización (Malek et al., 2015; Zhao et al., 2019). Además, se ha descrito que las neuronas IB4+ difieren de las IB4- en cuanto a sus propiedades electrofisiológicas, dado que las IB4+ presentan velocidades de conducción más lentas y potenciales de membrana más negativos lo cual hace que sea más difícil generar un potencial de acción (Fang et al., 2006).

Como la regulación de TRPV1 es dependiente de Ca^{2+} (Hasan & Zhang, 2018), si desde otros mecanismos alternos a TRPV1 se induce el aumento de la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se sugiere que este incremento puede regular de manera negativa o a la baja la actividad del

receptor. Sin embargo, es indispensable tener en cuenta que el Ca^{2+} en concentraciones muy altas puede ser tóxico (Nita et al., 2016).

De esta manera, se propone que es posible que los mecanismos mediante los cuales estén actuando los extractos de cannabis (específicamente el extracto rico en CBD) sobre TRPV1 pueden ser de forma directa a través del receptor o indirecta a través de otros receptores como los receptores cannabinoides. Adicionalmente, es importante tener en cuenta que a 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto rico en CBD se generaron transientes de Ca^{2+} en poblaciones no neuronales, esto tiene una relevancia alta debido a que se ha identificado que puede existir regulación de células no neuronales sobre las neuronas, como es el caso de fibroblastos y células de Schwann (Rinwa et al., 2021; Zhang et al., 2022)

Agradecimientos

Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX, 2da Convocatoria Ecosistema Científico – Colombia Científica 792-2017. Programa “Generación de alternativas terapéuticas en cáncer a partir de plantas a través de procesos de investigación y desarrollo traslacional articulados en sistemas de valor sostenibles ambiental y económicamente” (Contrato No. FP44842-221-2018)

Bibliografía

- Anand, P., & Bley, K. (2011). Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Anaesth*, *107*(4), 490-502. <https://doi.org/10.1093/bja/aer260>
- Anand, U., Jones, B., Korchev, Y., Bloom, S. R., Pacchetti, B., Anand, P., & Sodergren, M. H. (2020). CBD Effects on TRPV1 Signaling Pathways in Cultured DRG Neurons. *J Pain Res*, *13*, 2269-2278. <https://doi.org/10.2147/JPR.S258433>
- Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front Plant Sci*, *7*, 19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Anil, S. M., Shalev, N., Vinayaka, A. C., Nadarajan, S., Namdar, D., Belausov, E., . . . Koltai, H. (2021). Cannabis compounds exhibit anti-inflammatory activity in vitro in COVID-19-related inflammation in lung epithelial cells and pro-inflammatory activity in macrophages. *Sci Rep*, *11*(1), 1462. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81049-2>
- Arora, V., Campbell, J. N., & Chung, M. K. (2021). Fight fire with fire: Neurobiology of capsaicin-induced analgesia for chronic pain. *Pharmacol Ther*, *220*, 107743. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107743>
- Bae, J. Y., Kim, J. H., Cho, Y. S., Mah, W., & Bae, Y. C. (2015). Quantitative analysis of afferents expressing substance P, calcitonin gene-related peptide, isolectin B4, neurofilament 200, and Peripherin in the sensory root of the rat trigeminal ganglion. *J Comp Neurol*, *523*(1), 126-138. <https://doi.org/10.1002/cne.23672>
- Bannister, K., & Dickenson, A. H. (2017). The plasticity of descending controls in pain: translational probing. *J Physiol*, *595*(13), 4159-4166. <https://doi.org/10.1113/JP274165>
- Barth, K. S., Guille, C., McCauley, J., & Brady, K. T. (2017). Targeting practitioners: A review of guidelines, training, and policy in pain management. *Drug Alcohol Depend*, *173* Suppl 1, S22-S30. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.08.641>
- Bautista, J. L., Yu, S., & Tian, L. (2021). Flavonoids in. *ACS Omega*, *6*(8), 5119-5123. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00318>
- Bell, A. (2018). The neurobiology of acute pain. *Vet J*, *237*, 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.05.004>
- Blackshaw, L. A., Brierley, S. M., & Hughes, P. A. (2010). TRP channels: new targets for visceral pain. *Gut*, *59*(1), 126-135. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.179523>
- Boadas-Vaello, P., Castany, S., Homs, J., Álvarez-Pérez, B., Deulofeu, M., & Verdú, E. (2016). Neuroplasticity of ascending and descending pathways after somatosensory system injury: reviewing knowledge to identify neuropathic pain therapeutic targets. *Spinal Cord*, *54*(5), 330-340. <https://doi.org/10.1038/sc.2015.225>
- Booth, J. K., & Bohlmann, J. (2019). Terpenes in Cannabis sativa - From plant genome to humans. *Plant Sci*, *284*, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.022>

- Buckinx, R., Van Nassauw, L., Avula, L. R., Alpaerts, K., Adriaensen, D., & Timmermans, J. P. (2013). Transient receptor potential vanilloid type 1 channel (TRPV1) immunolocalization in the murine enteric nervous system is affected by the targeted C-terminal epitope of the applied antibody. *J Histochem Cytochem*, 61(6), 421-432. <https://doi.org/10.1369/0022155413484764>
- Burstein, S. (2015). Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorg Med Chem*, 23(7), 1377-1385. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.059>
- Carnevale, V., & Rohacs, T. (2016). TRPV1: A Target for Rational Drug Design. *Pharmaceuticals (Basel)*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/ph9030052>
- Carter, G. T., Duong, V., Ho, S., Ngo, K. C., Greer, C. L., & Weeks, D. L. (2014). Side effects of commonly prescribed analgesic medications. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 25(2), 457-470. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2014.01.007>
- Carvalho, R. C. d., Bustamante Maglioni, C., Barbosa Machado, G., de Araújo, J. E., Torres da Silva, J. R., & Lourenço da Silva, M. (2018). **Prevalence and characteristics of chronic pain in Brazil: a national internet-based survey study.** *Br J Pain*, 1(4), 331-338. <https://doi.org/https://doi.org/10.5935/2595-0118.20180063>
- Cascini, F., & Boschi, I. (2017). Chapter e1 - Tetrahydrocannabinol Concentration and Genetic Characterization of Cannabis. In V. R. Preedy (Ed.), *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (pp. e1-e10). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00003-X>
- Cohen, S. P., & Mao, J. (2014). Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*, 348, f7656. <https://doi.org/10.1136/bmj.f7656>
- Collaborators, G. D. a. I. I. a. P. (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390(10100), 1211-1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2)
- Corli, O., Floriani, I., Roberto, A., Montanari, M., Galli, F., Greco, M. T., . . . collaborators), C. S. O. P. G. L. o. (2016). Are strong opioids equally effective and safe in the treatment of chronic cancer pain? A multicenter randomized phase IV 'real life' trial on the variability of response to opioids. *Ann Oncol*, 27(6), 1107-1115. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw097>
- Corli, O., Roberto, A., Bennett, M. I., Galli, F., Corsi, N., Rulli, E., & Antonione, R. (2018). Nonresponsiveness and Susceptibility of Opioid Side Effects Related to Cancer Patients' Clinical Characteristics: A Post-Hoc Analysis. *Pain Pract*, 18(6), 748-757. <https://doi.org/10.1111/papr.12669>
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A. S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., . . . Di Marzo, V. (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*, 163(7), 1479-1494. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x>
- De Petrocellis, L., Vellani, V., Schiano-Moriello, A., Marini, P., Magherini, P. C., Orlando, P., & Di Marzo, V. (2008). Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and

- melastatin type-8. *J Pharmacol Exp Ther*, 325(3), 1007-1015. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.134809>
- Doan, L., Manders, T., & Wang, J. (2015). Neuroplasticity underlying the comorbidity of pain and depression. *Neural Plast*, 2015, 504691. <https://doi.org/10.1155/2015/504691>
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*, 120(11), 3760-3772. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>
- Duvall, C. (2014). *Cannabis*. Reaktion Books.
- Dyck, G. J. B., Maayah, Z. H., Eurich, D. T., & Dyck, J. R. B. (2022). Understanding the Potential Benefits of Cannabidiol for Patients With Schizophrenia: A Narrative Review. *Schizophrenia Bulletin Open*, 3(1), sgab053. <https://doi.org/10.1093/schizbullopen/sgab053>
- El-Hammadi, M. M., Small-Howard, A. L., Jansen, C., Fernández-Arévalo, M., Turner, H., & Martín-Banderas, L. (2022). Potential use for chronic pain: Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) nanoparticles enhance the effects of Cannabis-Based terpenes on calcium influx in TRPV1-Expressing cells. *Int J Pharm*, 616, 121524. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121524>
- El-Metwally, A., Shaikh, Q., Aldiab, A., Al-Zahrani, J., Al-Ghamdi, S., Alrasheed, A. A., . . . Aldossari, K. K. (2019). The prevalence of chronic pain and its associated factors among Saudi Al-Kharj population; a cross sectional study. *BMC Musculoskelet Disord*, 20(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12891-019-2555-7>
- Fang, X., Djouhri, L., McMullan, S., Berry, C., Waxman, S. G., Okuse, K., & Lawson, S. N. (2006). Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression. *J Neurosci*, 26(27), 7281-7292. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1072-06.2006>
- Fayaz, A., Croft, P., Langford, R. M., Donaldson, L. J., & Jones, G. T. (2016). Prevalence of chronic pain in the UK: a systematic review and meta-analysis of population studies. *BMJ Open*, 6(6), e010364. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010364>
- Fischer, M. J. M., Ciotu, C. I., & Szallasi, A. (2020). The Mysteries of Capsaicin-Sensitive Afferents. *Front Physiol*, 11, 554195. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.554195>
- Fletcher, D., Stamer, U. M., Pogatzki-Zahn, E., Zaslansky, R., Tanase, N. V., Perruchoud, C., . . . Anaesthesiology, e. g. f. t. C. T. N. g. o. t. E. S. o. (2015). Chronic postsurgical pain in Europe: An observational study. *Eur J Anaesthesiol*, 32(10), 725-734. <https://doi.org/10.1097/EJA.0000000000000319>
- Flores-Sanchez, I. J., & Verpoorte, R. (2008). PKS activities and biosynthesis of cannabinoids and flavonoids in *Cannabis sativa* L. plants. *Plant Cell Physiol*, 49(12), 1767-1782. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn150>
- Fukumoto, S., Sawasaki, E., Okuyama, S., Miyake, Y., & Yokogoshi, H. (2006). Flavor components of monoterpenes in citrus essential oils enhance the release of monoamines from rat brain slices. *Nutr Neurosci*, 9(1-2), 73-80. <https://doi.org/10.1080/10284150600573660>

- Gan, T. J. (2017). Poorly controlled postoperative pain: prevalence, consequences, and prevention. *J Pain Res*, 10, 2287-2298. <https://doi.org/10.2147/JPR.S144066>
- Gao, W., Zan, Y., Wang, Z. J., Hu, X. Y., & Huang, F. (2016). Quercetin ameliorates paclitaxel-induced neuropathic pain by stabilizing mast cells, and subsequently blocking PKC ϵ -dependent activation of TRPV1. *Acta Pharmacol Sin*, 37(9), 1166-1177. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.58>
- Gavva, N. R., Treanor, J. J., Garami, A., Fang, L., Surapaneni, S., Akrami, A., . . . Davar, G. (2008). Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain*, 136(1-2), 202-210. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.01.024>
- Giacobassi, M. J., Leavitt, L. S., Raghuraman, S., Alluri, R., Chase, K., Finol-Urdaneta, R. K., . . . Olivera, B. M. (2020). An integrative approach to the facile functional classification of dorsal root ganglion neuronal subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(10), 5494-5501. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911382117>
- Goldberg, D. S., & McGee, S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*, 11, 770. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-770>
- Gonçalves, T. C., Benoit, E., Partiseti, M., & Servent, D. (2018). Corrigendum: The Na. *Front Pharmacol*, 9, 1241. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01241>
- Haberberger, R. V., Barry, C., Dominguez, N., & Matusica, D. (2019). Human Dorsal Root Ganglia. *Front Cell Neurosci*, 13, 271. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00271>
- Hara, T., Chiba, T., Abe, K., Makabe, A., Ikeno, S., Kawakami, K., . . . Taguchi, K. (2013). Effect of paclitaxel on transient receptor potential vanilloid 1 in rat dorsal root ganglion. *Pain*, 154(6), 882-889. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.02.023>
- Hasan, R., & Zhang, X. (2018). Ca. *Int J Mol Sci*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19041256>
- Hazekamp, A., Fishedick, J. T., Díez, M. L., Lubbe, A., & Ruhaak, R. L. (2010). 3.24 - Chemistry of Cannabis. In H.-W. Liu & L. Mander (Eds.), *Comprehensive Natural Products II* (pp. 1033-1084). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00091-5>
- Hudson, R., Renard, J., Norris, C., Rushlow, W. J., & Laviolette, S. R. (2019). Cannabidiol Counteracts the Psychotropic Side-Effects of Δ -9-Tetrahydrocannabinol in the Ventral Hippocampus through Bidirectional Control of ERK1-2 Phosphorylation. *J Neurosci*, 39(44), 8762-8777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0708-19.2019>
- Hwang, S. J., Oh, J. M., & Valtschanoff, J. G. (2005a). Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents. *Brain Res*, 1047(2), 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.036>
- Hwang, S. J., Oh, J. M., & Valtschanoff, J. G. (2005b). The majority of bladder sensory afferents to the rat lumbosacral spinal cord are both IB4- and CGRP-positive. *Brain Res*, 1062(1-2), 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.09.026>

- Inoue, S., Kobayashi, F., Nishihara, M., Arai, Y. C., Ikemoto, T., Kawai, T., . . . Ushida, T. (2015). Chronic Pain in the Japanese Community--Prevalence, Characteristics and Impact on Quality of Life. *PLoS One*, *10*(6), e0129262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129262>
- IX *Estudio del dolor en Colombia.* (2015). <https://dolor.org.co/biblioteca/encuestas/ixestudio.pdf>
- Jancsó, G., Kiraly, E., & Jancsó-Gábor, A. (1977). Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*, *270*(5639), 741-743. <https://doi.org/10.1038/270741a0>
- Jansen, C., Shimoda, L. M. N., Kawakami, J. K., Ang, L., Bacani, A. J., Baker, J. D., . . . Turner, H. (2019). Myrcene and terpene regulation of TRPV1. *Channels (Austin)*, *13*(1), 344-366. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1654347>
- Javed, H., Rehmathulla, S., Tariq, S., Ali, M. A., Emerald, B. S., & Shehab, S. (2021). Co-localization of nociceptive markers in the lumbar dorsal root ganglion and spinal cord of dromedary camel. *J Comp Neurol*, *529*(17), 3710-3725. <https://doi.org/10.1002/cne.25240>
- Jones, S. L. (1991). Descending noradrenergic influences on pain. *Prog Brain Res*, *88*, 381-394. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)63824-8](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)63824-8)
- Joseph, J., Qu, L., Wang, S., Kim, M., Bennett, D., Ro, J., . . . Chung, M. K. (2019). Phosphorylation of TRPV1 S801 Contributes to Modality-Specific Hyperalgesia in Mice. *J Neurosci*, *39*(50), 9954-9966. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1064-19.2019>
- Khan, A., Khan, S., & Kim, Y. S. (2019). Insight into Pain Modulation: Nociceptors Sensitization and Therapeutic Targets. *Curr Drug Targets*, *20*(7), 775-788. <https://doi.org/10.2174/1389450120666190131114244>
- Khan, B. A., Warner, P., & Wang, H. (2014). Antibacterial Properties of Hemp and Other Natural Fibre Plants: A Review. *BioResources; Vol 9, No 2 (2014)*.
- Klein, C., Karanges, E., Spiro, A., Wong, A., Spencer, J., Huynh, T., . . . McGregor, I. S. (2011). Cannabidiol potentiates Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) behavioural effects and alters THC pharmacokinetics during acute and chronic treatment in adolescent rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *218*(2), 443-457. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2342-0>
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., & 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*(4), 596-606. <https://doi.org/10.1002/cne.20794>
- Kohno, T., Kumamoto, E., Higashi, H., Shimoji, K., & Yoshimura, M. (1999). Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *J Physiol*, *518* (Pt 3), 803-813. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0803p.x>
- Koivisto, A. P., Belvisi, M. G., Gaudet, R., & Szallasi, A. (2022). Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nat Rev Drug Discov*, *21*(1), 41-59. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00268-4>
- Kuai, C. P., Ju, L. J., Hu, P. P., & Huang, F. (2020). Alkaloids Attenuate Cisplatin-Induced Neuropathic Pain by Reducing Loss of IENF and Blocking TRPV1

- Activation. *Am J Chin Med*, 48(2), 407-428.
<https://doi.org/10.1142/S0192415X20500214>
- Kudo, M., Wupuer, S., Kubota, S., & Seki, K. (2021). Distribution of Large and Small Dorsal Root Ganglion Neurons in Common Marmosets. *Front Syst Neurosci*, 15, 801492. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.801492>
- Kuner, R., & Kuner, T. (2021). Cellular Circuits in the Brain and Their Modulation in Acute and Chronic Pain. *Physiol Rev*, 101(1), 213-258.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2019>
- Kurita, G. P., Sjøgren, P., Juel, K., Højsted, J., & Ekholm, O. (2012). The burden of chronic pain: a cross-sectional survey focussing on diseases, immigration, and opioid use. *Pain*, 153(12), 2332-2338.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.07.023>
- Lee, J. H., Ji, H., Ko, S. G., & Kim, W. (2021). JI017 Attenuates Oxaliplatin-Induced Cold Allodynia via Spinal TRPV1 and Astrocytes Inhibition in Mice. *Int J Mol Sci*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168811>
- Malek, N., Pajak, A., Kolosowska, N., Kucharczyk, M., & Starowicz, K. (2015). The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci*, 65, 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.02.001>
- Marcum, Z. A., & Hanlon, J. T. (2010). Recognizing the Risks of Chronic Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use in Older Adults. *Ann Longterm Care*, 18(9), 24-27.
- Masuoka, T., Kudo, M., Yamashita, Y., Yoshida, J., Imaizumi, N., Muramatsu, I., . . . Ishibashi, T. (2017). TRPA1 Channels Modify TRPV1-Mediated Current Responses in Dorsal Root Ganglion Neurons. *Front Physiol*, 8, 272.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00272>
- Mattson, C. L., Tanz, L. J., Quinn, K., Kariisa, M., Patel, P., & Davis, N. L. (2021). Trends and Geographic Patterns in Drug and Synthetic Opioid Overdose Deaths - United States, 2013-2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 70(6), 202-207. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7006a4>
- McEntire, D. M., Kirkpatrick, D. R., Dueck, N. P., Kerfeld, M. J., Smith, T. A., Nelson, T. J., . . . Agrawal, D. K. (2016). Pain transduction: a pharmacologic perspective. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 9(8), 1069-1080.
<https://doi.org/10.1080/17512433.2016.1183481>
- Mickle, A. D., Shepherd, A. J., & Mohapatra, D. P. (2016). Nociceptive TRP Channels: Sensory Detectors and Transducers in Multiple Pain Pathologies. *Pharmaceuticals (Basel)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/ph9040072>
- Mille-Hamard, L., Bauchet, L., Baillet-Derbin, C., & Horvat, J. C. (1999). Estimation of the number and size of female adult rat C4, C5 and C6 dorsal root ganglia (DRG) neurons. *Somatosens Mot Res*, 16(3), 223-228.
<https://doi.org/10.1080/08990229970474>
- Miller, F., Björnsson, M., Svensson, O., & Karlsten, R. (2014). Experiences with an adaptive design for a dose-finding study in patients with osteoarthritis. *Contemp Clin Trials*, 37(2), 189-199.
<https://doi.org/10.1016/j.cct.2013.12.007>

- Nilius, B., Appendino, G., & Owsianik, G. (2012). The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Arch*, 464(5), 425-458. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1158-z>
- Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*, 12(3), 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., & Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev*, 87(1), 165-217. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2006>
- Nita, I. I., Caspi, Y., Gudes, S., Fishman, D., Lev, S., Hersfinkel, M., . . . Binshtok, A. M. (2016). Privileged crosstalk between TRPV1 channels and mitochondrial calcium shuttling machinery controls nociception. *Biochim Biophys Acta*, 1863(12), 2868-2880. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.009>
- Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., & Tominaga, M. (2002). Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem*, 277(16), 13375-13378. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200104200>
- Pain, I. A. f. t. S. o. (2020). *Terminology*. <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>
- Pitcher, M. H., Von Korff, M., Bushnell, M. C., & Porter, L. (2019). Prevalence and Profile of High-Impact Chronic Pain in the United States. *J Pain*, 20(2), 146-160. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2018.07.006>
- Pratt, M., Stevens, A., Thuku, M., Butler, C., Skidmore, B., Wieland, L. S., . . . Hutton, B. (2019). Benefits and harms of medical cannabis: a scoping review of systematic reviews. *Syst Rev*, 8(1), 320. <https://doi.org/10.1186/s13643-019-1243-x>
- Price, T. J., & Flores, C. M. (2007). Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. *J Pain*, 8(3), 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2006.09.005>
- Páez, O., Segura-Chama, P., Almanza, A., Pellicer, F., & Mercado, F. (2021). Properties and Differential Expression of H. *Front Physiol*, 12, 733267. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.733267>
- Raisinghani, M., Pabbidi, R. M., & Premkumar, L. S. (2005). Activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by resiniferatoxin. *J Physiol*, 567(Pt 3), 771-786. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.087874>
- Rinwa, P., Calvo-Enrique, L., Zhang, M. D., Nyengaard, J. R., Karlsson, P., & Ernfors, P. (2021). Demise of nociceptive Schwann cells causes nerve retraction and pain hyperalgesia. *Pain*, 162(6), 1816-1827. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002169>
- Rostock, C., Schrenk-Siemens, K., Pohle, J., & Siemens, J. (2018). Human vs. Mouse Nociceptors - Similarities and Differences. *Neuroscience*, 387, 13-27. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.047>
- Rudroff, T., & Sosnoff, J. (2018). Cannabidiol to Improve Mobility in People with Multiple Sclerosis. *Front Neurol*, 9, 183. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00183>

- Russo, E. B., Guy, G. W., & Robson, P. J. (2007). Cannabis, pain, and sleep: lessons from therapeutic clinical trials of Sativex, a cannabis-based medicine. *Chem Biodivers*, 4(8), 1729-1743. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790150>
- Sato, M., Sato, T., Yajima, T., Shimazaki, K., & Ichikawa, H. (2018). The transient receptor potential cation channel subfamily V members 1 and 2, P2X purinoceptor 3 and calcitonin gene-related peptide in sensory neurons of the rat trigeminal ganglion, innervating the periosteum, masseter muscle and facial skin. *Arch Oral Biol*, 96, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.08.012>
- Schou, W. S., Ashina, S., Amin, F. M., Goadsby, P. J., & Ashina, M. (2017). Calcitonin gene-related peptide and pain: a systematic review. *J Headache Pain*, 18(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s10194-017-0741-2>
- Shiers, S., Klein, R. M., & Price, T. J. (2020). Quantitative differences in neuronal subpopulations between mouse and human dorsal root ganglia demonstrated with RNAscope in situ hybridization. *Pain*, 161(10), 2410-2424. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001973>
- Shiers, S. I., Sankaranarayanan, I., Jeevakumar, V., Cervantes, A., Reese, J. C., & Price, T. J. (2021). Convergence of peptidergic and non-peptidergic protein markers in the human dorsal root ganglion and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol*, 529(10), 2771-2788. <https://doi.org/10.1002/cne.25122>
- Shuba, Y. M. (2020). Beyond Neuronal Heat Sensing: Diversity of TRPV1 Heat-Capsaicin Receptor-Channel Functions. *Front Cell Neurosci*, 14, 612480. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.612480>
- Silvestro, S., Mammana, S., Cavalli, E., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2019). Use of Cannabidiol in the Treatment of Epilepsy: Efficacy and Security in Clinical Trials. *Molecules*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/molecules24081459>
- Smith, N. (2014). *Transdermal cannabinoid patch* (US Patent No. M. S. M. LLC.
- Son, D. B., Choi, W., Kim, M., Go, E. J., Jeong, D., Park, C. K., . . . Suh, J. W. (2021). Decursin Alleviates Mechanical Allodynia in a Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain Mouse Model. *Cells*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/cells10030547>
- Swett, J. E., Torigoe, Y., Elie, V. R., Bourassa, C. M., & Miller, P. G. (1991). Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol*, 114(1), 82-103. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(91\)90087-s](https://doi.org/10.1016/0014-4886(91)90087-s)
- Tanaka, R., Ishikawa, H., Sato, T., Shino, M., Matsumoto, T., Mori, K., . . . Osaka, I. (2017). Incidence of Delirium Among Patients Having Cancer Injected With Different Opioids for the First Time. *Am J Hosp Palliat Care*, 34(6), 572-576. <https://doi.org/10.1177/1049909116641274>
- Thomas, B. F., & ElSohly, M. A. (2016). Chapter 2 - Biosynthesis and Pharmacology of Phytocannabinoids and Related Chemical Constituents. In B. F. Thomas & M. A. ElSohly (Eds.), *The Analytical Chemistry of Cannabis* (pp. 27-41). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804646-3.00002-3>
- Tian, Q., Hu, J., Xie, C., Mei, K., Pham, C., Mo, X., . . . Yao, J. (2019). Recovery from tachyphylaxis of TRPV1 coincides with recycling to the surface membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(11), 5170-5175. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819635116>

- Tomko, A. M., Whynot, E. G., Ellis, L. D., & Dupré, D. J. (2020). Anti-Cancer Potential of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids Present in Cannabis. *Cancers (Basel)*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/cancers12071985>
- Tsang, A., Von Korff, M., Lee, S., Alonso, J., Karam, E., Angermeyer, M. C., . . . Watanabe, M. (2008). Common chronic pain conditions in developed and developing countries: gender and age differences and comorbidity with depression-anxiety disorders. *J Pain*, 9(10), 883-891. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.05.005>
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem*, 76, 387-417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Vonkeman, H. E., & van de Laar, M. A. (2010). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. *Semin Arthritis Rheum*, 39(4), 294-312. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.08.001>
- Wang, S., Joseph, J., Ro, J. Y., & Chung, M. K. (2015). Modality-specific mechanisms of protein kinase C-induced hypersensitivity of TRPV1: S800 is a polymodal sensitization site. *Pain*, 156(5), 931-941. <https://doi.org/10.1097/j.pain.000000000000134>
- Wang, Z., Ling, D., Wu, C., Han, J., & Zhao, Y. (2020). Baicalin prevents the up-regulation of TRPV1 in dorsal root ganglion and attenuates chronic neuropathic pain. *Vet Med Sci*, 6(4), 1034-1040. <https://doi.org/10.1002/vms3.318>
- Weizman, L., Dayan, L., Brill, S., Nahman-Averbuch, H., Hendler, T., Jacob, G., & Sharon, H. (2018). Cannabis analgesia in chronic neuropathic pain is associated with altered brain connectivity. *Neurology*, 91(14), e1285-e1294. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006293>
- West, C. A., McKay Hart, A., Terenghi, G., & Wiberg, M. (2012). Sensory neurons of the human brachial plexus: a quantitative study employing optical fractionation and in vivo volumetric magnetic resonance imaging. *Neurosurgery*, 70(5), 1183-1194; discussion 1194. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e318241ace1>
- West, S. J., Bannister, K., Dickenson, A. H., & Bennett, D. L. (2015). Circuitry and plasticity of the dorsal horn--toward a better understanding of neuropathic pain. *Neuroscience*, 300, 254-275. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.020>
- Weyer-Menkhoff, I., & Lötsch, J. (2018). Human pharmacological approaches to TRP-ion-channel-based analgesic drug development. *Drug Discov Today*, 23(12), 2003-2012. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.06.020>
- Wick, E. C., Hoge, S. G., Grahn, S. W., Kim, E., Divino, L. A., Grady, E. F., . . . Kirkwood, K. S. (2006). Transient receptor potential vanilloid 1, calcitonin gene-related peptide, and substance P mediate nociception in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(5), G959-969. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00154.2005>
- Wu, Y., Chen, J., & Wang, R. (2019). Puerarin suppresses TRPV1, calcitonin gene-related peptide and substance P to prevent paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain in rats. *Neuroreport*, 30(4), 288-294. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001199>

- Wu, Z., Yang, Q., Crook, R. J., O'Neil, R. G., & Walters, E. T. (2013). TRPV1 channels make major contributions to behavioral hypersensitivity and spontaneous activity in nociceptors after spinal cord injury. *Pain*, 154(10), 2130-2141. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.040>
- Yong, R. J., Mullins, P. M., & Bhattacharyya, N. (2022). Prevalence of chronic pain among adults in the United States. *Pain*, 163(2), e328-e332. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002291>
- Zhang, S., Cai, B., Li, Z., Wang, K., Bao, L., Li, C., & Zhang, X. (2022). Fibroblastic SMOC2 Suppresses Mechanical Nociception by Inhibiting Coupled Activation of Primary Sensory Neurons. *J Neurosci*, 42(20), 4069-4086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2132-21.2022>
- Zhang, X., Li, L., & McNaughton, P. A. (2008). Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron*, 59(3), 450-461. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.015>
- Zhang, Y., Huang, F., Xu, Y., Xiang, W., & Xie, C. (2021). TRPV1 is involved in the antinociceptive effects of resveratrol in paclitaxel-induced neuropathic pain. *All Life*, 14(1), 66-74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/26895293.2020.1861111>
- Zhang, Y., Ma, S., Ke, X., Yi, Y., Yu, H., Yu, D., . . . Pei, L. (2021). The mechanism of Annexin A1 to modulate TRPV1 and nociception in dorsal root ganglion neurons. *Cell Biosci*, 11(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00679-1>
- Zhao, D., Han, D. F., Wang, S. S., Lv, B., Wang, X., & Ma, C. (2019). Roles of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in regulating bone cancer pain via TRPA1 signal pathway and beneficial effects of inhibition of neuro-inflammation and TRPA1. *Mol Pain*, 15, 1744806919857981. <https://doi.org/10.1177/1744806919857981>
- Zylka, M. J. (2005). Nonpeptidergic circuits feel your pain. *Neuron*, 47(6), 771-772. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.003>

Legendas Figuras

Figura 1. Perfil de distribución del tamaño neuronal de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) después de 1 día de cultivo (DIV1). **A.** Inmunocitoquímica de neuronas del GRD marcadas con NeuN; Hoechst marcador nuclear; las flechas rojas indican colocalización de NeuN y Hoechst. **B.** Tamaño promedio de las neuronas del GRD. **C.** Proporción de los diámetros neuronales del GRD. Datos mostrados promedio \pm SEM; n=3 cultivos cada uno con 1200 neuronas. Escala de la barra, 20 μ m.

Figura 2. Perfil de neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas en cultivo del ganglio de la raíz dorsal (GRD) después de 1 día de cultivo (DIV1). **A.** Inmunocitoquímica de neuronas del GRD marcadas con NeuN, Isolectina B4 (IB4), Hoechst; las flechas blancas indican colocalización de NeuN, IB4 y Hoechst; la flecha amarilla muestra una neurona negativa para IB4. **B.** Proporción de neuronas IB4 positivas (+) y negativas (-). **C.** Perfil de distribución de diámetros de neuronas IB4+ e IB4-. **D.** Frecuencia relativa acumulada de diámetros en neuronas IB4+ e IB4-. Datos mostrados promedio \pm SEM; n=3 cultivos cada uno con 300 neuronas evaluadas. Escala de la barra, 20 μ m.

Figura 3. Expresión de TRPV1 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) después de 1 día de cultivo (DIV1). **A.** Imagen en campo claro de cultivo de neuronas de GRD. Se encuentran señas las células de las cuales se muestra el registro de pulso pareado con capsaicina [0.2 μ M] (barra negra) y estimulación con KCl [50 mM] (barra roja). **B.** Porcentaje de neuronas TRPV1 positivas (+) y negativas (-). **C.** Tamaño promedio de neuronas TRPV1 positivas (+) y negativas (-). La barra negra muestra el promedio. **D.** Proporción de diámetros de neuronas TRPV1 positivas (+) y negativas (-). Datos mostrados **p < 0.01 por prueba de Mann-Whitney; n=106 neuronas. Escala de la barra, 20 μ m.

Figura 4. Caracterización de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) en respuesta a estimulación con capsaicina [0.2 μ M] después de 1 día de cultivo (DIV1). **A.** Porcentaje de neuronas que responden o no al primer estímulo con capsaicina; n=106. **B.** Porcentaje de neuronas que se recuperaron o no después de la primera estimulación con capsaicina; n=85. **C.** Porcentaje de neuronas que respondieron al segundo estímulo con capsaicina después de haberse recuperado; n=35. **D.** Proporción de diámetros de neuronas que responden o no al primer estímulo con capsaicina. **E.** Proporción de diámetros de neuronas que se recuperaron o no después de la primera estimulación con capsaicina. **F.** Proporción de diámetros de neuronas que respondieron al segundo estímulo con capsaicina después de haberse recuperado. **G.** Δ Fluorescencia de los picos que corresponden al primer y segundo estímulo con capsaicina. Datos mostrados como promedio \pm SEM, n.s. = p > 0.05 por prueba de Mann-Whitney.

Figura 1

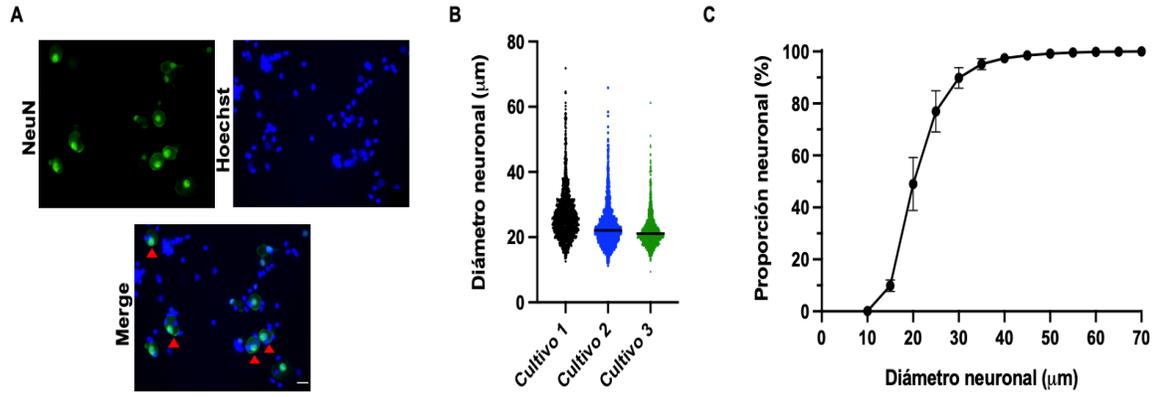


Figura 2

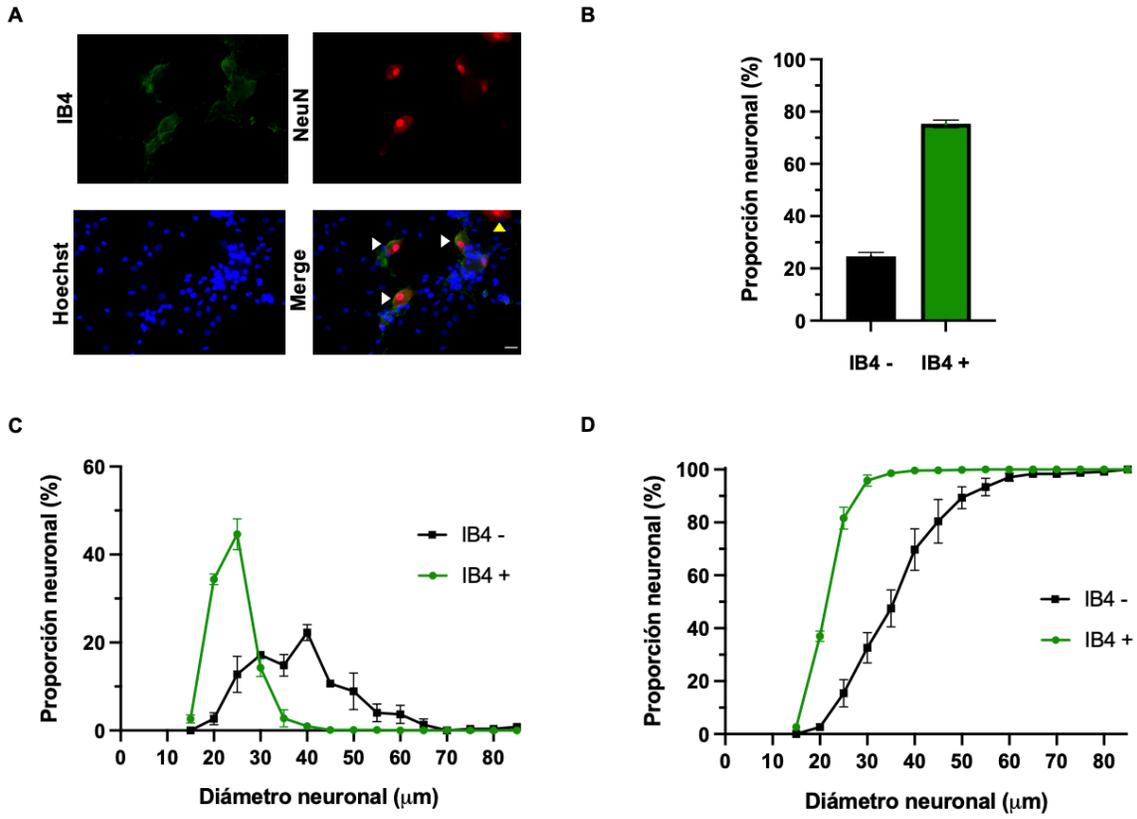
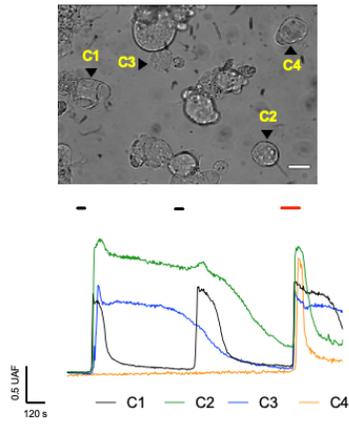
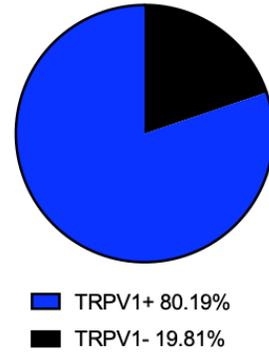


Figura 3

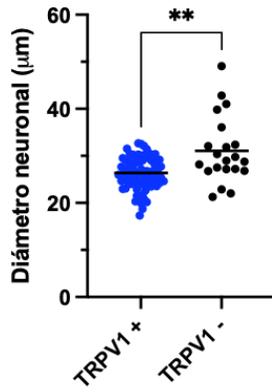
A



B



C



D

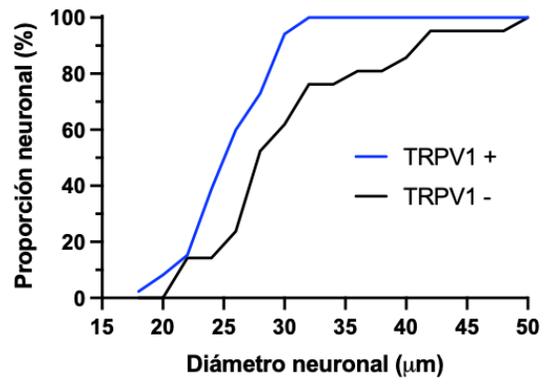


Figura 4

