



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**GRADO EN MEDICINA
TRABAJO FIN DE GRADO**

**¿Qué es la optogenética?
Aplicaciones futuras a la práctica clínica**

**What is optogenetics?
Future applications to clinical practice**

Autor: Dña. Marta A. Barrientos Duque
Director/es: D. Emilio José Sánchez Barceló

Santander, Junio 2016

RESUMEN

La optogenética es una técnica, desarrollada recientemente, que permite el control a través de la luz de la actividad de neuronas definidas genéticamente. Las células son primero modificadas genéticamente para expresar unas determinadas proteínas fotosensibles (opsinas), que son canales iónicos, bombas protónicas, o receptores acoplados a proteínas G. Luego, las células genéticamente modificadas son iluminadas con luz de una determinada longitud de onda, activando o inhibiendo los canales iónicos o las bombas de protones, produciéndose la despolarización o hiperpolarización, y consecuentemente la estimulación o inhibición celular. A lo largo del desarrollo de la optogenética, diferentes variantes de opsinas se han ido descubriendo o creando a través de ingeniería genética, por lo que ahora es posible estimular o inhibir la actividad neuronal o las vías de señalización intracelular, en escalas de tiempo rápidas o lentas, con luz de diferentes longitudes de onda. Esta tecnología permite un control celular con una alta resolución temporal y espacial. La optogenética ha revolucionado el campo de la neurociencia, abriendo nuevas oportunidades para el conocimiento de los mecanismos de la enfermedad neurológica y ofreciendo nuevas perspectivas en el tratamiento de patologías como la epilepsia, el Parkinson o la sección medular. La traslación de los estudios optogenéticos en animales a la práctica clínica, es un tema de futuro.

Palabras clave: Canalrodopsina, Halorodopsina, optogenética, vector viral, ratón Cre recombinasa, láser, LED, epilepsia, parkinson, sección medular.

ABSTRACT

Optogenetics is a recently developed technology that can be used to control the activity of genetically-defined neurons with light. Cells are first genetically engineered to express a lightsensitive opsin, which is typically an ion channel, pump, or G protein–coupled receptor. When engineered cells are then illuminated with light of the appropriated wavelength, opsin-bound retinal undergoes a conformational change that leads to channel opening or pump activation, cell depolarization or hyperpolarization, and neural activation or silencing. Since the advent of optogenetics, many different opsin variants have been discovered or engineered, and it is now possible to stimulate or inhibit neuronal activity or intracellular signaling pathways on fast or slow timescales with a variety of different wavelengths of light. This technology allows optical control of genetically targeted biological systems at high temporal and spatial resolution. The depolarization or silencing can be optically induced on a millisecond time scale. Optogenetics has revolutionized the field of neuroscience, it opens new opportunities for more systematic delineation of disease mechanisms and better treatments, in pathologies such as epilepsy, parkinson, and spinal cord sections. Although recent developments in optogenetics have largely focused on neuroscience, it has lately been extended to other clinical applications, including cardiac and retinal pathology.

Key words: Channelrhodopsin, Halorhodopsin, optogenetics, viral vector, Cre mouse, laser, LED, epilepsy, parkinson, spinal cord injury.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN A LA OPTOGENÉTICA.....	3
2. BREVE HISTORIA DE LA OPTOGENÉTICA.....	4
3. HERRAMIENTAS DE LA OPTOGENÉTICA.....	5
3.1. Canales iónicos fotosensibles.....	5
3.2. Los métodos de transfección de canales.....	11
3.3. Los sistemas de iluminación.....	14
4. APLICACIONES CLÍNICAS DE LA OPTOGENÉTICA.....	18
4.1. Optogenética y epilepsia.....	18
4.1.1. Inhibición de células piramidales.....	19
4.1.2. Excitación de interneuronas inhibitorias (o subpoblaciones de interneuronas).....	21
4.1.3. Control de ambos tipos celulares.....	21
4.1.4. Control de otros componentes implicados en la epilepsia.....	22
4.1.5. Sistema optogenético de circuito cerrado.....	23
4.1.6. Retos en la investigación de la epilepsia y perspectivas futuras.....	24
4.1.6.1. Protocolo de fotoestimulación.....	24
4.1.6.2. Implementación humana.....	24
4.1.6.3. Detección a tiempo real de la actividad epiléptica.....	25
4.2. Optogenética y sección medular.....	26
4.2.1. Restauración de la función respiratoria.....	27
4.2.2. Restauración de la función vesical.....	27
4.2.3. Control de la función muscular.....	28
4.3. Optogenética y patología retiniana.....	28
4.4. Optogenética y párkinson.....	31
4.5. Optogenética y patología cardiaca.....	34
5. CONCLUSIONES.....	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	37

1. INTRODUCCIÓN

La optogenética es una nueva técnica que permite el control selectivo (estimulación o inhibición), mediante pulsos de luz, de células específicas a las que se les ha transfectado proteínas fotosensibles que no poseen de manera natural. Esta nueva técnica permite controlar una población de células sin afectar a las células de alrededor, aportando una elevada resolución espacial y temporal.

En el desarrollo de esta técnica, el primer paso fue la identificación, en algas y bacterias, de los genes codificantes de proteínas de membrana fotosensibles. Ello dio paso a la elaboración de construcciones genéticas en las que, junto a la secuencia codificante de las proteínas fotosensibles se incorporaba el promotor responsable de que tales proteínas se expresasen sólo en las células deseadas. El siguiente paso fue la transfección de este material genético al animal deseado, utilizando como vector un virus (adenovirus o lentivirus), que se inyecta en el animal. Finalmente, se desarrollaron electrodos de fibra óptica (optrodos) capaces de permitir el acceso de luz láser de una determinada longitud de onda (verde, amarilla o azul), al órgano diana, para abrir canales fotosensibles, de los que resultara la activación o inhibición de la célula correspondiente.

Aunque las técnicas de optogenética están siendo utilizadas en muy diversas áreas de la investigación biomédica, es en el campo de la neurología donde encuentra sus principales aplicaciones.

Los organismos invertebrados, gracias a su sistema nervioso central mucho más simple nos ofrecen la ventaja de poder experimentar con cada una de las neuronas identificadas, lo que nos permite alcanzar un conocimiento más sofisticado del comportamiento y el control del sistema nervioso en estos organismos.

Sin embargo, los animales vertebrados tienen un sistema nervioso mucho más amplio, complejo y variable. El cerebro de los vertebrados posee cientos de millones de neuronas en roedores y cientos de billones en humanos, conteniendo distintos tipos celulares con distintos patrones de expresión molecular, actividad fisiológica y conectividad topológica. Por lo que, a pesar de que se ha avanzado en este campo existen todavía muchas limitaciones en el conocimiento y control de los circuitos cerebrales. Las técnicas tradicionalmente usadas para investigar y controlar la función cerebral, como la estimulación eléctrica mediante inserción de electrodos o la estimulación farmacológica, nos aportan poca resolución espacial y temporal respectivamente.

El control preciso de la actividad neuronal tanto en espacio como en tiempo se consigue con la optogenética, una novedosa y prometedora vía de

abordaje de multitud de patologías, especialmente las neurológicas, como la epilepsia. En el 2010 fue elegida “Método de Año” entre todos los campos de la ciencia y la ingeniería por la revista *Nature Methods*.

2. BREVE HISTORIA DE LA OPTOGENÉTICA

En 1979 Francis Crick –el descubridor de la doble hélice del DNA– defendía que el gran reto para entender el cerebro y sus funciones y para combatir sus enfermedades, era poder controlar de manera precisa un tipo de células dejando las demás inalteradas [Crick FH, 1979]. Hasta hace muy poco, la única forma que teníamos de estimular un cierto grupo de neuronas era la inserción de electrodos, lo que da muchos problemas; entre ellos, que al aplicar una señal eléctrica se afectan todas las neuronas que hay alrededor sean del tipo que sean. La idea de utilizar luz para controlar selectivamente modelos de actividad neuronal específica dentro de los diferentes subtipos de células del cerebro fue sugerida por primera vez hace poco más de una década [Zemelman et al., 2002] y supuso la solución al reto expuesto por Crick dos décadas antes.

Un año después del artículo de Zemelman, se describió [Nagel et al., 2003] en el alga *Chlamidomonas Reinhardii*, la presencia de una opsina, la denominada **channelrhodopsin2**, cuya activación mediante luz azul, permitía el flujo de cargas positivas al interior celular, produciéndose la despolarización de la célula. Se trataba, por tanto, de canales celulares de membrana cuya apertura, en respuesta a la luz, permitía la activación celular. Este potencial avance culminó cuando, dos años más tarde, se demostró [Boyden et al., 2005] que se podía expresar la opsina del alga en las neuronas de mamíferos, haciéndolas, por tanto, sensibles a luz azul. De esta manera, con pulsos laser de luz de 400nm (luz azul) se podía estimular la actividad neuronal. Dos años más tarde, miembros de este mismo grupo de investigación describieron la **halorhodopsina**, una opsina presente en arqueobacterias como las *Natronomonas pharaonis* que, tras ser expuesta a luz amarilla, transporta iones Cl⁻ al interior celular y desencadena su hiperpolarización, lo que significa la inhibición de la actividad neuronal.

A partir de estos estudios iniciales, las herramientas de la optogenética han evolucionado de manera exponencial gracias, entre otras cosas a la ingeniería genética. La optogenética se ha utilizado para analizar diferentes mecanismos biológicos *in vitro* e *in vivo* y se considera una herramienta prometedora para aplicar clínicamente, como método terapéutico de muchas enfermedades, como por ejemplo la epilepsia, trastornos visuales, secciones medulares, etc.

3. HERRAMIENTAS DE LA OPTOGENÉTICA

3.1. Canales iónicos fotosensibles

Las herramientas básicas de la optogenética son las opsinas: proteínas fotosensibles de membrana que son canales iónicos o bombas protónicas, capaces de modificar la actividad de las células en la que se expresan, cuando éstas son expuestas a una luz de determinada longitud de onda (Fig.1).

Estos canales se encuentran en algunos tipos de bacterias, arqueas y algas (opsinas Tipo I). En estos microorganismos sirven para una variedad de funciones como, por ejemplo, controlar el movimiento de sus flagelos para permitir el desplazamiento hacia una fuente luminosa o la huida de entornos peligrosos. Estas opsinas se componen de una proteína transmembrana que funciona como una bomba o canal iónico, y se pueden utilizar tal como se encuentran en la naturaleza o ser diseñadas para optimizar su funcionamiento.

Es importante puntualizar que las opsinas necesitan la presencia de retinal (retinaldehído), una de las muchas formas de Vit A, para llevar a cabo su función. De tal manera que, cuando el retinal se une a la opsina, el complejo opsina-retinal se convierte en fotosensible. El fotón provoca la isomerización del retinal, lo que induce un cambio conformacional en la opsina, la apertura de los canales iónicos o la activación de la bomba de protones; lo que lleva a un cambio en el potencial de membrana, y con ello la activación o inhibición neuronal [Guru et al., 2015].

Afortunadamente, el retinal está presente en cantidades suficientes en el tejido neuronal de los mamíferos, lo que permite aplicar la optogenética sin necesidad de administrar retinal de manera exógena. Sin embargo, los organismos invertebrados, como *Drosophila*, necesitan suplementos de retinal para que las opsinas puedan llevar a cabo su función.

También podemos encontrar opsinas en células animales, que participan en funciones como la visión o los ritmos circadianos. Éstas son conocidas como opsinas Tipo II y se trata de receptores acoplados a proteínas G que al recibir el estímulo luminoso inician una cascada de señalización, y en consecuencia los cambios producidos en la actividad neuronal son más lentos que con las opsinas tipo I. Debido a su estructura más simple y a su cinética más rápida, las opsinas tipo I son el objetivo principal en investigación y por lo tanto en las que nos centraremos en este trabajo.

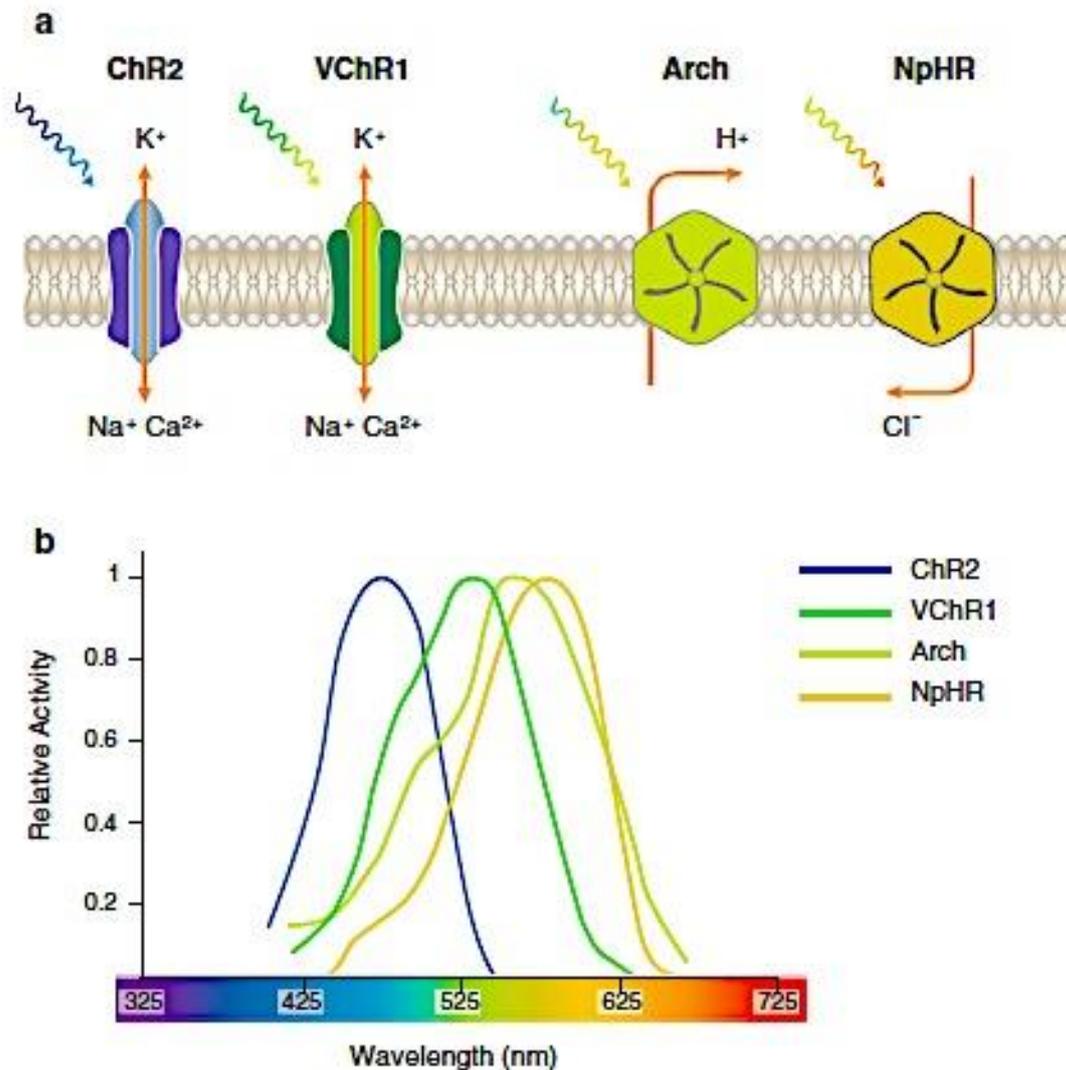


Figura 1. El principio optogénético: cambiar el potencial de voltaje de la membrana de las células excitables. a) Herramientas de excitación celular: La activación de la Channelrhodopsin-2 (ChR2) de *Chlamydomonas reinhardtii* y Channelrhodopsin-1 *Volvox carteri* (VChR1) hace que se abran los canales de cationes no selectivos lo que conduce a la despolarización de las células diana. Herramientas de inhibición celular: Archaerhodopsin-3 (Arch) de *Halorubrum sodomense* funciona como bomba de protones y conduce a la hiperpolarización de la célula diana, al igual que la bomba de cloruro de *Natronomonas Pharaonis* (NpHR). **b)** Espectro de luz al que son sensibles las diferentes proteínas de membrana. Tomado de [Rein and Deussing, 2012].

Como comentábamos anteriormente, el primer paso para el desarrollo de la optogenética fue la identificación de los genes codificantes de las proteínas de membrana fotosensibles (opsinas). Actualmente se conocen la secuencia de tres genes que codifican estos tres canales de membrana sensibles a la luz: **Channelrhodopsin**, **Halorhodopsin** y **Archaerhodopsins** (Fig 3). Además, mediante técnicas de ingeniería genética, se han diseñado nuevas opsinas con propiedades adaptadas a las necesidades de problemas específicos de

investigación. A continuación, vamos a describir, de manera concisa, las propiedades de algunas de estas opsinas (Fig 2).

Canalrodopsinas (*Channelrhodopsins* o *ChRs*)

Presentes en el alga verde *Chlamidomonas Reinhardii*, intervienen en la homeostasis y fototropismo de la misma. Son canales catiónicos localizados en la membrana celular, que se activan con luz azul. Al exponerse las algas a este tipo de luz se abren los canales y permiten el flujo de cargas positivas al interior celular, principalmente iones Na^+ e H^+ , pero también K^+ y Ca^{2+} . Se produce una despolarización celular y por lo tanto se estimula la actividad neuronal.

La primera opsina utilizada para controlar la actividad neuronal fue la Channelrhodopsin-2 (ChR2), una de las dos ChRs expresadas por la *Chlamidomonas Reinhardii*. La ChR2 es un canal catiónico que responde a luz azul (460 nm) permitiendo el paso de cargas positivas al interior de la célula, despolarizándola.

En 2005, la ChR2 se introdujo en neuronas del hipocampo cultivadas y se comprobó que podía controlar la actividad neuronal con elevada resolución temporal: pulsos muy breves (milisegundos) de luz azul inducían potenciales de acción individuales con una frecuencia de 30 espigas por segundo.

Desde esta primera demostración de la utilidad de la ChR2 para el control de la actividad neuronal, las herramientas en optogenética han evolucionado de manera exponencial y se han descubierto y diseñado mediante ingeniería genética diferentes opsinas con una gran variedad de propiedades (Fig. 2).

Opsinas ultrarrápidas (*Ultrafast opsins*)

Un área de especial interés en el desarrollo de las ChRs ha sido la creación, mediante mutaciones dirigidas, de opsinas con una cinética más rápida (ChETA, ChEF/ChIEF), acelerando el tiempo de desactivación de la opsina tras su activación por la exposición a la fuente luminosa.

Estas opsinas resultan especialmente adecuadas para aquellas situaciones donde se necesita controlar actividades neuronales extremadamente rápidas, como es el caso de las *fast-spiking inhibitory parvalbumin neurons*, interneuronas corticales inhibitorias que expresan parvalbúmina (proteína fijadora de calcio) y están implicadas en la generación de los ritmos

gamma [Sohal et al., 2009]. Otra ventaja de estas opsinas ultrarrápidas es que reducen la posibilidad de que se genere más de un potencial de acción (dos o tres espigas) en respuesta a un único pulso de luz.

Opsinas biestables (*Step-Function opsins* o *SFOs*)

En algunos diseños experimentales puede que lo que se pretenda sea modificar la actividad espontánea de una población neuronal más que controlar la generación de cada potencial de acción. Para este fin fueron diseñadas las *Step-function* u opsinas biestables (SFOs). Se crearon modificando la ChR2 con el objetivo de aumentar el tiempo en el que este canal se mantiene abierto. La primera SFO se generó introduciendo una mutación en la ChR2 en la posición C128. Con esta mutación se conseguía mantener abierto el canal durante decenas de segundos tras un breve pulso de luz azul, permitiendo una despolarización sostenida (*step*) [Berndt et al., 2009]. Otra variante, con mutación en D156A, permitía mantener los canales abiertos durante minutos [Bamann et al., 2010]. Combinando ambas mutaciones ChR2 (C128/D156A) se obtuvo una SFO que mantenía la apertura de los canales, y por lo tanto la despolarización neuronal en respuesta al estímulo lumínico, durante media hora. [Yizhar et al., 2011].

Estas opsinas son particularmente útiles para manipular la actividad neuronal en el estudio de patrones de comportamiento o de conducta, donde conectar al animal a una fibra óptica puede ser complicado. De esta manera, los animales solo tendrían que estar unidos al cable de fibra óptica un tiempo breve para iniciar la actividad neuronal con un pulso de luz azul, pudiendo ser desconectados a continuación y seguir manteniendo la actividad neuronal inducida por la luz, lo que permitiría estudiar sus patrones de comportamiento. Finalmente, los animales podrían ser conectados de nuevo a la fibra óptica, para finalizar la alta actividad neuronal mediante un pulso de luz amarilla.

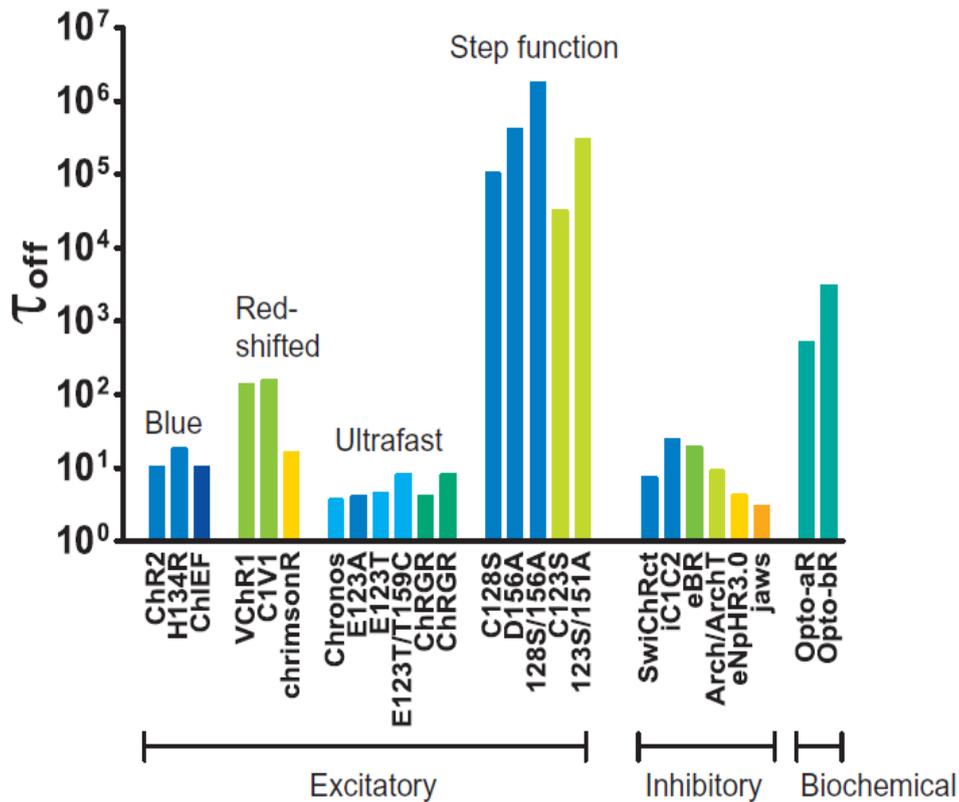


Figura 2. Imagen de algunas de las actuales opsinas conocidas. El color indica el color óptimo de luz utilizada en las diferentes opsinas y T_{off} indica la velocidad de desactivación. Tomada de [Guru et al., 2015].

Opsinas con un espectro de excitación desplazado (*Spectral shifted Excitatory Opsins*)

Actualmente, se está poniendo esfuerzo en el desarrollo de opsinas con un espectro de excitación desplazado con respecto al de las primeras opsinas, con el objetivo de conseguir un control óptico independiente de las diferentes poblaciones neuronales [Guru et al., 2015].

El desarrollo de opsinas desplazadas hacia el rojo (*red-shifted opsins*) ha sido un objetivo inicial debido a dos razones. En primer lugar, estas opsinas podrían ser usadas en combinación con la ChR2 sensible a luz azul, sin superponerse. En segundo lugar, una opsina sensible a una longitud de onda larga, puede ser útil para hacer posible una penetración profunda de la luz dentro del tejido reduciendo la dispersión, lo que haría posible una estimulación lumínica no invasiva.

La primera opsina *red-shifted*, VChR1, identificada en *Volvox carteri*, responde a una longitud de onda de 535 nm, desplazada significativamente hacia el rojo en comparación con la ChR2 (460 nm). Sin embargo, se encontraron dificultades con la utilización de esta opsina en mamíferos debido su baja corriente. Se generó otra variante, la C1V1 (por fusión de la secuencia N-terminal de ChR1 con la secuencia C-terminal de VChR1) que siendo sensible también a una longitud de onda de 539 nm, tuvo mejor acogida. A pesar de ello, hay que tener en cuenta que presenta una cinética de desactivación larga al compararla con la ChR2.

Otra variante de opsina *red-shifted*, ReaChR, ha mejorado el tráfico transmembrana en células de mamíferos con una cinética más rápida y una corriente mayor. Además, esta opsina, al estar significativamente más desplazada al rojo, es sensible a una longitud de onda de 590-630 nm, lo que nos permite estimular a las células a través del cráneo sin necesidad de utilizar técnicas invasivas.

A pesar de que las opsinas descritas anteriormente responden principalmente a longitudes de onda desplazadas al rojo, también presentan cierta absorción residual de luz azul. Esto puede ocasionar una comunicación cruzada entre los canales. No obstante, dos opsinas descubiertas recientemente, han supuesto un avance hacia la resolución de este problema. **Chrimson** (una opsina con un espectro de excitación de 450 nm, desplazada al rojo desde la ChRs previa) y **Chronos** (una opsina sensible a la luz azul y verde, con una elevada sensibilidad a la luz y una cinética rápida). Las diferencias en la longitud de onda de la luz necesaria para activar cada una de estas opsinas, permite que cuando éstas se utilizan de manera combinada en diferentes poblaciones neuronales, se consiga una estimulación independiente de cada una de las poblaciones neuronales dentro de una misma zona del cerebro, evitándose la superposición.

Halorodopsinas (*Halorhodopsins* o *NpHR*)

Localizadas en arqueobacterias como las *Natronomonas pharaonis*, se trata de proteínas de membrana que constituyen bombas de iones cloruro. Cuando estas proteínas se exponen a la luz amarilla, transportan activamente iones Cl⁻ al interior celular, causando su hiperpolarización e inhibición de la actividad neuronal. Este grupo de opsinas tiene el inconveniente de que su expresión en las neuronas es más pobre que la de las *ChRs*.

Archaerhodopsins (Arch, Mac, BR)

Estas opsinas también se encuentran en especies de arqueobacterias. Son bombas de protones hacia el exterior celular, que se activan con luz verde o amarilla, y responden a ella bombeando cargas positivas a exterior, es decir, causando hiperpolarización celular y por lo tanto inhibición de la actividad neuronal.

Más recientemente, también se han desarrollado opsinas inhibitorias con espectro desplazado al rojo: ***Spectral shifted Inhibitory Opsins***. Las bombas de protones y de iones cloruro descritas anteriormente son significativamente más red-shifted que la ChR2. Aun así, se busca el desarrollo de opsinas inhibitorias aún más *red-shifted*, con el mismo objetivo, descrito anteriormente, de conseguir una estimulación lumínica no invasiva, evitando la penetración en el cerebro [Guru et al., 2015].

Opsinas controladoras de señales intracelulares (optoXRs).

Las opsinas presentes en vertebrados (opsinas tipo II), a diferencia de las descritas anteriormente, son receptores acoplados a proteínas G que al recibir el estímulo luminoso inician una cascada de señalización, modificando de esta manera la actividad celular. Utilizando este rasgo característico de las opsinas tipo II, se desarrolló [Airan et al., 2009] una familia de opsinas denominadas optoXRs. Reemplazando determinados receptores (como por ejemplo receptores adrenérgicos) por estas opsinas, se podría modificar de manera selectiva diferentes cascadas de señalización con un estímulo luminoso, de manera dirigida y con precisión temporal. Es decir, controlar la actividad bioquímica de la célula mediante luz.

3.2. Los métodos de transfección de canales

La expresión eficiente de los genes codificantes de opsinas es fundamental para lograr la manipulación específica del tipo celular diana. Esto se puede lograr de varias maneras.

Un método muy extendido, porque permite un estrecho control sobre la localización espacial de expresión de la opsina, es el uso de **vectores virales**. Este procedimiento consiste en inyectar en la región de interés del cerebro, un virus diseñado que contiene el gen que codifica la opsina junto a un promotor específico.

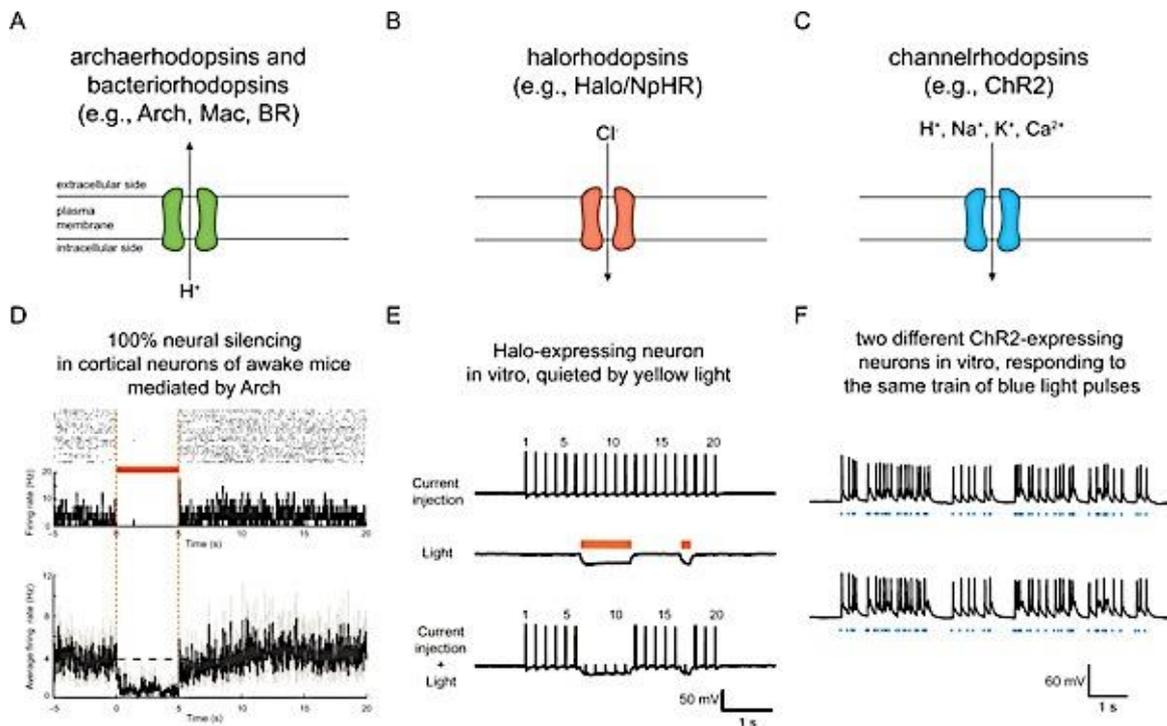


Figura 3. Tipos principales de opsinas empleadas para el control óptico de la actividad neuronal. (A-C) Respuesta fisiológica de (A) Archaerhodopsinas (hiperpolarización), (B) Halorhodopsinas (hiperpolarización), (C) Channelrhodopsinas (despolarización), tras la exposición a la luz. (D) Efectos de los canales Archaerhodopsinas durante y después de 5 segundos de exposición a luz amarilla, sobre la actividad neuronal cortical piramidal. Arriba: actividad neuronal de una neurona representativa, suprimida durante la exposición, y tasa media de descargas instantáneas. Media global de la tasa de descargas antes, durante y después de la exposición. (E) Actividad de Halorhodopsinas para mediar el cese de espigas en una neurona hipocampal. Arriba: estimulación neuronal. Medio: hiperpolarización inducida por luz amarilla. Abajo: combinación de ambas. La luz bloquea las espigas pero se mantienen intactas durante los periodos de oscuridad. (F) Efecto de pulsos de luz azul sobre la actividad de dos neuronas hipocampales que expresan Channelrhodopsina. Tomado de [Boyden et al., 2011].

Varios vectores virales tales como **lentivirus**, **virus adeno-asociados**, **virus de la rabia**, **adenovirus canino**, y el **virus herpes simplex** se han utilizado para introducir opsinas a diferentes animales, incluyendo el ratón, rata, pez cebra, y en modelos de primates. Sin embargo, la carga de material genético que estos virus pueden transportar es limitada, lo que hace que el tamaño del promotor no pueda ser muy grande, reduciendo de este modo la diversidad de tipos de células que pueden modificarse de manera específica y dirigida y con una expresión suficiente.

Este método de transfección se utiliza de rutina cuando se tiene como células diana todas las neuronas, usando la **sinapsina** humana (hsyn) como

promotor, o cuando se quiere apuntar a las neuronas excitadoras usando como promotor en este caso **CaMKII α** (Tabla I).

Cell Population	Promoter
Pan-neuronal	Synapsin, hThy1
Glutamatergic (excitatory)	CaMKII
GABAergic (inhibitory)	VGAT
Dopaminergic	THp
Serotonergic	TPH
Cholinergic	ChAT
Purkinje cells	L7
Oligodendrocytes	MBP
Astrocytes	gfaABC1D
Activity-dependent promoters	Fos, Arc

Tabla I. Promotores de células específicas utilizados para modificación genética dirigida. *CaMKII = Quinasa calcio-calmodulina dependiente tipo II; ChAT = colina acetiltransferasa; hThy1 = timocito humano-1; MBP = proteína mielina basal; THp = promotor de tirosina hidroxilasa; TPH = promotor de triptófano hidroxilasa; VGAT = transportador vesicular de GABA. Modificada de [Pendharkar et al., 2016].*

Algunos vectores virales se han desarrollado para dirigir ciertos tipos de células específicas genéticamente definidas por un promotor, como comentamos en el párrafo anterior, pero la mayor parte de tipos celulares requieren mayor cantidad de material genético para conseguir esa especificidad que el que se puede transportar con este método de transfección.

La limitación que se presenta con los vectores virales, puede ser evitada usando **animales transgénicos que expresen una opsina en una población neuronal particular**. De esta manera, se pueden utilizar promotores que supongan grandes fragmentos de material genético, para permitir así una expresión más específica.

Sin embargo, la generación de una línea transgénica estable requiere un esfuerzo considerable, por lo que el uso de estos animales es muy restringido. Además, no se logra el estrecho control sobre la localización espacial de expresión de la opsina que se consigue con la inyección del vector viral. Finalmente, será necesario generar una nueva línea de ratón transgénico, cada vez que se requiera una nueva opsina.

Las líneas de ratones con **Cre recombinasa en combinación con vectores virales**, son actualmente una de las estrategias dominantes utilizadas para dirigirse a tipos de células genéticamente definidos, ya que ofrecen una mayor flexibilidad. Cre recombinasa es una enzima que cataliza la recombinación entre dos sitios *loxP* (secuencias específicas de 34 pares de bases) que flanquean un gen u otro material genético de interés. El material genético que se encuentra entre ellos, "*floxed DNA*", se recombina cuando la enzima Cre está presente, pero no cuando está ausente.

Con este método de transfección, un vector viral que contiene el gen de la opsina de interés flanqueado por dos sitios *loxP*, es inyectado en la zona del cerebro de interés del animal transgénico que expresa la Cre recombinasa en un tipo específico de células. A pesar de que el virus infecte a todas las células, la opsina se sólo se expresará en el tipo de células que expresen la Cre recombinasa, resultando por tanto una expresión dirigida y específica (Fig 4).

Este método también tiene la ventaja de que es "actualizable". Una línea de ratones Cre existente se puede utilizar para muchos tipos diferentes de experimentos con muchas opsinas diferentes, con sólo un cambio de vector viral, algo muy importante dada la velocidad actual del desarrollo de la opsinas.

Este método se ha extendido recientemente usando recombinasas alternativas (por ejemplo Dre o FLP), en combinación con la recombinasa Cre, que permite marcar las células con más de una proteína.

3.3. Los sistemas de iluminación

Una vez que la opsina se expresa en las células deseadas, el paso final de la optogenética es la administración, a estas células, de luz de una determinada longitud de onda que desencadene la excitación o inhibición de las mismas, dependiendo del caso. Las fuentes de luz más comúnmente utilizadas son el láser y los diodos emisores de luz (LEDs). Al final del apartado comentaremos las ventajas y desventajas de cada una de estos métodos de iluminación.

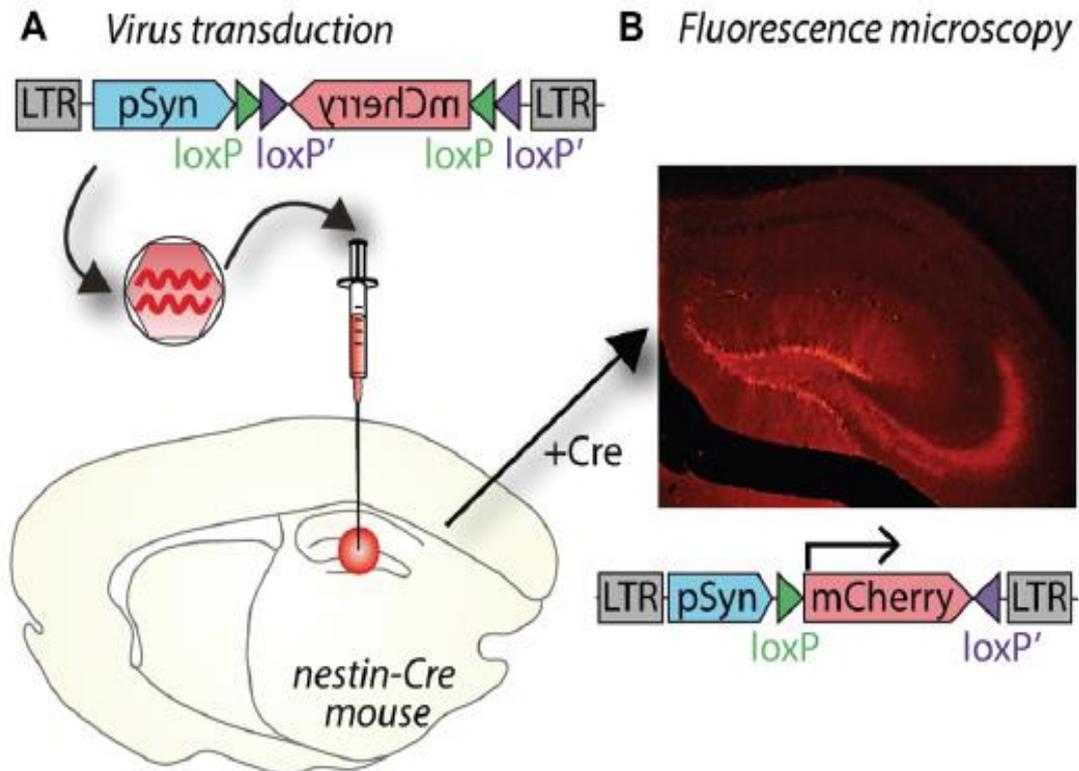


Figura 4. Uso potencial de Cre-lox y promotores específicos de células, para dirigir la expresión de genes tanto espacial como temporalmente. (A) Lentivirus (LV- sinapsina doble mCherry floxed) inyectado en la circunvolución dentada del hipocampo de un ratón nestin-cre. (B) La Cre expresada en las neuronas progenitoras nestina-positivas, hace que se recombine mCherry y permite la expresión en las nuevas neuronas a medida que se diferencian en neuronas granulares. La expresión de mCherry está por tanto restringida a las neuronas granulares nacidas después de la inyección de virus. Tomada de [Parr-Brownlie et al., 2015].

Cada opsina tiene un rango diferente de longitudes de onda al que va a responder. Idealmente, la célula se iluminará sólo con la longitud de onda a la que responde la opsina expresada por la célula, de tal manera que cualquier cambio en el comportamiento de la célula se atribuirá a un efecto de la opsina expresada y no a cualquier otro efecto fotosensible.

Los láseres son ideales por esta razón, ya que tienen un rango espectral estrecho (la distribución de longitudes de onda en la salida), una alta potencia y baja divergencia a la salida, lo que hace que pueda ser acoplado a la fibra óptica con alta eficiencia. La investigación también se está realizando con otras fuentes de luz, pero la mayoría tienen una anchura de banda espectral más grande y una mayor dificultad de acoplamiento a la fibra óptica, como es el caso de los LEDs.

Las longitudes de onda utilizadas en la investigación optogenética abarcan todo el espectro de luz visible. Dependiendo de las opsinas que se expresen, un laboratorio de optogenética puede requerir fuentes de iluminación en azul (450-480 nm), verde (520-560 nm), amarilla (570-600 nm), o rojo (600-780 nm). A veces una combinación de longitudes de onda se utiliza para activar y silenciar comportamientos celulares alternativamente. En este caso, se emplean los láseres con múltiples longitudes de onda, ya que permiten el uso del mismo sistema de aplicación del haz a la vez que permite un cambio rápido entre las longitud de onda administradas.

El suministro de luz al sitio de destino se puede lograr de varias maneras. El método más sencillo consiste en conectar la fuente de luz directamente al animal. Esto es sencillo, pero la adición de peso a la cabeza del animal puede plantear cuestiones prácticas o sugerir preguntas sobre si está influyendo en su comportamiento. Otra manera es a través de espejos de exploración, que dirigen el haz en el sitio diana, pero esto tiene la desventaja de requerir la inmovilización del animal y, por lo tanto, restringe los tipos de comportamientos que pueden ser investigados.

Debido a estas desventajas, el método más popular para la investigación de la conducta consiste en utilizar una fibra óptica de peso ligero (Fig 5).

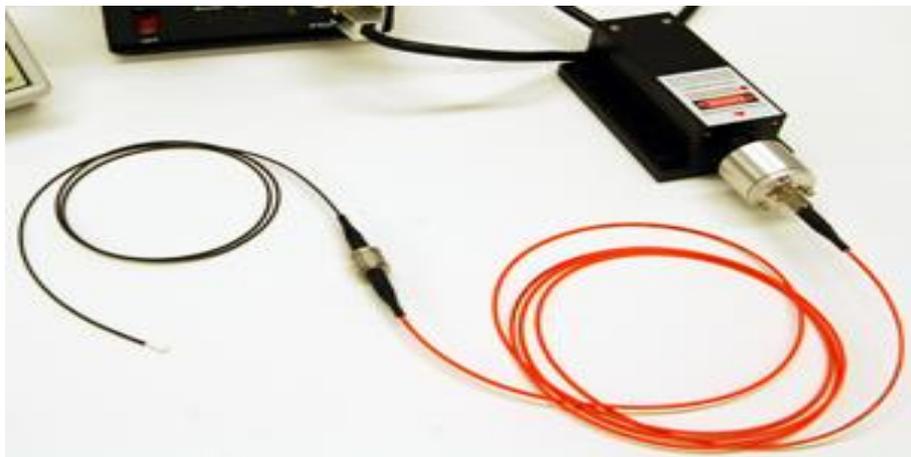


Figura 5. Cable de fibra óptica ligero unido a un láser. Tomado de [laserglow].

La administración de luz a través de microelectrodos de fibra óptica (optrodos) supone una gran ventaja cuando se trata de manipular optogenéticamente estructuras intracraneales específicas situadas en una zona profunda del cerebro. Estas fibras ópticas de pequeño diámetro ($\sim 200 \mu\text{m}$) minimizan el daño tisular y pueden acoplarse de manera eficiente a las fuentes de luz láser.

La fibra óptica se puede cortar a la longitud apropiada para apuntar una región específica del cerebro y, o bien puede utilizarse directamente en el cráneo o insertarse a través de una cánula para facilitar manipulaciones farmacológicas simultáneas. Además, pueden colocarse de forma bilateral o utilizarse en otras configuraciones si se quieren controlar grandes regiones del cerebro. Es decir, la baja divergencia y alta potencia del haz de láser permite utilizar varios componentes ópticos y se pueden combinar con otras técnicas para manipular la actividad de neuronas individuales o lograr ciertos patrones de estimulación.

Los primeros experimentos se realizaron utilizando láseres. Como hemos dicho anteriormente, su alta potencia, el rango espectral estrecho y la baja divergencia que presentan en la salida hace que sea fácil de acoplar en la fibra óptica, con una eficiencia muy alta. Los láseres todavía dominan el campo de iluminación en optogenética, basándose en estas consideraciones tecnológicas. El hecho de que los láseres hayan sido utilizados en experimentos anteriores de manera eficaz, hace que muchos investigadores no se atrevan a probar diferentes formas de iluminación.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los LEDs son una opción viable. LEDs de alta potencia, en las longitudes de onda optogenética más comunes, están actualmente disponibles para ciertos experimentos, ofreciendo algunas ventajas con respecto a los láseres.

Características como su bajo coste, su pequeño tamaño y bajo consumo de energía hacen que los LED sean una opción atractiva para la estimulación óptica, cuando se requiere iluminación múltiple o para utilizarlos en dispositivos inalámbricos portátiles. Sin embargo, la baja eficiencia de acoplamiento del LED a la fibra óptica limita la utilidad de fuentes de luz LED para determinadas situaciones. La baja potencia resultante en la punta de la fibra, y la generación de calor puede resultar problemáticos.

La elección de la fuente de luz más adecuada dependerá de la naturaleza de la investigación. No hay una fuente de luz superior en todos los contextos, por lo que es importante tener en cuenta las ventajas y desventajas en cada caso, antes de tomar una decisión. Los láseres ofrecen todavía una potencia de salida tras su acoplamiento de la fibra y un bajo ancho de línea espectral, que no puede ser igualada por los LED, como se ilustra en la imagen (Fig 6).

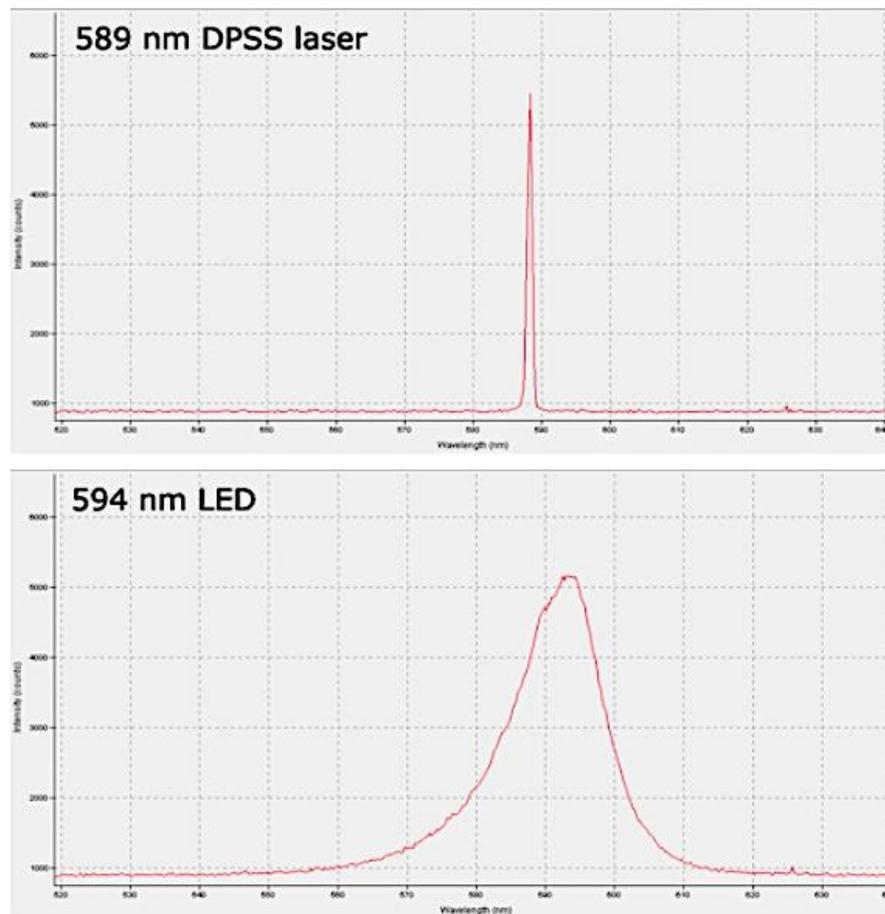


Figura 6. Comparación de los espectros de salida con una fuente de luz láser respecto a un LED. La escala en ambas imágenes es la misma, para ilustrar la diferencia significativa en la anchura de banda espectral. Tomada de [laserglow].

4. APLICACIONES CLÍNICAS DE LA OPTOGENÉTICA

4.1. Estudio y tratamiento de la epilepsia.

El objetivo principal en la investigación de la epilepsia es comprender los mecanismos que subyacen a las convulsiones para que los pacientes con epilepsia puedan recibir un tratamiento eficaz o curarse, a ser posible, sin efectos secundarios significativos.

La estimulación eléctrica y el tratamiento farmacológico con antiepilépticos, han sido las bases de la investigación de la epileptogénesis y del tratamiento de la epilepsia durante muchos años. Sin embargo, estas técnicas tienen ciertos inconvenientes. La estimulación eléctrica genera grandes artefactos que interfieren con registro eléctrico y carece de especificidad espacial; es imposible estimular subclases específicas de neuronas. Por su parte, el tratamiento farmacológico nos ofrece muy poca resolución temporal.

La epilepsia afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. A pesar de la eficacia del tratamiento con drogas antiepilépticas, más del 20% de pacientes tienen crisis epilépticas refractarias a la terapia médica y muchos pacientes experimentan efectos secundarios a la misma. Por lo tanto, hay una necesidad de encontrar nuevas terapias para estos pacientes. [Bentley et al., 2013].

La neuromodulación a través de la optogenética, permite el control espacio-temporal preciso de las células y circuitos implicados, ofreciendo una esperanza a estos pacientes, ya que ha demostrado su eficacia en el tratamiento de las crisis epilépticas en modelos animales.

A continuación hablaremos sobre los avances más recientes en el desarrollo de esta prometedora técnica en el tratamiento de la epilepsia y como puede contribuir la optogenética al conocimiento y al tratamiento de la epilepsia en un futuro.

4.1.1. Inhibición de células piramidales

Las neuronas piramidales corticales son la unidad de excitación primaria en las estructuras del prosencéfalo (telencefalo y diencefalo; o lo que es lo mismo, los hemisferios cerebrales, el tálamo y el hipotálamo). La formación de nuevos circuitos de excitación recurrente después de lesiones cerebrales es un importante contribuyente a la epileptogénesis; se ha encontrado un aumento de excitación de las neuronas piramidales en casos de epilepsia crónica. [Zhao et al., 2015].

Una estrategia de terapia optogenética consiste en usar el promotor **CaMKII II** unido a una opsina inhibitoria como la **halorhodopsina NpHR3.0**. El promotor CaMKII II hará que la expresión de dicha opsina se produzca únicamente en las neuronas piramidales. La fotoestimulación inducirá la inhibición de estas neuronas excitatorias, reduciendo así la actividad epiléptica. (Fig 7).

A través de lentivirus que contienen información genética del promotor CaMKII II unido a la NpHR cultivado con cortes de tejido de hipocampo, se consiguió su expresión en células piramidales. Tonnesen et al. demostraron que tras estimulación lumínica, la inhibición de las neuronas piramidales que expresan NpHR fue eficaz en la atenuación del exceso de excitación tras inducir una crisis epiléptica [Tonnesen et al., 2009].

También se han demostrado algunos resultados *in vivo* en el hipocampo y neocortex. En un modelo *in vivo* de epilepsia del lóbulo temporal (TLE), inducida por la inyección de pilocarpina-litio, Sukhotinsky et al, utilizando la eNpHR3.0 con CaMKII II α como promotor, fueron capaces de retrasar la

aparición de convulsiones 6 min en comparación con los controles, y de reducir la elevada actividad gamma (biomarcador de actividad excitatoria) [Sukhotinsky et al., 2013].

En otro modelo *in vivo* de epilepsia de lóbulo temporal, inducida por la inyección de ácido caínico, en el que los investigadores utilizaron también el promotor CaMKII II α y la opsina inhibitoria NpHR en un ratón Cre dependiente, el 57 % de las convulsiones se detuvo al segundo de la administración lumínica, y la duración de las mismas disminuyó en un 70% [Krook-Magnuson et al., 2013].

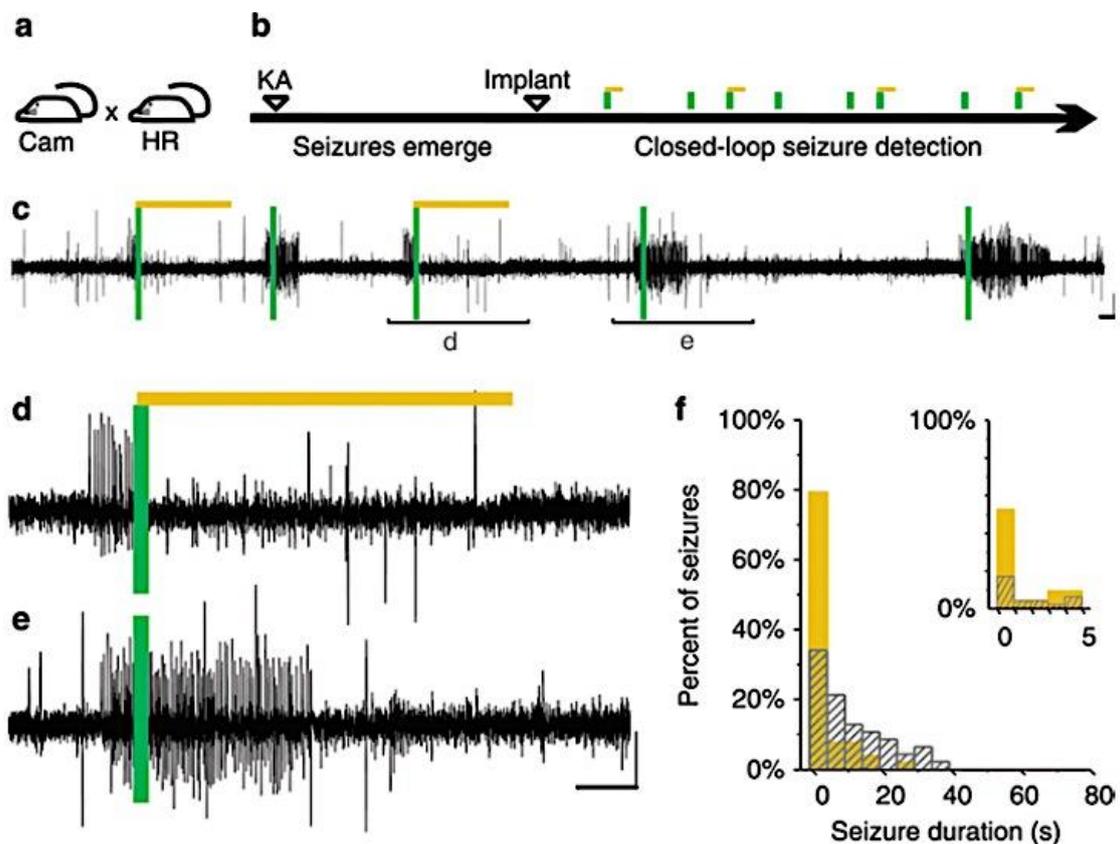


Figura 7. Control de actividad epiléptica en ratones expresando halorhodopsin (HR) en células piramidales en un modelo de epilepsia del lóbulo temporal. a) Generación de ratones que expresan HR en células excitatorias. b) Protocolo experimental. c-e) Detección de actividad epiléptica (línea verde), emisión de luz amarilla aleatoriamente en el 50% de eventos (luz: línea amarilla en el ejemplo d, sin luz en e). f) Distribución de la duración de las crisis post-detección con luz (amarillo) y sin luz, control (en gris parcheado). KA=ácido kaínico. Tomado de [Bentley et al., 2013].

4.1.2. Excitación de interneuronas inhibitorias (o subpoblaciones de interneuronas)

Se trata de limitar tanto el inicio como la propagación del ataque epiléptico. Esta otra estrategia optogenética para modular la actividad epiléptica y prevenir el inicio de convulsiones, consiste en estimular las interneuronas a través de opsinas que produzcan su despolarización, como ChR2 o C1V1, junto diferentes promotores [Zhao et al., 2015].

Podemos tomar como objetivo a todas las interneuronas, utilizando en este caso como promotor el ácido γ -aminobutírico (GABA); o seleccionar ciertas subpoblaciones de interneuronas, utilizando promotores como parvalbúmina (PV), colecistoquinina (CCK), neuropéptido Y (NPY), y la somatostatina (SST). Estas subclases de interneuronas tienen una diferente conectividad funcional a las neuronas principales. Por ejemplo, las células que expresan SST, marcan dominios dendríticos, mientras que otras, por ejemplo, las que expresan PV, marcan compartimentos perisomáticos, con diferente resultado funcional en la generación del potencial de acción en las células principales. Esto hace que podamos excitar diferentes subclases de interneuronas de manera específica, consiguiendo una inhibición somática o dendrítica según el promotor que utilicemos.

Se ha demostrado eficacia en la influencia que tiene esta estrategia optogenética sobre la actividad epiléptica tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.

4.1.3. Control de células excitatorias e inhibitorias.

Otra estrategia optogenética es tratar de influir tanto en las células excitatorias e inhibitorias de forma simultánea.

Este enfoque puede llevarse a cabo de muchas formas. Sin embargo, experimentalmente, lo que se intentó fue utilizar un promotor ubicuo como la Synapsina unido a una opsin inhibitoria (eNpHR3.0) que puede hiperpolarizar todos los tipos celulares. La synapsina humana, al ser un promotor pan-neuronal, dirige la expresión de la eNpHR3.0 tanto en neuronas excitatorias como inhibitorias.

Una estrategia que todavía no se ha llevado a cabo sería excitar interneuronas e inhibir las células piramidales de forma simultánea.

4.1.4. Control de otros componentes implicados en la epilepsia

En lugar de tratar de modificar directamente el propio foco epiléptico, la optogenética también se ha utilizado tomando como objetivo otras áreas del cerebro que pueden interaccionar con la gran red de circuitos implicados en la generación de convulsiones epilépticas.

Una de estas estructuras es el tálamo. En un estudio, [Paz et al., 2013] tras inducir una convulsión cortical mediante photothrombosis de colorante rosa de Bengala, se inyectó el virus con la información genética para eNpHR3.0 bajo el promotor CamKII, en el tálamo. Se utilizó un sistema optogenético de circuito cerrado (véase más adelante), para la detección de convulsiones en tiempo real y su interrupción, y se vio que la iluminación con luz amarilla (594nm) a través de un optrodo multisitio, interrumpió las actividades electroencefalo-gráficas de epilepsia en el tálamo y la corteza. Por otra parte, también se encontró que la luz láser en la intensidad utilizada para silenciar las convulsiones no afectó a los ritmos fisiológicos normales en los animales estudiados. Sin embargo, aunque los autores muestran ejemplos de la terminación completa de algunas convulsiones no está claro si esto se produjo en todos los ataques o convulsiones o sólo en algunos.

Otra diana potencial del tratamiento optogenético de la epilepsia es el cerebelo. Se demostró [Krook-Marnuson et al., 2014] una modesta reducción de la duración de los ataques epilépticos del 33% y ningún efecto en el intervalo entre las crisis tras la iluminación del hemisferio cerebeloso en un ratón con ChR2 en las células que expresaban parvalbúmina. La iluminación de la línea media del cerebelo es más eficaz, ya que se vio que retrasaban, con un aumento del 175%, el tiempo entre una convulsión y otra. La expresión de la opsina restringida a las neuronas de Purkinje, la salida del cerebelo, se consiguió en ratones utilizando como promotor la PCP2 (proteína de células de Purkinje 2) con ChR2 como opsina. Tras la iluminación sobre la línea media del cerebelo, la duración de las convulsiones disminuyó y el tiempo entre las convulsiones aumentó.

Además del papel fundamental desempeñado por las células piramidales y las interneuronas en la epileptogénesis, las células gliales, especialmente los astrocitos y la microglia, también juegan un papel importante en la fisiopatología de la epilepsia, que puede suponer un objetivo importante para la fotoestimulación [Devinsky et al., 2013]. Los estudios en células gliales no se han llevado a cabo aún, pero es de esperar que se investigue en ello en un futuro muy próximo.

4.1.5. Sistema optogenético de circuito cerrado

Aunque la iluminación constante es factible, esta forma de aplicar la optogenética puede interrumpir procesos corticales normales que estén ocurriendo en la red neuronal patológica en los momentos que no haya crisis epilépticas. Por lo tanto, se requiere de un método automatizado de detección y predicción de la crisis epiléptica que ponga en marcha la estimulación lumínica (Fig 8).

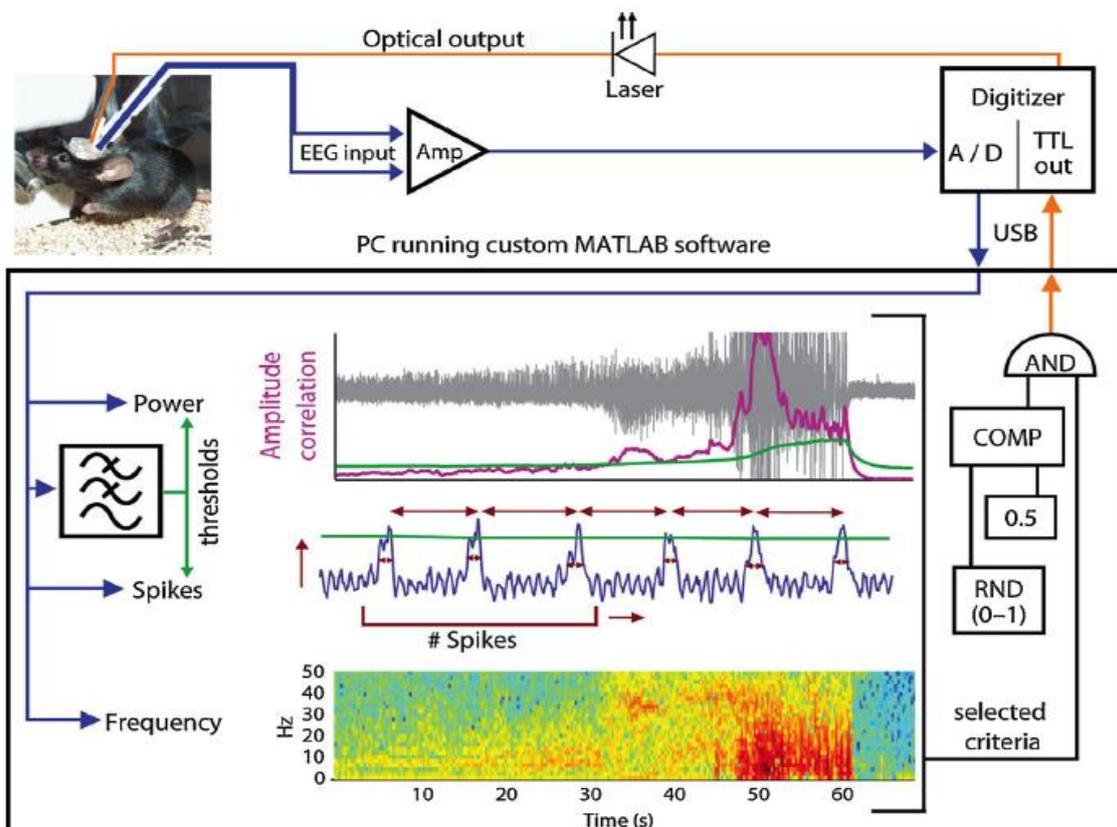


Figura 8. Diseño de un sistema de circuito cerrado. El EEG de entrada (azul) desde el hipocampo del ratón es amplificado (Amp), digitalizado (A / D) y transmitido a un ordenador con software de detección de convulsiones a tiempo real. Utilizando las características de potencia de la señal, los spikes o la frecuencia, se detectan todos los algoritmos posibles. Los umbrales para la potencia y los spikes (verde) se determinan usando integradores sintonizables que actúan como filtros de paso bajo. **Arriba:** amplitud (púrpura, durante una convulsión que se representa en gris); **Medio:** spikes (por ejemplo, la amplitud, la frecuencia, la regularidad y la anchura de pico, que se muestra en rojo); **Abajo:** potencia de la señal representada en bandas de frecuencia específica en una misma convulsión, con colores cálidos se representa una energía más alta. Una vez que se ha detectado una convulsión usando estos criterios seleccionados, en el 50% de los eventos de forma aleatoria, el software activa la salida óptica (naranja) hacia el hipocampo del ratón, a través de una señal TTL desde el digitalizador al láser. Tomado de [Zhao et al., 2015].

La incorporación de un bucle de realimentación haría el método optogenético más eficaz en la inhibición de la actividad epileptiforme, como se explica en la siguiente imagen, ya que el control podría aplicarse sólo cuando las ondas de convulsiones sean detectadas [Selvaraj et al., 2014].

4.1.6. Retos en la investigación de la epilepsia. Perspectivas futuras

Varias preguntas fundamentales surgen en el campo de la optogenética con respecto al impacto que tendrá en la investigación aplicada al tratamiento de la epilepsia. Abundan preguntas sin contestar, muchas de las cuales son críticas para que el marco y la dirección en los próximos años permitan que la optogenética evolucione a tratamientos clínicamente relevantes [Zhao et al., 2015]. Vamos a analizar algunas de estas cuestiones.

4.1.6.1. Protocolo de fotoestimulación.

Los parámetros de iluminación optimizados son la clave para el control optogenético. La intensidad de la luz y la transmisión de la luz a través del tejido del cerebro han sido estudiadas experimentalmente y mediante cálculos teóricos. Sin embargo, los parámetros de estimulación espaciotemporal todavía no son completamente entendidos en la investigación optogenética de la epilepsia. ¿Durante cuánto tiempo debería aplicarse la fotoestimulación? ¿La iluminación continua es mejor que la estimulación intermitente? ¿Cuál es la frecuencia ideal de iluminación? ¿La frecuencia y la duración de la iluminación pueden tener impacto en el resultado final?

4.1.6.2. Aplicación a la clínica humana.

Como hemos dicho, hay un número de problemas que deben ser resueltos antes de que las técnicas optogenéticas se conviertan en una realidad terapéutica (Chow and Boyden, 2013). Esto incluye la transfección segura y efectiva del correspondiente gen de canalrodopsina, la implantación de electrodos para el acceso de la luz o, alternativamente, el desarrollo de métodos de iluminación externos (no invasivos) y, finalmente, el diseño de algoritmos fiables de detección de las convulsiones.

La terapéutica optogenética requerirá la distribución de construcciones genéticas en el organismo, por medio de vectores virales, tal como se ha experimentado ya en diferentes especies, incluidas ratón, rata, pez cebra y mosca; pero esta tecnología está lejos de ser establecida en humanos.

Hay tres enfoques generales de distribución del virus que contiene la información genética de la opsina requerida (Samulski and Muzyczka, 2014). El

primer enfoque es usar órganos depósito, tales como el hígado o músculo, para efectuar la síntesis y secreción de una proteína. En un segundo enfoque, la inyección intravenosa sistémica se usaría para tratar enfermedades que afectan a todas las células, tales como enfermedades de almacenamiento de lisosomas. Un mayor reto para la distribución sistémica en la epilepsia ha sido el identificar vectores capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. La tercera alternativa es una inyección directa, por cirugía, en una región específica de un cerebro enfermo (Sanftner et al., 2005).

Como explicábamos al principio, las opsinas sensibles a la luz desplazada al rojo serían útiles para la inhibición optogenética no invasiva porque la luz roja penetra más lejos en el tejido, incluso a través del cráneo.

4.1.6.3. Detección a tiempo real de la actividad epiléptica

Las convulsiones ocurren raramente con cualquier clase de periodicidad fiable. Por tanto, la terapia optogenética para tener éxito, requerirá un dispositivo de circuito cerrado con algoritmos fiables de predicción de convulsiones.

Aunque puede ser posible abortar las convulsiones una vez que han empezado, la terapia ideal requerirá la habilidad para prevenir las convulsiones antes de que estas ocurran (Berényi et al., 2012). En el punto anterior describíamos los mecanismos del dispositivo de circuito cerrado, que utiliza como marcadores para predecir convulsiones parámetros de EEG o datos de la señal registrada, tales como amplitud, frecuencia, o potencia (Krook-Magnuson et al., 2013; Paz et al., 2013).

Recientemente, una nueva clase de microconvulsiones ha sido identificada en el tejido epiléptico humano (Schevon et al., 2008; Stead et al., 2010). Esas microconvulsiones, que ocurren en redes neuronales extremadamente pequeñas, juegan un papel importante en el inicio de las convulsiones epilépticas (Kramer et al., 2010). Por otra parte, se han descrito cambios hemodinámicos focales o vasoconstricción previos al comienzo electrofisiológico de la convulsión, en un caso humano de lesión neo cortical y en modelos animales (Zhao et al., 2007, 2011).

Hace tan sólo 10 años que la optogenética fue introducida en el campo de la neurociencia. A pesar del enorme progreso en las herramientas ópticas y genéticas, y los prometedores resultados preliminares en animales, la aplicación de la optogenética como terapia para la epilepsia aún es limitada.

4.2. OPTOGENÉTICA Y SECCIÓN MEDULAR

Según la Organización Mundial de la Salud, el término "lesión medular espinal" se refiere a "daño en la médula espinal como consecuencia de un traumatismo o de una enfermedad o por razones degenerativas". Debido a la falta de datos, especialmente de los países en desarrollo, no existe una estimación fiable de la prevalencia mundial de la lesión medular; pero de manera aproximada, se puede decir que hay 40-80 casos por millón de habitantes. Solamente en EE.UU. hay más de 273.000 pacientes con lesión de la médula espinal.

La mayoría de los casos de lesión medular se deben a traumatismos, pero los casos por causas no traumáticas también están aumentando [World Health Organisation].

La mayoría de los individuos que sufren una lesión medular mueren antes de llegar al hospital, y los que sobreviven se enfrentan a un alto riesgo de morbilidad y mortalidad. Además, los costes económicos relacionados con la lesión medular son enormes y suponen una gran carga económica para la economía de cualquier país y, particularmente, para los países en vías de desarrollo. Además, no solo conlleva pérdidas económicas, sino también un gran sufrimiento personal y familiar.

Después de la lesión medular, las neuronas motoras se rompen y hay una pérdida de la función motora del cuerpo. La optogenética puede jugar un papel vital en la reconstrucción de los circuitos neuronales dañados. Una opsina o proteína sensible a la luz, puede ser expresada en las neuronas motoras y de esta manera activarse tras ser estimuladas por una luz de determinada longitud de onda (Fig 9). De lo contrario, las motoneuronas permanecen en estado latente debido a la falta de regeneración y también son incapaces de desarrollar conexiones con otras neuronas en el otro lado de la lesión [Houle et al., 2006].

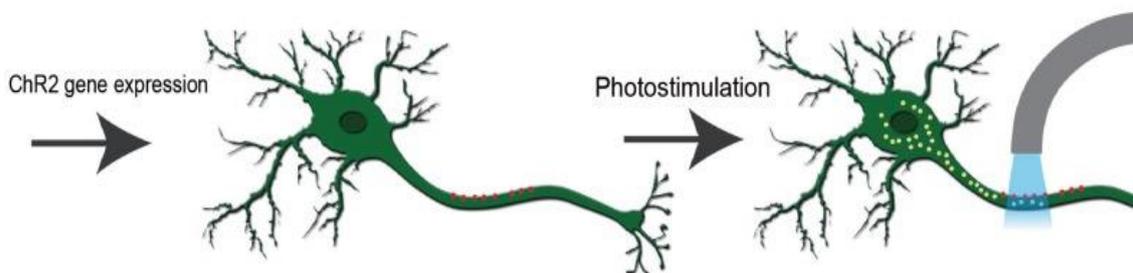


Figura 9. Bases del tratamiento experimental de la sección medular mediante optogenética. Inicialmente el gen de la ChR2 se expresa en las neuronas y después, tras estimularles con luz de una longitud de onda específica, se activan. Tomado de [Ahmad et al., 2015].

A continuación, analizaremos algunos ejemplos concretos de aplicación de la optogenética en los casos de sección medular [Ahmad et al., 2015].

4.2.1. Restauración de la función respiratoria después de la sección medular

De todas las secciones medulares, las lesiones a nivel cervical son las más comunes y suelen dar lugar a graves problemas respiratorios, ya que se produce una interrupción de la transmisión bulboespinal al núcleo frénico ipsilateral, lo que normalmente produce parálisis unilateral.

En un estudio [Alilain et al., 2008] se introdujo el vector viral Sindbis, que contenía el gen ChR2, en la materia gris de la médula espinal de ratas después de una sección de la médula en la región C2. Los resultados indicaron claramente que se produjo la expresión de ChR2 tanto en las neuronas motoras espinales y las interneuronas, y que tras la activación de ChR2 por la luz azul, hubo recuperación de la actividad muscular y restauración de la actividad respiratoria en las ratas lesionadas.

4.2.2. Restauración de la función vesical

Las secciones medulares dan como resultado, entre otras cosas, la pérdida de funciones corporales bajas como el correcto funcionamiento de la vejiga, o la función sexual; las cuales son difíciles de restaurar, disminuyendo mucho la calidad de vida del paciente.

En un estudio de optogenética y lesión medular, se introdujeron los genes de la ChR2 y halorhodopsina (NpHR) en la médula espinal de las ratas antes de la lesión medular, para comprobar la función de la vejiga después de la lesión [Awad et al, 2013]. Después de la lesión, la función de la vejiga fue restaurada tras la estimulación de las neuronas con luz. Es decir, las herramientas optogenéticas en neuronas motoras de la médula espinal consiguen recuperar la función urinaria después de una sección medular. Esto se ha conseguido experimentalmente en ratas, y sobre la base de estos prometedores resultados, puede ser ensayado y utilizado en los seres humanos para restablecer las funciones vesicales, entre otras, después de la lesión.

4.2.3. El control de la función muscular

Después de una sección medular, hay una pérdida de conexión entre las neuronas, motoras y sensoriales, del sistema nervioso central y periférico. Si se estimula eléctricamente el sistema nervioso periférico, se induce la contracción muscular. Pero, como los nervios periféricos se componen de diferentes axones sensoriales y motores, la estimulación eléctrica no sólo estimula los nervios motores indiscriminadamente sino que también causa malestar sensorial considerable. Por lo tanto, es necesaria una activación más específica de los nervios que integran los troncos nerviosos.

Gracias a la gran especificidad que nos ofrece la optogenética, esta técnica puede suponer la solución al problema planteado en el párrafo anterior y otros similares. En un estudio [Towne et al., 2013] se expresó el gen ChR2 en las neuronas motoras de ratones. Tras ser estimulados lumínicamente, se consiguió la excitación específica de los axones de estas neuronas motoras, consiguiendo de esta manera el control optogenético de la función muscular. Es decir, que gracias a la estimulación optogenética, se puede restaurar la función muscular de una manera controlada y específica después de la lesión medular u otras lesiones cerebrales traumáticas; cobrando importancia en la medicina regenerativa.

4.3. OPTOGENÉTICA Y PATOLOGÍA RETINIANA

La optogenética es también una herramienta potencialmente útil para restaurar la visión en pacientes con degeneración de los fotorreceptores [Yao et al., 2012]. Los conos y los bastones de la retina de mamíferos son los principales fotorreceptores. Tras el proceso de fototransducción a nivel de los fotorreceptores, la información lumínica se transmite por medio de una cadena de células intermedias (células bipolares), a las células ganglionares de la retina. Los axones de las células ganglionares forman el nervio óptico, a través de estaciones de relevo en tálamo, finalizan en las áreas corticales que procesan la información visual. La muerte de las células fotorreceptoras, causado por enfermedades degenerativas de la retina como la retinitis pigmentosa (véase más adelante), pueden provocar una pérdida completa de la respuesta de la retina a la luz, dejando parcialmente ciego al paciente.

La retinitis pigmentosa es una de las enfermedades oftalmológicas degenerativas hereditarias más comunes. Como comentábamos anteriormente, se produce la pérdida progresiva de los fotorreceptores, es decir de los conos y los bastones. Los síntomas iniciales incluyen la ceguera nocturna, que

progresivamente se intensifica y se pierde la visión periférica, causando la "visión de túnel" o "cañones de escopeta".

Los conos y los bastones son las únicas células de la retina que poseen la capacidad de absorber fotones, por lo que la completa degeneración de estas células fotorreceptoras llevará finalmente a la pérdida de la visión central, y por tanto a la ceguera.

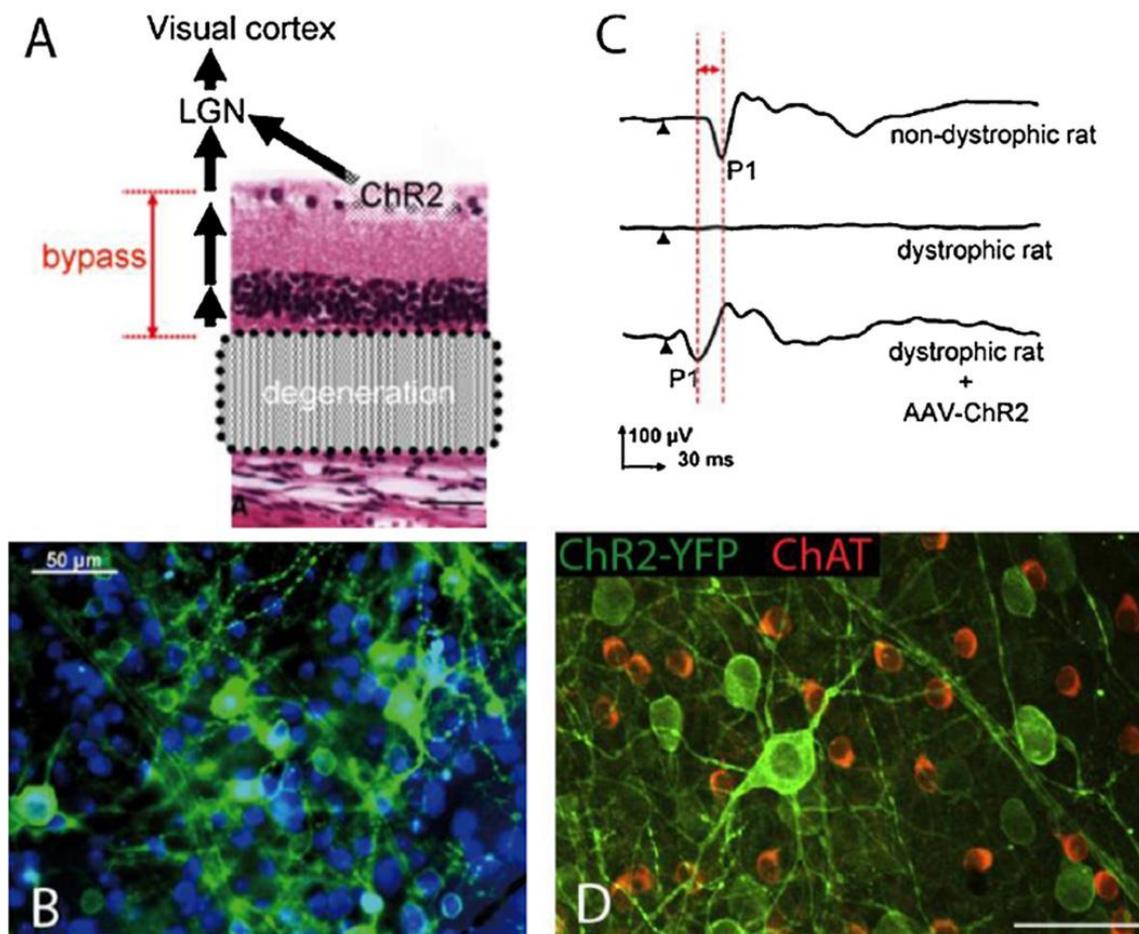


Figura 10. (A) Las células ganglionares de la retina que expresan ChR2 son capaces de absorber los fotones directamente, omitiendo las vías mediadas por células bipolares. **(B)** Células ganglionares de la retina que expresan la ChR2. **(C)** Potencial evocado visual, en una rata no distrófica, una rata distrófica y otra rata distrófica pero a la que se ha transfectado la ChR2 a través de un AAV. **(D)** Ratones transgénicos que expresan ChR2-YFP; las células colinérgicas marcadas con ChaT, no expresan ChR2-YFP. Tomado de [Natasha et al., 2013].

Otra patología retiniana que afecta al 45% de los pacientes mayores de 65 años con deterioro de la visión, es la degeneración macular. En estos pacientes, se conserva la visión periférica, pero no la central [Natasha et al, 2013].

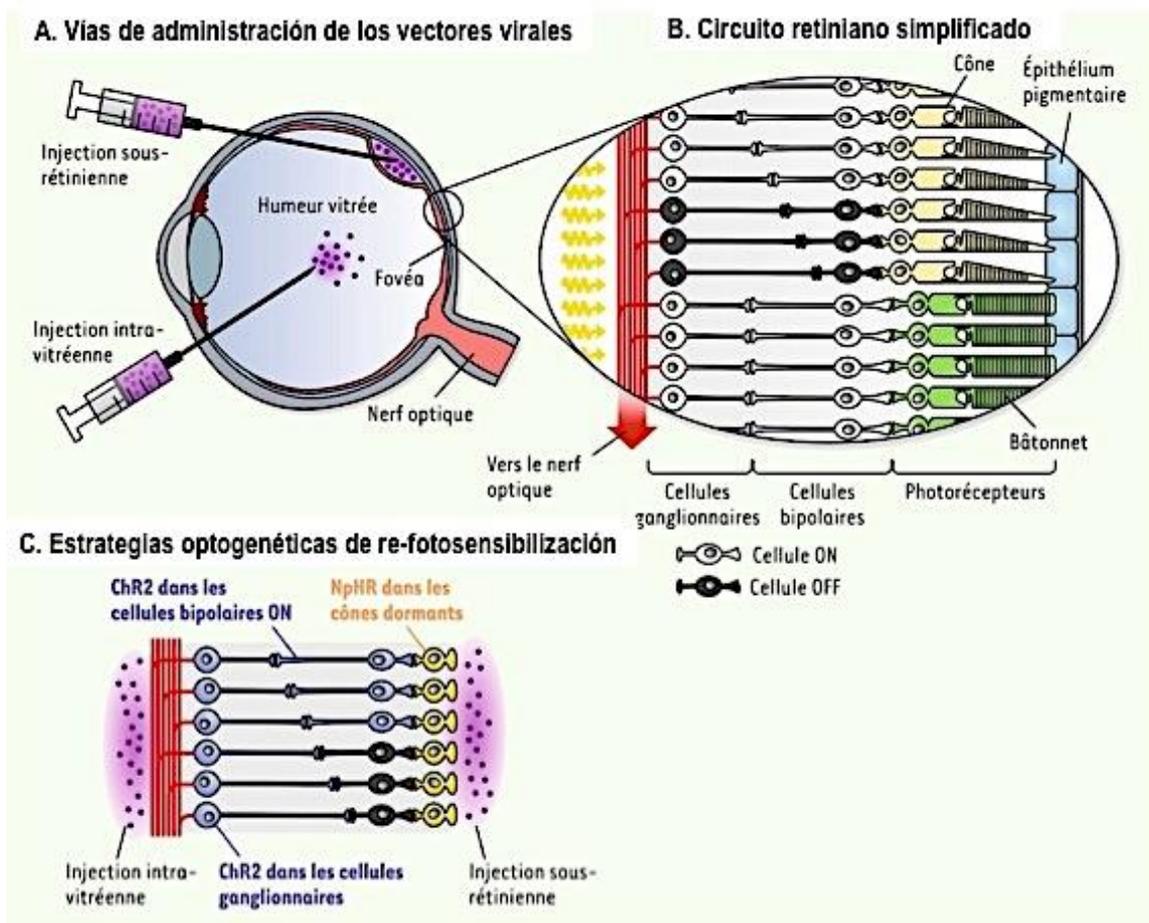


Figure 11. Diferentes opciones para el tratamiento optogenético de la retinitis pigmentosa. **A.** Esquema anatómico del ojo humano. Los vectores virales pueden ser inyectados en el humor vítreo o en la retina. Las inyecciones subretinianas presentan el inconveniente de poder dañar un tejido ya muy frágil por el proceso degenerativo. **B.** Esquema simplificado de un circuito retiniano mostrando los dos tipos de circuitos (ON y OFF). No se han representado todos los tipos celulares. **C.** Estadio avanzado de degeneración retiniana en el cual, ciertos conos subsisten como células atrofiadas (“durmientes”). La re-fotosensibilización del circuito puede conseguirse mediante la expresión de ChR2 en las células ganglionares (accesibles por vía intra vítrea), por la expresión de ChR2 en las células bipolares de tipo ON, o de NpHR en los conos “durmientes” (accesibles por inyección subretiniana o intravítrea). Tomada de [Vandecasteele et al., 2015].

Desafortunadamente, no existe en la práctica clínica ningún tratamiento eficaz para cualquiera de estas patologías. Sin embargo, la optogenética y el descubrimiento de la ChR2 ofrecen una esperanzadora opción terapéutica para estas patologías.

Recientemente se ha demostrado que la expresión de la opsina ChR2 en las células ganglionares [Doroudchi et al., 2011], puede restaurar habilidades visuales simples en ratones y ratas genéticamente ciegos, ya que son capaces de responder al estímulo luminoso directamente, omitiendo las vías mediadas por fotorreceptores y células bipolares (Fig 10). Además, la coexpresión de

ChR2/haloR en las células ganglionares de la retina puede producir respuestas ON-OFF, dependiendo de la longitud de onda del estímulo de luz [Zhang et al., 2009].

Estos experimentos indican que la optogenética puede ser una terapia viable y eficaz para tratar enfermedades relacionadas con la ceguera. Además, este método nos ofrece la ventaja de poder ser utilizado como agente terapéutico para estas patologías visuales, independientemente de la etiología de la degeneración retiniana. La figura 11 muestra las hipotéticas vías de tratamiento optogenético de la retinitis pigmentosa en humanos [Vandecasteele et al., 2015].

4.4. OPTOGENÉTICA Y PARKINSON

La enfermedad de Parkinson es una patología neurodegenerativa que afecta a más de seis millones de personas en todo el mundo. Esta causada por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la "sustancia negra". Estas neuronas se proyectan sobre un conjunto de estructuras subcorticales: los ganglios basales (Fig 12).

Los ganglios basales están implicados en funciones cognitivo-motoras, tales como el control y la ejecución de movimientos voluntarios, la selección de programas motores, emocionales y cognitivos adaptados al contexto ambiental, el aprendizaje procedimental y la formación de hábitos de comportamiento.

La denervación dopaminérgica de los ganglios basales provoca una serie de cambios patológicos en su actividad. Aparece una triada de síntomas motores bastante incapacitantes (temblor en reposo, rigidez y bradicinesia), junto con una serie de trastornos cognitivos que van desde síntomas leves (déficit de atención, memoria o funciones ejecutivas, tales como la planificación acciones del sujeto) hasta la demencia [Lang and Lozano, 1998].

La diana principal de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra es el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen), que también es el punto de entrada de las vías aferentes corticales a los ganglios basales. El cuerpo estriado contiene dos poblaciones de neuronas que expresan receptores dopaminérgicos de diferentes subtipos (D1 y D2). Según el modelo clásico, las neuronas que expresan el receptor D1 son responsables de la activación de la vía directa, cuyo efecto es facilitar la ejecución de los movimientos (efecto procinético), y son activados por la dopamina. Las neuronas que expresan el receptor D2 inhiben la vía indirecta, la cual tiende a inhibir el movimiento (efecto anti-cinético). De esta manera, al inhibir una vía inhibitoria tienen un efecto procinético de manera indirecta. Por lo tanto, la denervación dopaminérgica de

la sustancia negra, reduciría la actividad de la vía directa (procinética), y activará la vía indirecta (anticinética) por desinhibición, produciéndose en ambos casos la inhibición de los movimientos.

Actualmente, el principal agente terapéutico para luchar contra la deficiencia de dopamina en la enfermedad de Parkinson, es la administración de levodopa (L-DOPA) por vía oral. Este tratamiento es eficaz a corto y medio plazo, corrigiendo la actividad patológica de los ganglios basales y aliviando los síntomas motores. Sin embargo, a medio-largo plazo esta terapia se vuelve ineficaz, causando fluctuaciones motoras y discinesias tan invalidantes como los síntomas que causa la propia enfermedad [Prashanth et al., 2011]. Es en esta fase de la enfermedad, cuando se propone a algunos pacientes (sólo el 15%) un tratamiento neuroquirúrgico alternativo, desarrollado en la década de 1990: la estimulación cerebral profunda (ECP), de alta frecuencia eléctrica, de uno de los componentes de los ganglios basales: el núcleo subtalámico (STN) [Benabid et al., 1994].

La neuromodulación a través de la optogenética, aplicada en un modelo de ratón con enfermedad de Parkinson, ha sido capaz de identificar la vía neuronal cuya estimulación es probablemente la responsable del efecto terapéutico de la ECP [Gradinaru et al., 2009].

Investigadores de la Universidad de Stanford fueron capaces de demostrar que la fotoestimulación del haz cortico-motor subtalámico (representado en verde en la figura 12) en una línea de ratones transgénicos que expresen ChR2 en las neuronas de proyección de la neocorteza, pero no en las neuronas del NST, es suficiente para reproducir los efectos de la estimulación cerebral profunda sobre el NST, explicado en el párrafo anterior [Drouot et al., 2004].

Pero además, la optogenética ofrece una interesante alternativa terapéutica a la estimulación eléctrica, ya que tendría como objetivo sólo el componente de conducción del haz cortico-subtalámico (el de la corteza motora) a diferencia de la ECP del NST, que puedan afectar a los componentes aferentes corticales asociados y límbicos del NST, que puede conducir a la depresión, hipomanía, y síndromes confusionales [Mallet et al., 2007].

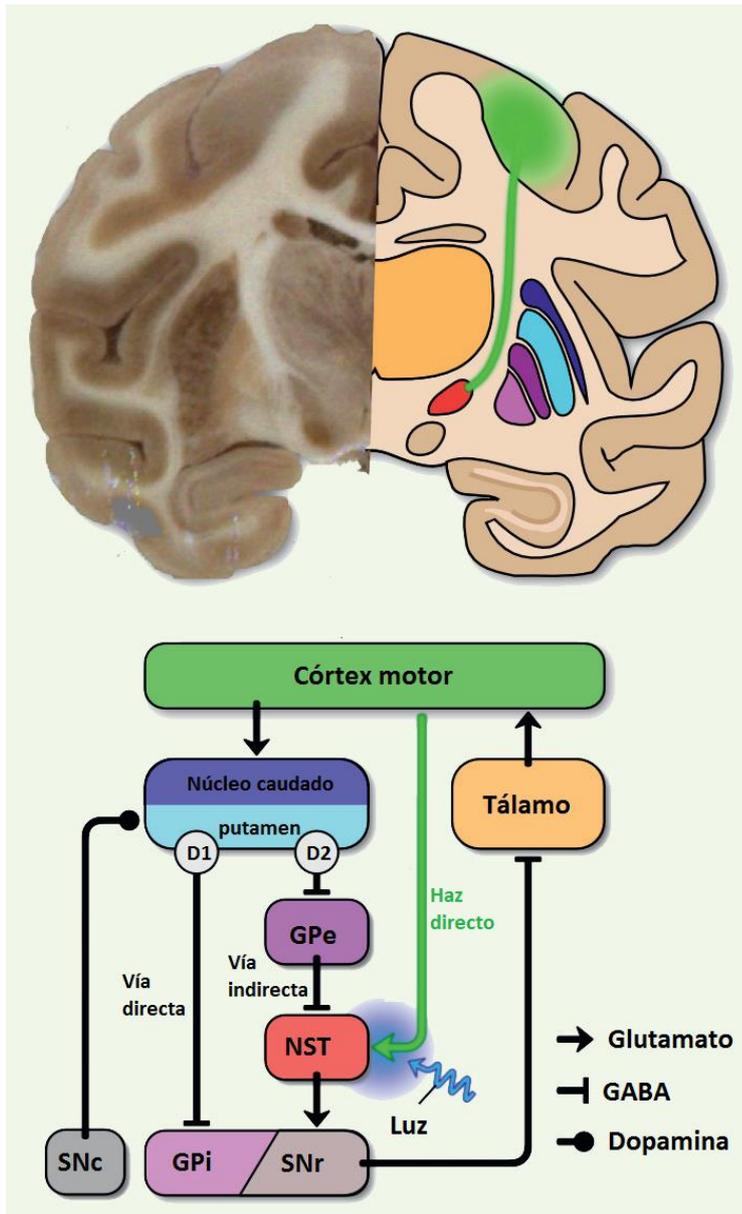


Figura 12. Participación de la vía córtico-talámica en el mecanismo de acción de estimulación de núcleo subtalámico en los pacientes con Parkinson. **A.** La fotografía (Izquierda) y el dibujo (derecha) representa un corte coronal del cerebro humano. Los ganglios basales en el dibujo se muestran en un código de colores que se corresponde con los utilizados en el diagrama B, y el haz corticoespinal subtalámico se muestra en verde. **B.** Diagrama de conectividad de los ganglios basales simplificado, que representa la vía directa, la vía indirecta y el haz corticoespinal subtalámico. En ratones, la fotoestimulación (flecha azul) selectiva de las fibras aferentes en el núcleo subtalámico es suficiente para producir efectos antiparkinsonianos. D1 y D2: neuronas estriatales expresando dopamina D1 y D2, respectivamente; GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; NST: núcleo subtalámico; SNC: sustancia negra pars compacta; SNr: sustancia negra pars reticulata. Tomada de [Vandecasteele et al., 2015].

4.5. OPTOGENÉTICA Y PATOLOGÍA CARDIACA

La actividad eléctrica del corazón es el resultado de un sistema organizado de células funcionalmente distintas, distribuidas espacialmente dentro del corazón. La completa comprensión de la función de estas estructuras distintas, tanto en condiciones normales como patológicas, se ha visto obstaculizada debido a la falta de herramientas con una resolución espacial y temporal que nos permitan manipularlas de manera selectiva e independiente.

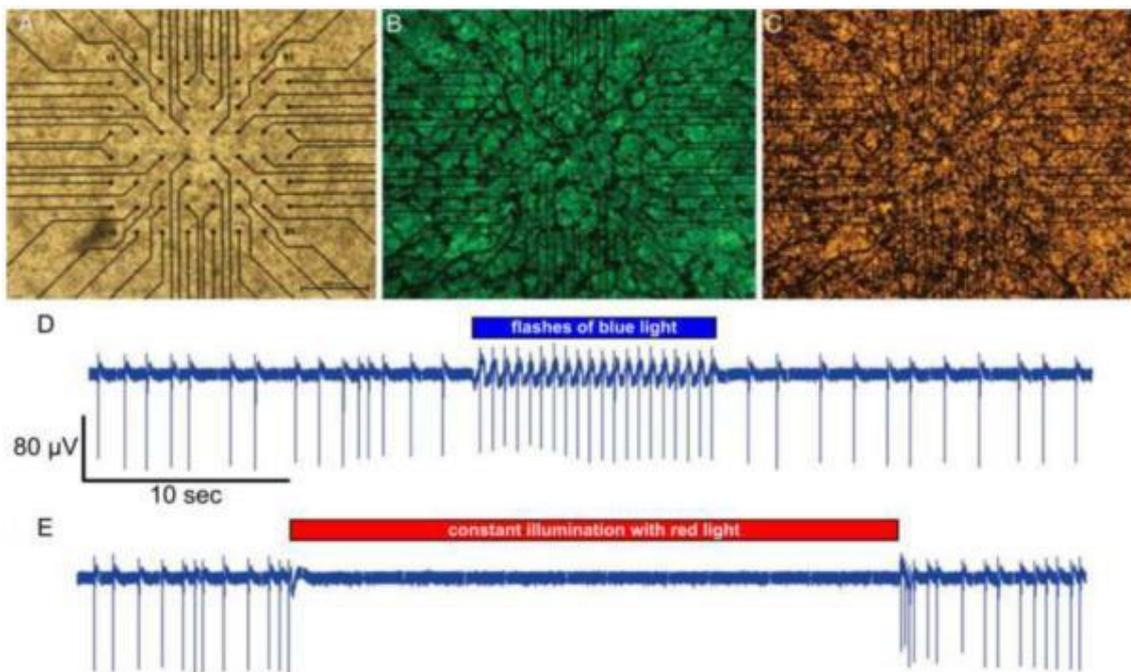


Figura 13. Estimulación e inhibición de la actividad espontánea de células cardiacas fotosensibles, debido a la transfección a las mismas de ChR2 y ArchT. **(A- C)** Cardiomiocitos con Chr2 (verde) y ArchT (naranja), patrones de expresión se resaltan en B y C , respectivamente. **(D)** Secuencia de 20 flashes de luz azul (470nm) que hace que se estimulen las células a una frecuencia de 100 Hz. **(E)** Supresión de la activación espontánea debido a la iluminación con luz roja (624 nm) durante 30 s. Tomada de [Boyle et al., 2015].

La optogenética, como hemos destacado a lo largo del trabajo, permite la estimulación selectiva y específica de los diferentes tipos celulares y un preciso control espacio-temporal de la función biológica, incluyendo la manipulación de voltaje de la membrana, las concentraciones intracelulares, el control del receptor, la expresión génica etc. La optogenética ofrece soluciones potenciales y podría superar varias limitaciones de electroterapia convencional para el tratamiento de algunas patologías cardiacas como son las arritmias, teniendo un gran impacto en la investigación cardiaca [Ambrosi et al., 2014].

Una ventaja potencial importante de optogenética es que gracias a la especificidad que nos ofrece, permite una estimulación de un tipo de células a baja energía. Por ejemplo, la estimulación del haz de His para volver a sincronizar la contracción ventricular en pacientes con insuficiencia cardiaca, rara vez se realiza con los métodos convencionales debido a altos umbrales de estimulación requeridos y el hecho de que la estimulación eléctrica a menudo excita tanto el haz de His como el tabique interventricular, dando lugar a patrones anormales de activación [Barba-Pichardo et al., 2013]. Sin embargo, la optogenética nos permite la estimulación del haz de His de manera específica y a baja energía, solucionando ambos problemas [Boyle et al., 2013].

Otra aplicación clínica de la optogenética en patología cardiaca es la modulación dinámica de la duración del potencial de acción. Muchos trastornos del ritmo son causados por potenciales de acción patológicamente alargados o acortados. Las terapias farmacológicas para hacer frente a este problema son imprecisas y carecen de especificidad. Un uso potencialmente beneficioso de la optogenética es aplicar largos estímulos luminosos, de baja amplitud, para modular dinámicamente la forma del potencial de acción en las células que expresan la opsina. Recientemente se ha demostrado [Karathanos et al., 2014] que la terapia basada en la optogenética da mejores resultados que el tratamiento farmacológico para la restauración de la duración del potencial de acción en un modelo de células auriculares en las condiciones del síndrome de QT corto.

Por último, la aplicación clínica más tentadora de la optogenética en patología cardiaca es la desfibrilación cardiaca basada en la luz, ya que podría ofrecer una alternativa completamente libre de dolor a las descargas eléctricas usadas por los dispositivos actualmente existentes, a la vez que consume mucha menos energía. La estimulación selectiva y específica del tejido o conjunto de células junto con la baja energía requerida, evitaría la excitación de los músculos esqueléticos que rodean el corazón durante los choques de alta energía, aliviando así el dolor asociado a ello [Boyle et al., 2015].

5. CONCLUSIONES

La optogenética es una nueva herramienta científica que permite estimular células excitables, como las neuronas, en milisegundos con gran resolución temporal y espacial. Ha allanado el camino para un enorme número de aplicaciones en las áreas de las neurociencias básicas y aplicadas.

Los resultados en modelos animales han proporcionado una gran esperanza para la traslación del uso de esta tecnología a los seres humanos. En el futuro, la optogenética podría ser una herramienta valiosa para el tratamiento de muchas enfermedades neurológicas y cardíacas, pero es necesario seguir trabajando para superar las limitaciones que todavía persisten.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad A, Ashraf S, Komai S. Optogenetics Applications for Treating Spinal Cord Injury. *Asian Spine J* 2015; 9(2): 299-305.
2. Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* 2009; 458:1025–1029.
3. Alilain WJ, Li X, Horn KP, et al. Light-induced rescue of breathing after spinal cord injury. *J Neurosci* 2008; 28: 11862–11870.
4. Ambrosi CM, Klimas A, Yu J and Entcheva E. Cardiac Applications of Optogenetics. *Prog Biophys Mol Biol* 2014; 115(0): 294–304.
5. Awad BI, Gutierrez DV, Alilain W, Steinmetz MP. Optogenetic photoestimulation to control bladder function after experimental spinal cord injury. *Spine J* 2013; 13: S12.
6. Bamann C, Gueta R, Kleinlogel S, Nagel G, Bamberg E. Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry* 2010; 49:267–278.
7. Barba-Pichardo R, Sánchez AM, Fernández-Gómez JM, Moríña-Vázquez P, Venegas-Gamero J, Herrera-Carranza M. Ventricular resynchronization therapy by direct His-bundle pacing using an internal cardioverter defibrillator. *Europace*. 2013; 15(1): 83–8.
8. Benabid AL, Pollak P, Gross C, et al. Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Stereotact Funct Neurosurg* 1994; 62: 76-84.
9. Berndt A, Yizhar O, Gunaydin L A, Hegemann P, Deisseroth K. Bi-stable neural state switches. *Nat* 2009; 12:229–234.
10. Bentley JN, Chestek C, Stacey WC. Optogenetics in epilepsy. *Neurosurg Focus* 2013; 34(6):E4 doi: 10.3171/2013.3.FOCUS1364.
11. Berényi A, Belluscio M, Mao D, Buzsáki G. Closed-loop control of epilepsy by transcranial electrical stimulation. *Science* 2012; 337, 735-737.

12. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 2005; 8:1263–1268.
13. Boyden ES. A history of optogenetics: the development of tools for controlling brain circuits with light. *Biol Rep* 2011; 3: 11.
14. Boyle PM, Williams JC, Ambrosi CM, Entcheva E, Trayanova NA. A comprehensive multiscale framework for simulating optogenetics in the heart. *Nat Commun* 2013; 4: 2370.
15. Boyle PM, Karathanos TV and Trayanova NA. “Beauty is a Light in the Heart”: The Transformative Potential of Optogenetics for Clinical Applications in Cardiovascular Medicine. *Trends in cardiovascular medicine* 2015; 25: 73-81.
16. Chow BY, Boyden ES. Optogenetics and translational medicine. *Sci Transl Med* 2013; 5, 177ps175.
17. Crick FH. Thinking about the brain. *Sci Am* 1979; 241:219–232.
18. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci* 2013; 36, 174-184.
19. Doroudchi MM, Greengard KP, Liu J, Silka KA, Boyden ES, Lockridge JA, Arman AC, Janani R, Boye SE, Boye SL, Gordon GM, Matteo BC, Sampath AP, Hauswirth WW, Horsager A. Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness. *Mol ther* 2011; 19 (7):1220-1229.
20. Drouot X, Oshino S, Jarraya B, et al. Functional recovery in a primate model of Parkinson’s disease following motor cortex stimulation. *Neuron* 2004; 44: 769-78.
21. Guru A, Post RJ, Ho YY, Warden MR. Making Sense of optogenetics. *Inter J Neuropsychopharm* 2015. doi: 10.1093/ijnp/pyv079.
22. Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, et al. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 2009; 324: 354-9.
23. Houle JD, Tom VJ, Mayes D, Wagoner G, Phillips N, Silver J. Combining an autologous peripheral nervous system "bridge" and matrix modification by chondroitinase allows robust, functional regeneration beyond a

- hemisection lesion of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 2006; 26: 7405–7415.
24. Karathanos TV, Boyle PM, Trayanova NA. Optogenetics-Enabled Dynamic Modulation of Action Potential Duration in Atrial Tissue: Feasibility of a Novel Therapeutic Approach. *Europace* 2014; 115: 294–304.
 25. Kramer, MA, Eden, UT, Kolaczyk, ED, Zepeda, R, Eskandar, EN, Cash, SS. Coalescence and fragmentation of cortical networks during focal seizures. *J. Neurosci* 2010; 30, 10076–10085.
 26. Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat. Commun* 2013; 4, 1376.
 27. Laserglow. <https://www.laserglow.com/page/optogenetics>.
 28. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 1998; 339: 1044-53.
 29. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 1998; 339: 1130-43.
 30. Mallet L, Schupbach M, N'Diaye K, et al. Stimulation of subterritories of the subthalamic nucleus reveals its role in the integration of the emotional and motor aspects of behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 10661-6.
 31. Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E. Channelrhodopsin-2, a directly lightgated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* ; 100:13940–13945.
 32. Natasha G, Tan A, Farhatnia Y, Rajadas J, Hamblin M.R, Khaw P.T, Seifalian A. M. Channelrhodopsins: visual regeneration and neural activation by a light switch. *N Biotechnol* 2013; 30 (5): 461-474.
 33. Parr-Brownlie LC, Bosch-Bouju C, Schoderboeck L, Sizemore RJ, Abraham WC and Hughes SM. Lentiviral vectors as tools to understand central nervous system biology in mammalian model organisms. 2015. doi: 10.3389/fnmol.2015.00014.

34. Paz JT and Huguenard JR. Optogenetics and Epilepsy: Past, Present and Future. *Epilepsy Curr.* 2015; 15 (1):34-38.
35. Paz JT, Davidson TJ, Frechette ES, Delord B, Parada I, Peng K, Deisseroth K, Huguenard JR. Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury. *Nat. Neurosci* 2013; 16, 64–70.
36. Pendharkar AV, Levy SL, Ho AL, Sussman ES, Cheng MY, Steinberg GK. Optogenetic modulation in stroke recovery *Neurosurg Focus* 2016; 40(5):E6. doi: 10.3171/2016.2.FOCUS163.
37. Prashanth LK, Fox S, Meissner WG. L-Dopa-induced dyskinesia-clinical presentation, genetics, and treatment. *Int Rev Neurobiol* 2011; 98: 31-54.
38. Rein ML, Deussing JM. The optogenetic (r)evolution. *Mol Genet Genomics.* 2012; 287 (2): 95-109.
39. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annu Rev Virol* 2014; 1, 427-451.
40. Sanftner LM, Sommer JM, Suzuki BM, Smith PH, Vijay S, Vargas JA, Forsayeth JR, Cunningham J, Bankiewicz KS, Kao H, Bernal J, Pierce AAV2-mediated gene delivery to monkey putamen: evaluation of an infusion device and delivery parameters. *Exp Neurol.* 2005;194(2):476-83.
41. GF, Johnson KW. AAV2- mediated gene delivery to monkey putamen: evaluation of an infusión device and delivery parameters. *Exp Neurol* 2005; 194, 476-483.
42. Schevon CA, Ng SK, Cappell J, Goodman RR, Mckhann GJ, Waziri A, Branner A, Sosunov A, Schroeder CE, Emerson RG. Microphysiology of epileptiform activity in human neocortex. *J Clin Neurophysiol* 2008; 25, 321-330.
43. Selvaraj P, Sleight J, Freeman W, Kirsch H, Szeri A. Open loop optogenetic control of simulated cortical epileptiform activity. *J. Comput. Neurosci* 2014; 36, 515–525.
44. Stead M, Bower M, Brinkmann BH, Lee K, Marsh WR, Meyer FB, Litt B, Van Gompel J, Worrell GA. Microseizures and the spatiotemporal scales of human partial epilepsy. *Brain* 2010; 133, 2789-2797.

45. Sukhotinsky I, Chan AM, Ahmed OJ, Rao VR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Majewska AK, Cash SS. Optogenetic delay of status epilepticus onset in an in vivo rodent epilepsy model. *Plos one* 2013; 8, e62013.
46. Tonnesen J, Sorensen AT, Deisseroth K, Lundberg C, Kokaia M. Optogenetic control of epileptiform activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106,12162–12167.
47. Towne C, Montgomery KL, Iyer SM, Deisseroth K, Delp SL. Optogenetic control of targeted peripheral axons in freely moving animals. *Plos One* 2013; 8: e72691.
48. Vandecasteele M, Senova YS, Palfi S, Dugué GP, 2015. Potentiel thérapeutique de la neuromodulation optogénétique. *Médecine/sciences* 2015; 31 : 404-16.
49. World Health Organization (WHO). Spinal cord injury: fact sheets [Internet]. Geneva: WHO; 2013. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs384/en/>.
50. Yao JP, Hou WS, Yin ZQ. Optogenetics: a novel optical manipulation tool for medical investigation. *Int J Ophthalmol* 2012; 5 (4).
51. Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'Shea DJ, Sohal VS, Goshen I, Finkelstein J, Paz JT, Stehfest K, Fudim R, Ramakrishnan C, Huguenard JR, Hegemann P, Deisseroth K. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 2011; 477:171–178.
52. Zemelman BV, Lee GA, Ng M, Miesenbock G. Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron* 2002; 33:15–22.
53. Zhang Y, Ivanova E, Bi AD, Pan ZH. Ectopic expression of multiple microbial rhodopsins restores ON and OFF light responses in retinas with photoreceptor degeneration. 2009; 29(29):9186-9196.
54. Zhao M, Nguyen J, Ma H, Nishimura N, Schaffer CB, Schwartz TH. Preictal and ictal neurovascular and metabolic coupling surrounding a seizure focus. *J. Neurosci* 2011; 31, 13292–13300.
55. Zhao M, Suh M, Ma H, Perry C, Geneslaw A, Schwartz TH. Focal increases in perfusion and decreases in hemoglobin oxygenation precede seizure onset in spontaneous human epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48, 2059.

56. Zhao M, Alleva R, Ma H, Daniel AG, Schwartz TH. Optogenetic tools for modulating and probing the epileptic network. *Epilepsy Res* 2015; 116: 15-26.