



universidad  
de león



FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

# Optogenética

# Optogenetics

**Gloria Martínez García**

Grado en Biología

Julio, 2020

*Gloria*

## ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición e importancia	1
1.2 Consideraciones y avances	1
1.3 Breve historia de la Optogenética	2
2 OBJETIVOS DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO	3
3. ANÁLISIS BIBLIOMÉTRICO SOBRE LA OPTOGENÉTICA	3
3.1 Metodología y resultados	3
4 BASES CIENTÍFICAS DE LA OPTOGENÉTICA Y CONSIDERACIONES TÉCNICAS	7
4.1 Fundamento científico	8
4.1.1 ¿Qué son las opsinas?	8
4.1.2 Características de las opsinas	10
4.1.2.1 Cinéticas de activación	10
4.1.2.2 Propiedades de los canales y bombas	11
4.1.2.3 Modificaciones genéticas en opsinas	12
4.1.3 Tipos de luz detectados por opsinas	13
4.2 Consideraciones técnicas de la Optogenética	15
4.3 Avances técnicos en los últimos años	21
5 APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LA OPTOGENÉTICA	23
5.1 Tratamiento para la epilepsia	23
5.2 Tratamiento del Parkinson	24
5.3 Tratamiento de patologías retinianas	25
6 CONCLUSIONES	27
7 BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXO I	31

## **Resumen**

La Optogenética es una técnica en auge basada en la utilización de métodos genéticos y ópticos, con el fin de activar y/o inhibir funciones específicas de un grupo neuronal concreto. Esta técnica se basa en proteínas fotosensibles denominadas opsinas, cuyos genes codificantes se insertan junto al promotor de expresión en la población neuronal de interés mediante diversos métodos, siendo los sistemas de expresión víricos los más utilizados. Las opsinas son controladas mediante una combinación de cable de fibra óptica y electrodo denominada “optrodo”, el cual se encarga de administrar luz (láser o LED) a las células diana para permitir la estimulación neuronal. El interés principal por la optogenética es debido a sus aplicaciones en Biomedicina, habiéndose estudiado su utilidad en tratamientos como la epilepsia, el parkinson, patologías retinianas, patologías cardíacas, lesiones de médula espinal, narcolepsia y adicción a la cocaína. La técnica, que ya se ha probado en experimentación animal para algunas patologías, requiere de futuros avances en experimentación para solventar los diferentes interrogantes y lograr el tratamiento de las diferentes patologías de forma exitosa a nivel humano, por lo que sus futuras aplicaciones son sumamente prometedoras.

## **Summary**

Optogenetics is a growing technique based on the use of genetic and optical methods, in order to activate and inhibit specific functions of a specific neuronal group. This technique is based on photosensitive proteins called opsins, whose coding genes are inserted together with the expression promoter in the neuronal population of interest using various methods, with viral expression systems being the most widely used. The opsins are controlled by a combination of fiber optic cable and electrode called “optrode”, which oversees administering light (laser or LED) to the target cells to allow neuronal stimulation. The main interest in Optogenetics is due to its possible applications in Biomedicine, having studied its utility in treatments such as epilepsy, Parkinson's, retinal pathologies, cardiac pathologies, spinal cord injuries, Narcolepsy and cocaine addiction. The technique, which has already been tested in animal experimentation for some pathologies, requires future advances in experimentation to solve the different questions and successfully treat different pathologies at a human level, which is why its future applications are extremely promising.

# **1 INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Definición e importancia**

La optogenética se define como “la integración de técnicas genéticas y ópticas con objeto de activar o inhibir una función específica en un grupo concreto de células en tejidos vivos” (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

Esta técnica se basa en la introducción en las células de genes exógenos a estas, genes que codifican proteínas fotosensibles, capaces de modificar el comportamiento celular en respuesta a destellos de luz provenientes de un láser o un LED (Abad Torrent, 2014).

El desarrollo actual de este método está permitiendo importantes avances en el conocimiento preciso de los circuitos neuronales que controlan conductas y estados motivacionales y cognitivos específicos, como el aprendizaje o la memoria entre otros. Mediante la activación/inhibición de una población discreta de neuronas específicas permite un control muy exacto de un proceso biológico en un sistema intacto, siendo los 3 sistemas posibles células de cultivo, preparaciones in vitro o animales vivos. De hecho, hasta su desarrollo no existía ningún método que permitiera el estudio in vivo de células individuales dentro de su entorno, algo crucial para entender cualquier proceso biológico (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

Si bien hoy en día, la optogenética es utilizada fundamentalmente en neurociencias, permitiendo el estudio de patologías como la enfermedad del Parkinson o la epilepsia, ofrece un gran potencial en otras áreas de conocimiento como es la Biomedicina, por su aportación a diversas enfermedades, abordando desde patologías cardíacas y ópticas, hasta el tratamiento de la narcolepsia o la adicción a la cocaína pasando por el desarrollo del cáncer (Abad Torrent, 2014).

## **1.2 Consideraciones y avances**

Se considera que la optogenética ha permitido la aclaración de numerosos interrogantes en torno al desarrollo de importantes enfermedades y su tratamiento, y se prevé que seguirá haciéndolo en el futuro.

El doctor Deisseroth, ganador del Premio Fundación BBVA Fronteras del Conocimiento en Biomedicina junto con Miesenböck y Boyden por la creación de la optogenética, prevé que las aplicaciones médicas más próximas de esta técnica estarán relacionadas con el sistema nervioso periférico frente al central. Esto hace referencia a que, muy probablemente, se pueda

utilizar la técnica para dolor postquirúrgico o ciertos tipos de ceguera. En cuanto a enfermedades como el alzheimer, el parkinson o la epilepsia llegarán en un futuro más lejano, aunque ya existen prometedores resultados.

También ha hablado de sus esperanzas en cuanto a la técnica otro de los creadores, el neurocientífico Edward Boyden, que está centrado en la búsqueda de tecnologías para solucionar los interrogantes sobre el movimiento de la información por el cerebro, “En este órgano todo es mucho más complejo de lo que imaginamos. Mi esperanza es que en las próximas décadas conozcamos su estructura, la visualicemos en acción y controlemos las células cerebrales individualmente. Entonces podríamos hacer modelos computacionales y comprender cómo emergen los pensamientos y las emociones de la red de circuitos cerebrales” (Sánchez, 2016).

La opinión del doctor Miesenböck es similar a la de otros investigadores. Explica lo esperanzador de este método, recalcando la cautela con la que ha de ser tratado ya que aún hay preguntas que han de ser resueltas. Este neurocientífico estudia en estos momentos los circuitos cerebrales que ofrecen información sobre el mecanismo del sueño y la vigilia (Sánchez, 2016).

Aunque los primeros intentos en primates inferiores todavía no han dado los resultados esperados en cuanto a control neuronal la optogenética es una técnica revolucionaria con tecnología innovadora, con aspiraciones a suceder a algunas de las técnicas clásicas de investigación cerebral y a crear un importante y nuevo camino en el desarrollo y control de los procesos mentales y en la terapia de sus patologías (Morgado, 2016).

### **1.3 Breve historia de la Optogenética**

Ya en el año 1979, Crick sugirió la necesidad de conseguir el control preciso de un grupo de neuronas sin alterar a sus vecinas, especulando incluso sobre conseguir esto mediante luz (Roza Fernández de Caleyá, 2015). Considerable tiempo más tarde, se realizó un experimento en el que se comprobó el potencial del láser en la estimulación de neuronas genéticamente modificadas, utilizando los fotorreceptores rodopsina de *Drosophila* para controlar la actividad neuronal en mamíferos (Zemelman *et al.*, 2002). Pero no fue hasta el año 2005, cuando se pudo hablar de avances optogenéticos reales, ya que se logró mejorar el experimento realizado en 2002. En este experimento, se consiguió por primera vez usar fotoestimulación en neuronas modificadas genéticamente para el control de comportamiento en un animal. Se demostró así que la estimulación mediante luz de grupos neuronales

permitía cambios característicos en el comportamiento de la mosca de la fruta. Activando solo dos de los miles de neuronas, la Optogenética hacía que las moscas empezaran a volar (Lima y Miesenböck, 2005). En ese momento, la técnica aún seguía presentando problemas relacionados con la proteína utilizada y su fotosensibilidad.

Estos inconvenientes relacionados con la elección de la proteína fueron solucionados en el año 2005, aunque ya desde 2004 se comenzó a trabajar con un tipo de proteínas capaces de reaccionar a la luz de una forma mucho más eficiente (Boyden *et al.*, 2005). La técnica se desarrolló a partir del descubrimiento de ciertas algas unicelulares que poseían unas proteínas de membrana que se comportan como canales iónicos en respuesta a la luz (Boyden *et al.*, 2005). La Optogenética surge tras la introducción en neuronas por primera vez de genes procedentes de algas unicelulares exógenos a estas, que codifican dichas proteínas sensibles a la luz.

Desde entonces la Optogenética ha seguido avanzando, por ejemplo, con proteínas que reaccionan a distintas velocidades y a diferentes tipos de luz, ampliando así la variedad de funciones cerebrales que pueden ser estudiadas.

La Optogenética ha sido calificada como “el método del año” el pasado 2011 por la revista Nature Methods.

## **2. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO**

1. Definir el método científico de la Optogenética y sus bases científicas, especialmente biofísicas, con un especial enfoque en las neurociencias.
2. Realizar un estudio bibliométrico sobre la importancia de la Optogenética en la Biología.
3. Analizar las principales aplicaciones biomédicas de la optogenética.

## **3. ANÁLISIS BIBLIOMÉTRICO SOBRE LA OPTOGENÉTICA**

Con el objetivo de conocer la evolución de la Optogenética a lo largo del tiempo, se ha analizado la progresión del número de publicaciones y citas relacionadas con el anterior término. Este análisis, ha permitido cuantificar el impacto e influencia de esta técnica en la investigación global de los últimos años.

### **3.1 Metodología y resultados**

En cuanto a la metodología seguida, se han realizado búsquedas con las palabras “Optogenética” y “Optogenetics” en seis buscadores científicos: Google Scholar, Pubmed,

Science Research, Scopus, Springerlink, Web of Science. Existen numerosos buscadores científicos, estos seis en concreto han sido elegidos por su gran popularidad y utilización en el ámbito académico.

El rango de tiempo estudiado abarca desde el año 2011 hasta el año 2019, debido a que, de la búsqueda de la palabra en años anteriores se han obtenido en torno a 10 resultados totales. El motivo de este año de partida es debido a que, en este año, la Optogenética fue mencionada como “el método del año” por la revista Nature Methods y se comenzó a incluir el término en el ámbito académico y científico.

En la primera figura (Figura 1), se analizó la evolución anual del número de publicaciones en los seis buscadores mencionados, con el fin de conocer la progresión anual en el número de publicaciones desde 2011. Posteriormente, se realizó otra figura (Figura 2) que refleja las publicaciones totales, es decir, se realizó la búsqueda en los diferentes buscadores, anotando el número total de referencias que estos ofrecían. Una vez obtenidas las dos figuras generales, se realizaron otras seis (Figura 3), una por buscador, donde se muestra la evolución respecto al número de citas.

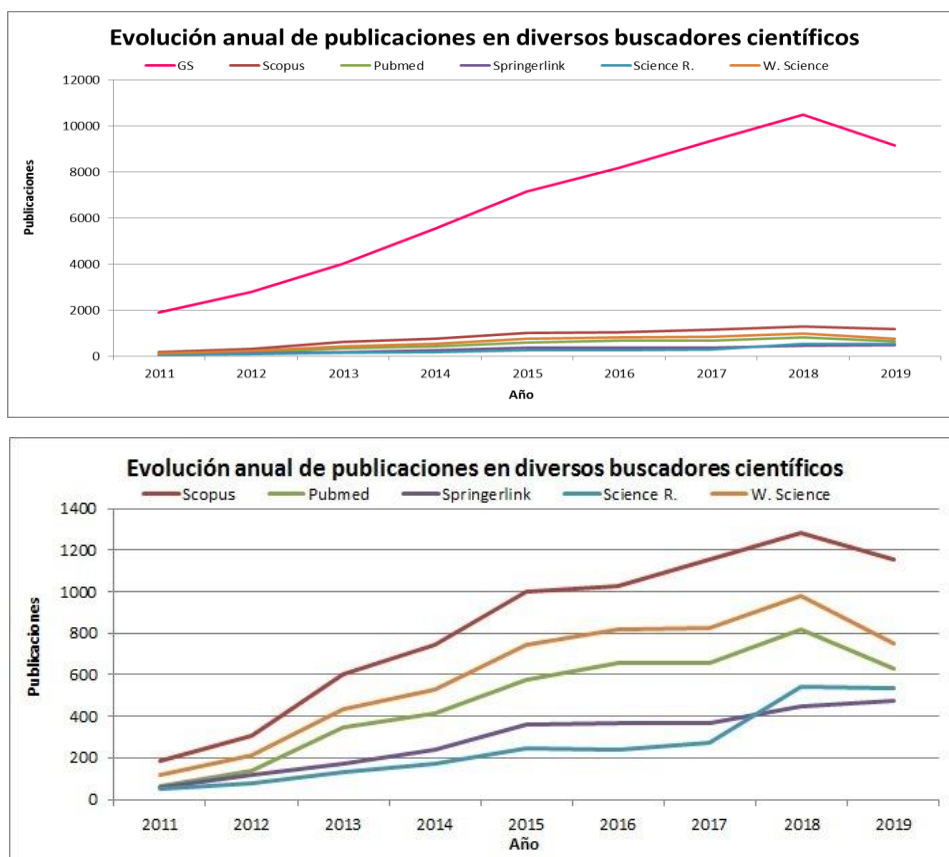


Figura 1. Evolución anual de publicaciones en diferentes buscadores científicos (arriba), y evolución anual de los mismos buscadores excluyendo GS para la observación clara de su tendencia (Elaboración propia).

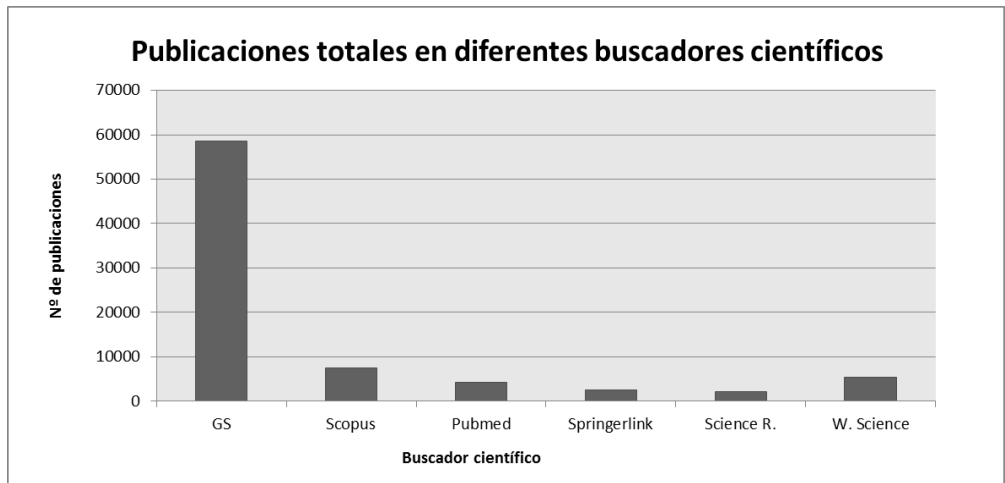


Figura 2. Publicaciones totales hoy en día en diferentes buscadores científicos (Elaboración propia).

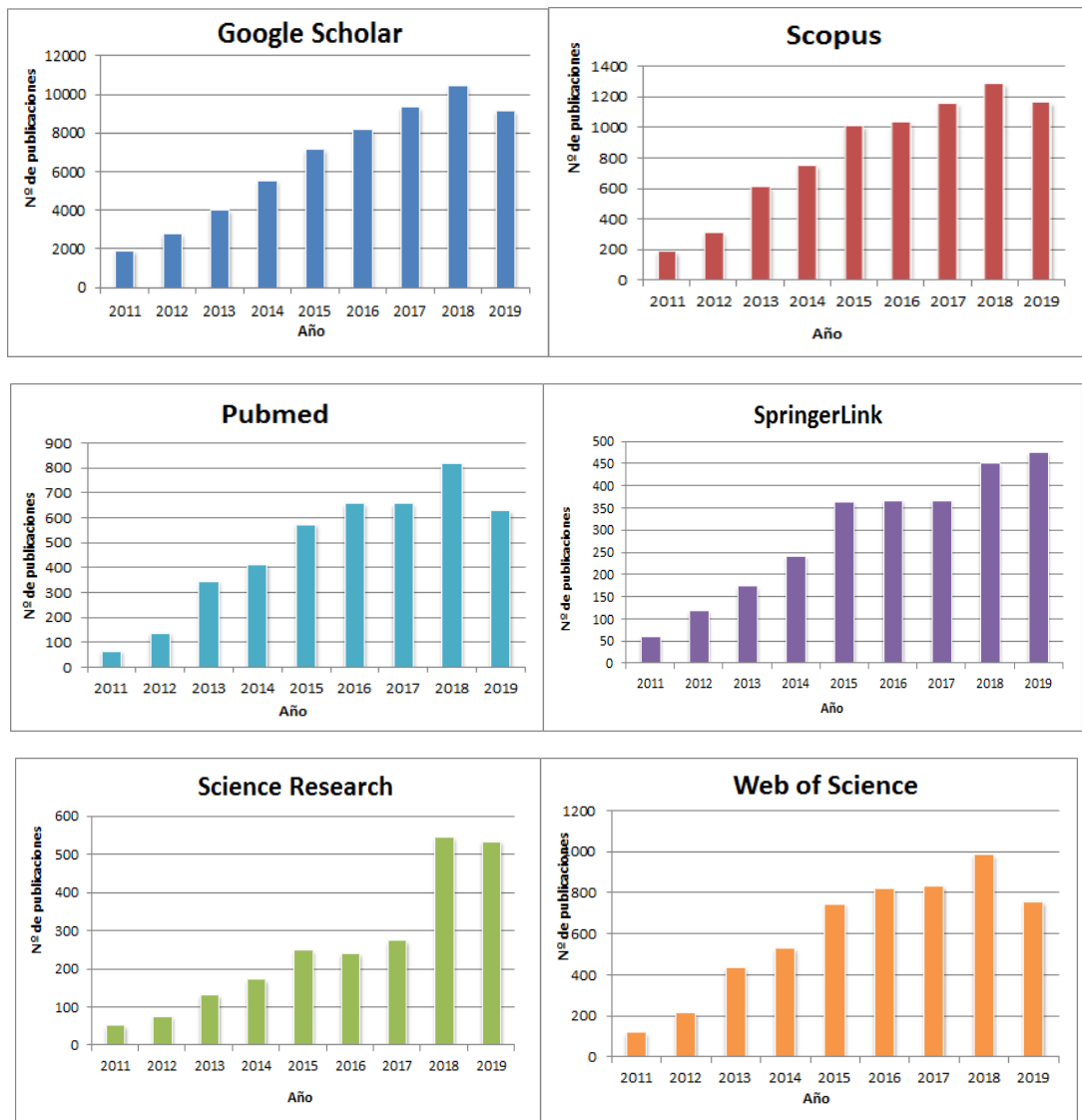


Figura 3. Evolución por buscador en el número de publicaciones (Elaboración propia).



Cabe destacar que la ruptura de la tendencia que aparece para el año 2019 es debido a que aún no existían datos del total del año en el momento de realización de las gráficas.

El elevado número de citas, y la rápida evolución anual desde el año 2011, nos permite deducir el elevado interés que este método científico ha suscitado.

Por otro lado, las citas en un trabajo científico muestran el interés generado por un tema concreto mucho mejor que el número de publicaciones. Aunque existan numerosas publicaciones de un tema, si existen pocas citas, no habrá repercusión considerable. Con el propósito de representar gráficamente el número de citas para su análisis, se realizaron dos figuras. Primero, siguiendo el proceso utilizado para las publicaciones, se realizó una figura que muestra la evolución anual de las citas desde 2011 a 2019 (Figura 4).

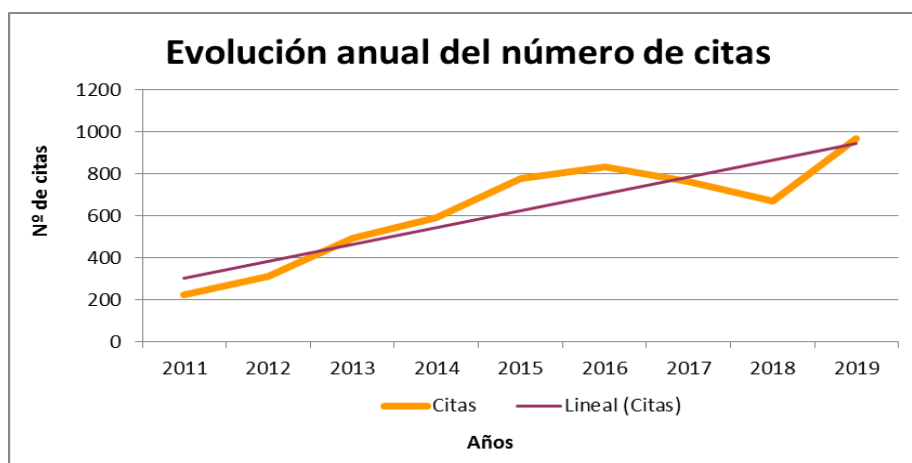


Figura 4. Evolución anual en el número de citas (en rojo) y línea de tendencia (en azul) (Elaboración propia).

Posteriormente, se realizó una segunda figura con el número de citas por áreas de conocimiento relacionadas con la biología (Figura 5). Es muy probable que esta sea la más importante ya que muestra cual es el área de conocimiento en el que más repercusión tiene la Optogenética, o en cuál ha evolucionado más. Las áreas de conocimiento utilizadas han sido: Biotecnología, Genética, Biomedicina, Microbiología, Bioquímica y Neurociencias.

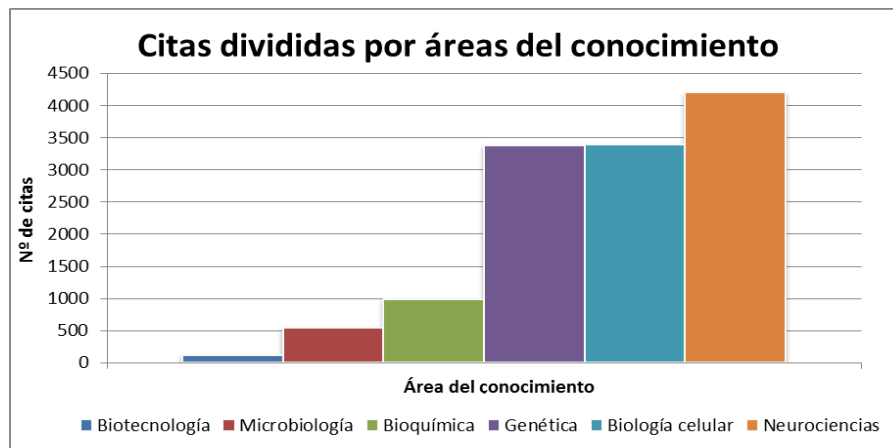


Figura 5. Número de citas por área de conocimiento (Elaboración propia).

Para finalizar el análisis bibliométrico, cabe mencionar los 5 artículos más citados, los cuales han tenido una relevancia muy notoria en la evolución y uso de la Optogenética desde su aparición. A continuación, se aporta la bibliografía respectiva de cada uno de los 5 artículos más citados en orden de mayor a menor veces citado, junto con el número de ocasiones en que cada artículo ha sido citado:

- Yizhar, O., Fenno, L., Davidson, T., Mogri, M. y Deisseroth, K. (2011) “Optogenetics in Neural Systems”, *Neuron*, 71(1), pp. 9-34. **Citado 973 veces.**
- Russo, S.J. y Nestler, E.J. (2013) “The brain reward circuitry in mood disorders”, *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9), pp. 609-625. **Citado 641 veces.**
- Brieke, C., Rohrbach, F., Gottschalk, A., Mayer, G. y Heckel, A. (2012) “Light-controlled tools”, *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(34), pp. 8446-8476. **Citado 478 veces.**
- Zhang, F., Gradinaru, V., Adamantidis, A.R., Durand, R., Airan, R.D., De Lecea, L. y Deisseroth, K. (2010) “Optogenetic interrogation of neural circuits: Technology for probing mammalian brain structures”, *Nature Protocols*, 5(3), pp. 439-456. **Citado 453 veces.**
- Tovote, P., Fadok, J.P. y Lüthi, A. (2015) “Neuronal circuits for fear and anxiety”, *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), pp. 317-331. **Citado 442 veces.**

#### **4 BASES CIENTÍFICAS DE LA OPTOGENÉTICA Y CONSIDERACIONES TÉCNICAS**

La optogenética es “la integración de técnicas genéticas y ópticas con objeto de activar o inhibir una función específica en un grupo concreto de células en tejidos vivos” (Roza Fernández de Caleyá, 2015). En este apartado, analizaremos tanto su Fundamento científico como las consideraciones técnicas de la misma.

## 4.1 Fundamento científico

La optogenética incluye el desarrollo e inserción, mediante diversos métodos, de genes dentro de células diana, que permitan a dichas células responder a estímulos de luz. Aquí es donde entran en juego las opsinas, proteínas utilizadas como sensores de las que hablaremos a continuación. Pero también requiere técnicas asociadas que permitan la aplicación de luz en dichas células y herramientas que permitan la interpretación de los efectos derivados de su activación para poder evaluar la función de determinada población de neuronas en un proceso fisiológico concreto. A continuación, se tratarán los aspectos más destacables de la optogenética.

### 4.1.1 ¿Qué son las opsinas?

Las opsinas son proteínas sensibles a luz que funcionan a modo de sensores, permiten modificar el comportamiento a nivel celular mediante la presencia y ausencia de luz. Existen dos tipos de opsinas, bombas iónicas o halorodopsinas y canales iónicos o canalrodopsinas:

Respecto a **bombas iónicas** activadas por luz, destaca la halorodopsina (HR o NpHR), la cual mantiene el gradiente de membrana transportando iones cloruro desde el medio extracelular hacia el interior (Roza Fernández de Caleyá, 2015). Esta, es activada con luz amarilla. Una de las formas de HR fue la primera opsina utilizada para la inhibición del comportamiento de ratas por hiperpolarización celular inducida con luz amarilla (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

Existen también **canales iónicos** activados por luz, llamados canalrodopsinas (ChRs), estas son proteínas formadas por un canal permeable a iones y un dominio activado por luz (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

Numerosos microorganismos de forma natural han desarrollado la capacidad de expresar dichas proteínas con funciones diversas, desde el mantenimiento del potencial de membrana y la homeostasis iónica en procariotas, hasta la modulación en algunos organismos de elementos motrices para dirigirse a ambientes iluminados que favorezcan la fotosíntesis. Lo más destacable es la sencillez de su estructura, ya que un único gen codifica tanto el dominio sensible a luz (dominio opsina) como el dominio efector, también denominado dominio canal, responsable del movimiento iónico (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

El funcionamiento general de las canalrodopsinas consiste en la producción de un cambio conformacional en la proteína, debido a la aplicación de luz y la absorción de un fotón en el

dominio opsina, cambio que determinará la apertura del dominio canal. El dominio opsina está relacionado con propiedades referentes a la absorción de luz mientras que el dominio canal se relaciona con las propiedades cinéticas del canal iónico (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

Cuando se introducen en neuronas, las canalrodopsinas se insertan en la membrana plasmática y producen cambios en el potencial de membrana en reposo en respuesta a luz azul, de máxima absorbancia (Figura 6). Cuando la conformación todo-trans retinal (figura 6) absorbe un fotón se produce un cambio conformacional de la proteína canalrodopsina (formada por 7 dominios transmembrana, extremos C y N terminal y un dominio de unión a retinal) que pasa a 13-cis retinal. Se forma así un poro permeable a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Roza Fernández de Caleyá, 2015). En unos milisegundos, el retinal vuelve a la conformación inicial cerrándose el poro. Cada opsina incorpora, por tanto, el cofactor retinal, responsable de la absorción de fotones. Este complejo opsina-retinal constituye la rodopsina (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

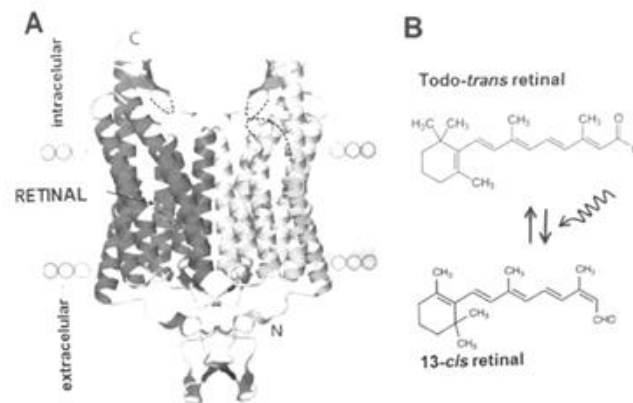


Figura 6. (A) Estructura de la canalrodopsina ChR2 (Roza Fernández de Caleyá, 2015). (B) Isomerización de todo-trans retinal a 13-cis retinal por la llegada de un fotón (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

Por otro lado, las opsinas pueden dividirse en dos subfamilias (Roza Fernández de Caleyá, 2015):

- **Las opsinas animales (tipo II)** se encuentran en los fotorreceptores de retinas de eucariotas, donde se encargan de la fototransducción, y, por tanto, de la visión. Estas funcionan como receptores acoplados a proteínas G (transductores de señal) y utilizan el 11-cis retinal. En conos y bastones, tras la absorción del fotón, se produce la isomerización no permanente a todo-trans retinal, por lo que para cada ciclo de activación deberá reclutarse un 11-cis retinal. Este mecanismo ha

inspirado la creación de opsinas sintéticas para el control de eventos bioquímicos en animales, tales como la apertura de canales iónicos.

- **Las opsinas microbianas (tipo I)** se encuentran en procariotas principalmente (haloarqueas), pero también en eucariotas (hongos y algas) y utilizan el isómero todo-trans-retinal, que isomeriza a 13-cis retinal tras la absorción iónica, revirtiendo a todo-trans muy rápidamente. En este proceso el retinal se mantiene unido a la opsina, al contrario que en las de tipo II, favoreciendo ciclos de activación repetitivos.

Los tejidos de mamíferos examinados hasta la fecha contienen suficiente retinal, por lo que no es necesario complementar las células diana con este componente para un control óptico adecuado, lo cual es un hecho fundamental para el desarrollo de la optogenética (Referencia).

Se concluye este punto destacando que las opsinas, tanto microbianas como animales, están formadas por siete dominios transmembrana, entre ellos su estructura incluye un dominio de unión a retinal (dominio opsina) que determinará sus características espectrales, y un dominio efector (dominio canal) que es capaz de provocar el movimiento de iones a través de membrana.

#### ***4.1.2 Características de las opsinas***

Tras definir el término opsina, se han de citar los factores funcionales a considerar para su clasificación.

##### **4.1.2.1 Cinéticas de activación**

Se requieren diferentes energías, en forma de luz, para la activación y desactivación de las diversas opsinas. Estas activaciones y desactivaciones ocurren a su vez a diferentes velocidades según la opsina utilizada.

La primera canalrodopsina conocida fue ChR1, en un alga verde unicelular. En la misma alga verde posteriormente se describió ChR2, ambas con rápidas cinéticas de activación y desactivación (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

La principal desventaja de ChR2 es su alto nivel de desensibilización, reduciéndose en un 80% su conducción tras la primera iluminación, requiriendo 25 segundos para su recuperación completa en oscuridad (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

Posteriormente se han descubierto canalrodopsinas, como VChR1 que se excita con luz roja, o las llamadas OptoXR, las cuales son opsinas quimeras de rodopsinas acopladas a receptores de proteínas G, que en respuesta a luz verde activan vías de segundos mensajeros (Figura 7) (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

También destacan en este apartado las mencionadas halorodopsinas (HR), activadas por luz amarilla y transportadoras de iones cloruro a través de sus canales, especializada en la inhibición de la respuesta neuronal (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

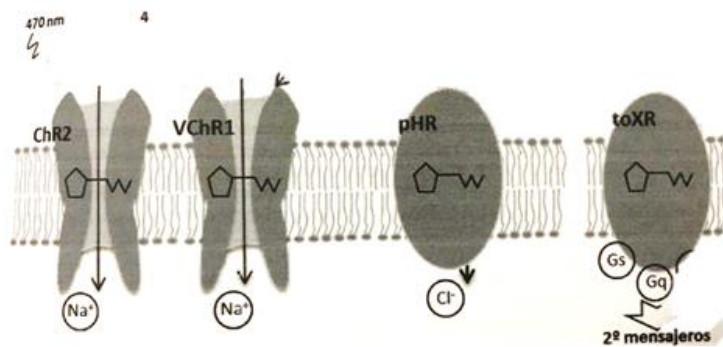


Figura 7. Esquema del funcionamiento de las moléculas de la Optogenética, en el que se observan los iones transportados por cada una de ellas. (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

#### 4.1.2.2 Propiedades de los canales y bombas

Los diferentes canales y bombas iónicas están influenciados por diferentes factores para la correcta realización de su función:

- La **cantidad de cationes** que fluyan a través de una opsina, definida como conductancia, determinará si la despolarización de membrana es suficiente para alcanzar el potencial umbral y provocar el disparo de potenciales de acción. Este flujo de iones está determinado por la sensibilidad de la luz de la opsina, su espectro de absorción y la intensidad de iluminación que reciba por unidad de superficie. Por tanto, es imprescindible optimizar la expresión de los canales en las células diana para alcanzar ese potencial umbral que permite el disparo.
- La **selectividad del canal** ha de ser perfeccionada para optimizar el flujo de iones.
- La **rapidez de apertura y cierre de las canalrodopsinas** es un factor crítico para la manipulación precisa del potencial de membrana, que además determinará la frecuencia de disparo de dicha neurona. Sin embargo, existe una correlación inversa

entre fotocorriente y cinética del canal, que se explica termodinámicamente debido a que la estabilización del estado abierto ralentiza el estado cerrado del canal.

- Para poder producir **disparos consistentes** con pulsos de luz prolongados, las canalrodopsinas deben exponer **la máxima sensibilización** durante la iluminación y recuperarse en oscuridad rápidamente.
- Una **baja expresión** o una agregación de canalrodopsinas puede **reducir la efectividad** de la despolarización, mientras que una **sobreexpresión de proteína** exógena puede resultar **tóxica** y afectar a las propiedades de membrana.
- Existen **canalrodopsinas de “función escalonada”**, las cuales son capaces de utilizar diferentes longitudes de onda para abrir y cerrar el canal debido a picos de excitación de sus componentes suficientemente separados.

#### 4.1.2.3 Modificaciones genéticas en opsinas

Uno de los primeros pasos para realizar un experimento de optogenética es escoger la opsina, la cual determinará la longitud de onda y la intensidad de luz para su activación. En cuanto a las modificaciones genéticas de las opsinas, se han desarrollado mutantes específicos de aquellas mejor conocidas, como es ChR2, con el objetivo de modificar su selectividad a la activación por luz, cinética o magnitud de las corrientes que producen.

Existen numerosas mutaciones que permiten acciones como el retraso del cierre del canal, el aumento de la fotocorriente o el cambio del espectro de activación. Estas mutaciones se han elegido fundamentalmente en base a homologías de los dominios T3-T7 entre canalrodopsinas y BRs (brasinosteroides), dado que esta última es una de las proteínas de membrana mejor caracterizadas (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

De todos modos, hay que destacar que las mejoras en algunas propiedades pueden suponer una desventaja para otras. Un ejemplo son los efectos inhibitorios que se consiguen con las bombas iónicas, en este caso la absorción del fotón provocará la translocación de un único ion, generando una corriente muy reducida, por lo que para conseguir los efectos hiperpolarizantes deseados se ha de realizar la aplicación de luz constante. La activación con luz amarilla permite activación independiente de ChR2 y con ello la modulación bidireccional de la actividad neuronal si se expresa en la misma célula.

### 4.1.3 Tipos de luz detectados por opsinas

Como hemos señalado “el objetivo final de la Optogenética es modular la actividad de una neurona por medio de la luz” (Roza Fernández de Caleyá, 2015). Por tanto, observamos que el estudio de la luz es un aspecto clave que se esquematiza a continuación (Figura 8).

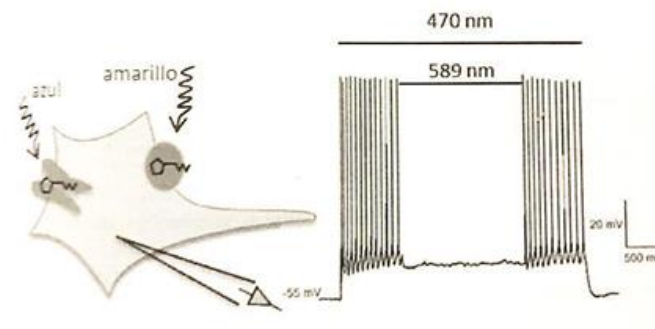


Figura 8. Disparo de potenciales de acción neuronales debido a luz azul e inhibición de estos debido a luz amarilla, dependiendo la acción de la longitud de onda. (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

A la hora de analizar la aplicación de luz sobre una neurona se han de tratar diferentes factores: longitud de onda, intensidad y duración de la luz y estado tras la primera iluminación.

Es de gran importancia a su vez determinar sobre qué se va a aplicar la luz, es decir, cuál va a ser el objetivo del experimento:

- **Células en cultivo**, en las que se ha de tener en cuenta la intensidad de luz emitida y el área iluminada únicamente.
- **Preparaciones in vitro**, en las que se ha de tener en cuenta la profundidad y el volumen del tejido que tienen que ser expuestos a luz, dado que la luz disminuye exponencialmente al aumentar la profundidad.
- **Animales vivos**, al igual que las células en cultivo no han de considerar la profundidad.

Se ha de tener en cuenta que un exceso de iluminación puede llegar a originar fototoxicidad en células vecinas e incluso daño celular por aumentos locales de la temperatura. También es de considerar la posibilidad de variar según requerimiento el tamaño de los pulsos de luz y su frecuencia de aplicación.

Teniendo todo ello en cuenta, la Optogenética se centra en la utilización de dos tipos de fuentes de luz:



- o **LEDs:** Consiste en la utilización de complejos de luz LED acoplados a fibras ópticas (Figura 9), que pueden estar guiadas a través de una cánula al tejido de interés. En Optogenética se denomina con el término “optrodo” al complejo formado por microelectrodos de luz LED o láser y la fibra óptica acoplada a estos.

La ventaja principal es que son más económicas, resistentes y fáciles de controlar que el láser. Además, existen en muchos colores, lo que le permite una gran variedad en el espectro de emisión. Su pequeño tamaño permite su adhesión en implantes fijos de animales en animales de experimentación, permitiendo una aplicación de luz sin necesidad de cables (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

Su inconveniente principal es la emisión de luz en todas las direcciones en lugar de un haz concentrado, por lo que pierde gran parte de su intensidad al ser acoplado a una fibra óptica (guiada a través de una cánula generalmente), llegando a objetivo una intensidad de milivatios insuficiente para activar ChR2 (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

- o **Láser:** Consiste en la utilización de complejos de luz láser acoplados a fibras ópticas (Figura 10), y guiadas en ocasiones a través de una cánula al tejido transducido (Figura 9), en el que han sido insertados los genes de opsinas. Para este tipo de luz, como se ha dicho anteriormente, también se acepta el término “optrodo”.

Su ventaja principal es la capacidad de emitir la luz en un haz coherente, de forma que la intensidad que pierde al ser acoplado a una fibra óptica (guiada a través de una cánula generalmente) es mínima, llegando al sitio de interés con la suficiente intensidad (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

Por otro lado, tiene numerosos inconvenientes como el de ser un método más costoso, menos resistente y más difícil de controlar que el anterior tipo de luz (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

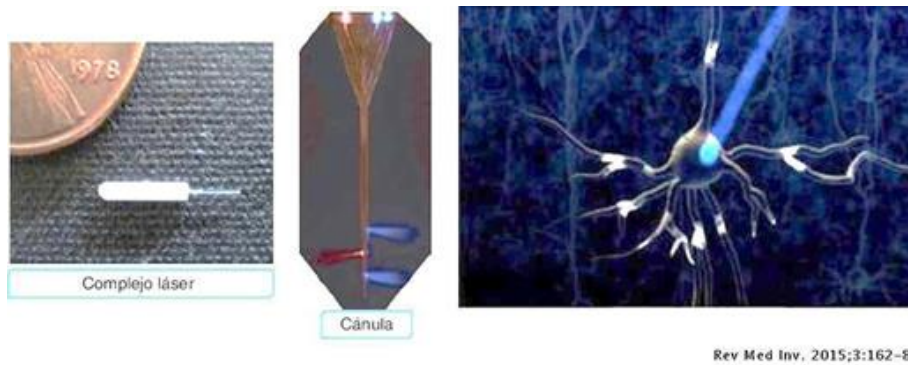


Figura 9. Transmisión de luz a una célula diana desde un complejo de luz láser (izquierda) acoplado a una fibra óptica guiada por una cánula (medio) al tejido de interés (derecha) (Ortiz-Vilchis, 2015).

Ambas fuentes de luz han de poder utilizar diferentes longitudes de onda que incluyan el espectro de activación de diferentes opsinas, además de disponer de una intensidad de emisión ajustable que permita mantener una transmisión de luz constante frente a variaciones en la expresión de las opsinas en diversas condiciones experimentales.

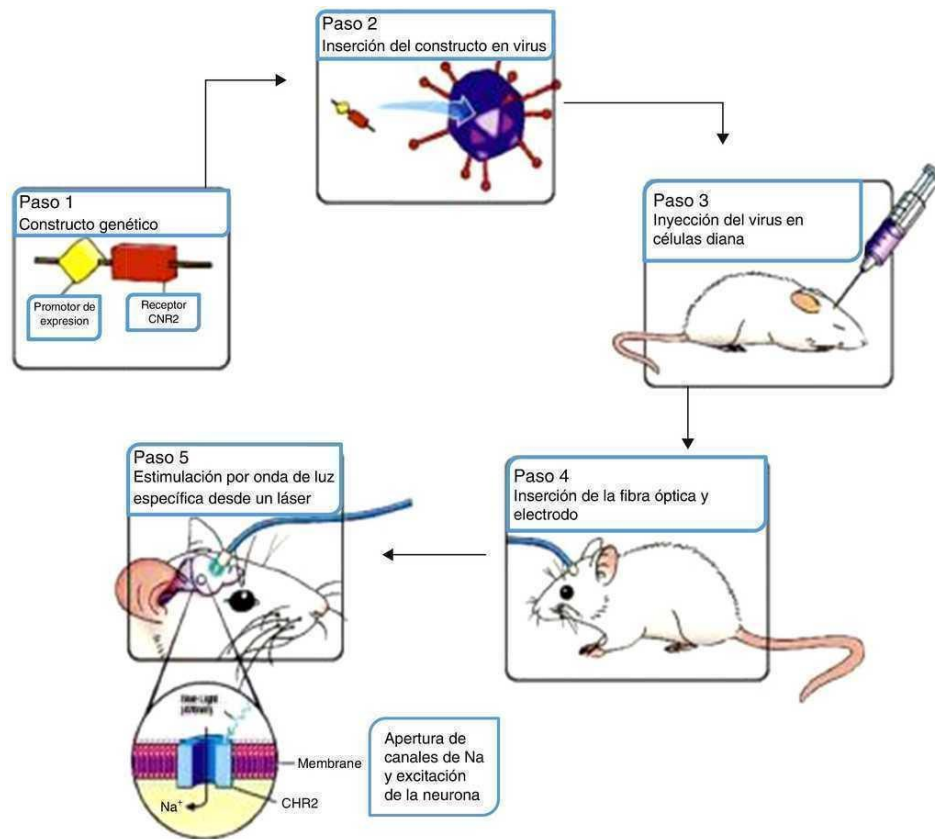


Figura 10. Ratón de experimentación con la fibra óptica implantada (Ortiz-Vilchis, 2015).

#### 4.2 Consideraciones técnicas de la Optogenética

La técnica de la Optogenética consiste en la inserción de genes en grupos específicos de neuronas, en una región cerebral determinada, usando generalmente como vector un virus, que ha sido modificado para contener secuencias específicas de ADN (Ortiz-Vilchis, 2015). Estos genes, usualmente obtenidos de haloarqueas (anteriormente llamadas halobacterias), producen proteínas sensibles a luz como son las halorodopsinas o las canalrodopsinas tratadas anteriormente, las cuales se activarán o inhibirán en respuesta a cambios de luz.

La técnica de la Optogenética utiliza, por tanto, los principios de la ingeniería genética para introducir genes en organismos. Se puede dividir en 5 pasos, los cuales trataremos a continuación (Figura 11).



Rev Med Inv. 2015;3:162-8

Figura 11. Resumen del procedimiento optogénico (Ortiz- Vilchis, 2015).

### Paso 1: El constructo genético

La técnica comienza insertando de forma conjunta constructos genéticos compuestos de una secuencia promotora (encargada de iniciar la transcripción genética) y un gen. Los genes de las canalrodopsinas (ChR) y las halorodopsinas (HR o NpHR) son los más utilizados para codificar las proteínas sensibles a luz de células diana (Ortiz- Vilchis, 2015).

En presencia de luz azul (con un espectro de 470 nm) el ChR (Figura 12) experimenta un cambio conformacional que permite el flujo de iones de sodio que producen en este momento la despolarización celular, y con ella la activación celular de manera efectiva (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

En el caso de NpHR (Figura 12) la célula es inactivada de forma efectiva en presencia de luz amarilla (con un espectro de 580 nm) al permitir que iones de cloro produzcan la hiperpolarización celular (Ortiz- Vilchis, 2015).

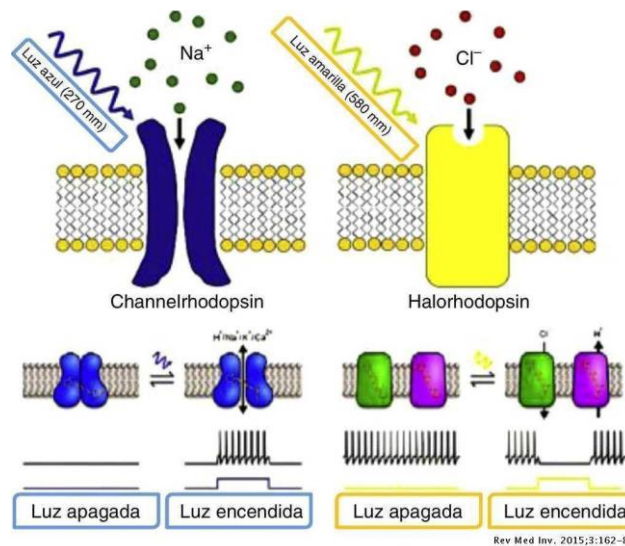


Figura 12. Proteínas sensibles a la luz ChR (izquierda) y NpHR (derecha) (Ortiz- Vilchis, 2015).

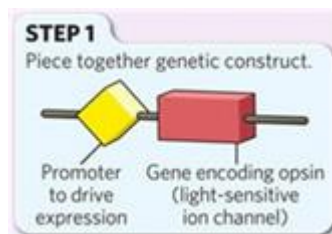


Figura 13. Paso 1 del procedimiento genético. Constructo genético formado por el promotor de expresión (amarillo) y gen codificador de la opsin (canal iónico sensible a luz) (Buchen, 2010).

### Pasos 2 y 3: Entrega del gen en el tejido de interés

Uno de los factores limitantes en optogenética, es la baja tolerabilidad de las células de mamífero por el material genético microbiano, lo que imposibilita la inyección directa de genes de opsinas en el animal. Sin embargo, con técnicas de ingeniería genética se posibilita la inserción de genes de opsinas en fragmentos de DNA mamífero asegurando que estos sean transportados al sitio adecuado y den lugar a proteínas funcionales (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

Además, debido a la conductancia tan pequeña de un canal, es fundamental que se optimicen la transcripción, traducción, plegamiento, tráfico e inserción en membrana del gen.

Una vez clonada la opsin deseada, es posible mejorar sus niveles de expresión en neuronas de mamíferos mediante la sustitución de ciertos codones, generando así las llamadas ChRs “humanizadas”. Otra variante es añadir elementos de localización específicos, como los promotores, para que las opsinas se puedan insertar en diferentes partes de la neurona (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

En este momento, para conseguir el control preciso de un grupo neuronal, lo principal es la inserción de genes de opsinas de forma específica en la población neuronal de interés, lo cual se puede llevar a cabo mediante 3 métodos principales:

1. **Sistemas de expresión víricos:** Consiste en el uso de vectores virales y es la opción más popular para la administración de herramientas optogenéticas en sistemas intactos (experimentos in vivo). Los vectores víricos basados en lentivirus y virus-adeno-asociados (AAV) han logrado la expresión de opsinas en un amplio rango de animales experimentales, incluyendo primates. Este método aporta numerosas ventajas, como la rapidez y la flexibilidad de la implementación, elevada potencia por la alta copia de genes ( $>10^9$  unidades de transducción/ml y  $> 10^{12}$  copias genómicas/ml para lentivirus y AAV respectivamente) cuya expresión funcional se consigue en 2-3 semanas, necesitando hasta 6 semanas para ocasiones concretas, y los altos niveles de expresión se mantienen durante meses sin que se hayan detectado efectos adversos.

Lo más importante en este método es asegurar la especificidad para la inserción del virus en la población neuronal deseada. Aunque existen virus que atacan poblaciones neuronales de forma específica (como herpesvirus), lo más frecuente en optogenética es utilizar promotores específicos, que expresan los genes introducidos en determinados tejidos o tipos de células. El problema de esto es que no se pueden utilizar fragmentos muy grandes de promotores para insertarlos junto con los genes de las opsinas en un virus, lo cual sigue siendo un desafío hoy en día.

Para intentar conseguir especificidad en la expresión vírica han surgido procedimientos, como el diseño de vectores virales dependientes de recombinasa Cre, basados en la gran cantidad de ratones transgénicos que expresan recombinasa Cre en numerosos tejidos y tipos de células. De esta forma, cuando un AAV portador de una ChR+ recombinasa Cre se inyecta en un ratón, dicha ChR solo se expresará en las células que posean recombinasa Cre (Roza Fernández de Caleyá, 2015).

En cuanto a la inyección vírica (paso 3), basada en la punción a presión del virus de interés, las células diana receptoras de la inyección son generalmente pertenecientes al cerebelo, debido al interés de la Optogenética por patologías relacionadas con las vías motoras, siendo este órgano una de las principales zonas responsables del relevo de información referente a estas vías (Tonnesen, 2013).

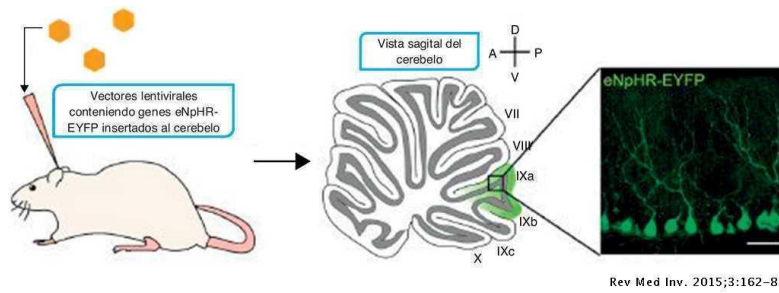


Figura 14. Transporte del gen a la célula diana (Tonnesen, 2013).

2. **Ratones transgénicos:** Si bien es un método más complejo que la expresión vírica, la expresión de la opsin en el sitio deseado es más fiable. Las líneas de ratones Thy1: ChR2-EYFP y Thy1: NpHR-EYFP expresan opsinas bajo el promotor Thy1. Aunque este promotor se encuentra en general en todas las neuronas de proyección (que comunican regiones alejadas del tejido nervioso), la activación específica de la neurona diana se consigue al estimular el sitio de interés (Roza Fernández de Caleyá, 2015).
3. **Electroporación:** Consiste en producir un aumento significativo de la conductancia eléctrica y la permeabilidad mediante la producción de poros en la membrana celular, que permitirán la entrada del material genético exógeno al interior celular, para insertarse posteriormente en el ADN del ratón. Este método se utiliza en neuronas embrionarias mediante la inyección in utero. Se usan plásmidos desnudos, que permiten la inserción de DNA de cualquier tamaño, por ello, se pueden utilizar promotores más largos que mejoren la especificidad de la expresión para determinadas células (Roza Fernández de Caleyá).

Junto con la electroporación en los últimos años se han realizado otros métodos físicos, como es la biobalística (Maestre Deltell, 2017), basada en el bombardeo de microproyectiles que contienen el plásmido con el DNA a transferir.

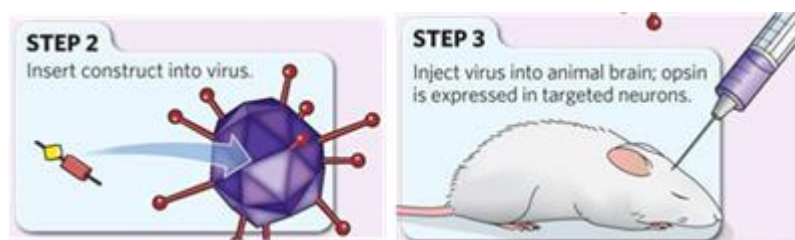


Figura 15. Pasos 2 y 3 del procedimiento genético realizados mediante sistemas de expresión víricos. Inserción del constructo en virus (paso 1) e inyección del virus en el cerebro animal; la opsin es expresada en neuronas específicas (paso 2) (Buchen, 2010).

#### **Pasos 4: Inserción del optrodo (fibra óptica y electrodos)**

Si todo ha ido bien, en este momento el animal se encuentra expresando la proteína deseada en los tipos neuronales elegidos, por lo que es el momento de la realización de los pasos finales, que consisten en la inserción de la fibra óptica y el electrodo en el animal objeto de la técnica y la estimulación por ondas de luz específica que genera la apertura de canales y bombas iónicas y excitación de la población neuronal.

Las proteínas opsinas, localizadas en las membranas neuronales, requieren de una neurocirugía estereotáxica, la cual permite acceso quirúrgico a zonas profundas del encéfalo, basándose en un sistema de coordenadas tridimensionales para hacer llegar a estas proteínas las ondas de luz emitidas. La administración de luz se realiza a través “optrodos”, que consisten en microelectrodos de fibra óptica que permiten el acceso de luz (láser o LED) a las células diana para abrir así los canales y bombas fotosensibles de los que resultará la estimulación neuronal.

Esta sonda que combina el cable de fibra óptica y el electrodo denominada “optrodo” se puede cortar a la longitud deseada para enfocar una región cerebral específica utilizándose directamente en el cráneo o bien insertarse a través de una cánula que guíe el optrodo y a su vez facilite posibles manipulaciones farmacológicas simultáneas.

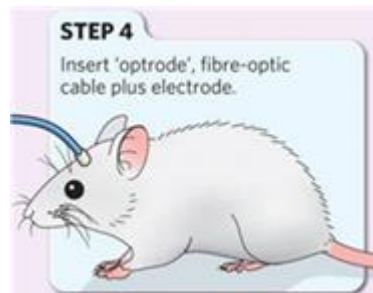


Figura 16. Paso 4 del procedimiento optogenético. Inserción del “optrodo”, cable de fibra óptica más electrodo (Buchen, 2010).

#### **Paso 5: Estimulación por onda de luz específica**

Ahora el animal está preparado para la entrada de ondas de luz específica a través de la sonda u “optrodo”, las cuales permitirán la apertura del canal o bomba iónica y con ella el paso de diferentes iones a través de estos canales y bombas, que tendrán como consecuencia la activación o inhibición de células neuronales específicas.

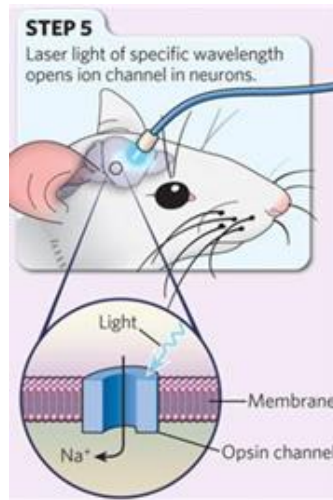


Figura 17. Paso 5 del procedimiento optogenético. Luz láser de una longitud de onda específica abre canales iónicos en neuronas (Buchen, 2010).

### Paso 6: Recogida y análisis de resultados

En este momento podríamos hablar de un sexto paso (Figura 18) en el que se registren los resultados electrofisiológicos y conductuales para un correcto análisis e interpretación de la patología a estudiar.



Figura 18. Paso 6 del procedimiento optogenético. Registrar resultados electrofisiológicos y de comportamiento (Buchen, 2010).

### 4.3 Avances técnicos en los últimos años

A principios del pasado año 2018, se publicó un estudio que pretende suplir ciertas limitaciones que presenta la Optogenética en cuanto la estimulación por luz (Chen *et al.*, 2018). La Optogenética, como hemos visto, utiliza luz visible de para la manipulación de las células de interés que tiende a dispersarse cuando pasan al interior cerebral, lo que impide avanzar de zonas cerebrales superficiales hacia otras más profundas.

Este estudio realizado por el Instituto de Ciencias del Cerebro de Riken en colaboración con la Universidad de Tokio ha desarrollado una nueva técnica Optogenética que permite la activación o inhibición neuronal mediante la aplicación externa de luz en el cráneo, como



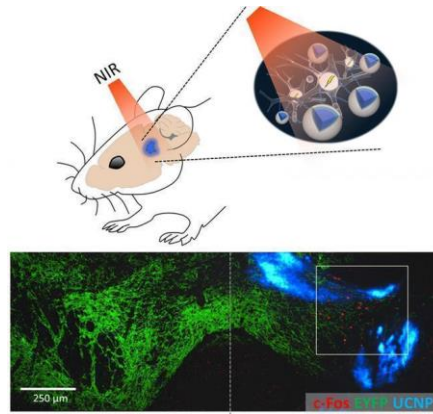
alternativa al método invasivo de la sonda y sin requerimiento de neurocirugía (Chen et al., 2018).

Esta aplicación externa de luz es realizada mediante unos nanomateriales denominados nanopartículas de conversión dopadas con lantánidos o UCNP que son inyectadas en la región cerebral de interés. La técnica continúa con la aplicación de haces de luz infrarroja cercana (NIR) mediante láseres que atraviesan con facilidad el cerebro desde el exterior del cráneo. A continuación, estos haces son absorbidos por las mencionadas nanopartículas UCNP para convertirse en luz visible necesaria para la estimulación neuronal de las opsinas. Finalmente se realizó una comprobación mediante microscopio electrónico que verificó que las nanopartículas UCNP se mantenían en la zona donde habían sido inyectadas (Chen *et al.*, 2018).

Esta técnica ha permitido el control de los grupos neuronales de interés sin daño tisular. Aunque de momento solo se ha probado en ratones ha hecho posible activar las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, implicada en procesos de adicción, recompensa y cognición. También ha hecho posible inhibir las células neuronales en el hipocampo, que permite la protección frente al daño provocado por el ácido kaínico, un estímulo sobreexcitador relacionado con la epilepsia. Por último, la técnica Optogenética mediada por nanopartículas UCNP ha permitido alterar la conducta en roedores, concretamente su capacidad de generar recuerdos relacionados con el miedo (Chen *et al.*, 2018).

La técnica pretende ser un método pionero en el tratamiento y estudio de diversas enfermedades, sin embargo, es primordial caracterizar detalladamente la interacción entre las nanopartículas y el tejido cerebral antes de aplicarla en humanos. "Las nanopartículas parecen ser bastante estables y biocompatibles, por lo que son viables para su uso a largo plazo y, además, la baja dispersión significa que podemos apuntar a las neuronas objetivo de forma muy específica" afirma McHugh, uno de los principales autores del estudio (Chen *et al.*, 2018).

La técnica requiere de futuros estudios que permitan esa profundización más detallada para llegar al objetivo final de la aplicación humana.



**Figura 19.** La luz infrarroja cercana (NIR) atraviesa el tejido cerebral para activar las neuronas a través de nanopartículas (arriba). Activación no invasiva de neuronas en el centro de recompensa del cerebro del ratón, usando proteínas fluorescentes c-Fos y EYFP y nanopartículas UCNP (abajo) (Chen *et al.*, 2018).

## 5. APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LA OPTOGENÉTICA

La prometedora técnica de la Optogenética, aunque sigue teniendo problemas e interrogantes en un futuro su resolución permitirá la identificación de las subclases neuronales causantes de diversas patologías y posibilitará el tratamiento de estas.

La técnica requiere de un mayor avance en experimentación para llegar a estas metas futuras, siendo importante el progreso en experimentación con primates en concreto cuyos estudios aún son escasos, por la similitud entre su cerebro y el humano.

La Optogenética ha desarrollado numerosas aplicaciones en diversas áreas médicas, entre las que se encuentran las siguientes.

### 5.1 Tratamiento para la epilepsia

Los actuales tratamientos para la epilepsia, que afecta al lóbulo temporal son causa de numerosos efectos secundarios negativos, lo que genera la necesidad de nuevos tratamientos, entre los que se ha sugerido la Optogenética como técnica para la detección de la aparición de convulsiones espontáneas en un modelo de ratón con epilepsia del lóbulo temporal. En el trabajo de Armstrong y colaboradores (Armstrong *et al.*, 2013), se demostró que es posible utilizar la estimulación fotónica para detener las convulsiones de manera efectiva en ratones modificados para desarrollar diferentes tipos de epilepsias.

En un trabajo posterior, se demostró que mediante Optogenética es posible activar neuronas GABAérgicas en el hipocampo, bloqueando la aparición de convulsiones después de la exposición a ciertos tipos de luz. Señalaron que las convulsiones del lóbulo temporal pueden

detectarse y prevenirse mediante el control de poblaciones neuronales específicas mediante la Optogenética (Krook-Magnuson *et al.*, 2013).

Actualmente, el estudio continúa inconcluso, a pesar del desarrollo de trabajos recientes en los que se han investigado los efectos de la estimulación de células granulosas (engloba diferentes tipos celulares con cuerpos celulares muy pequeños) en la estructura denominada giro dentado del hipocampo (región crítica para el aprendizaje y la memoria). Los resultados obtenidos evidencian que estas células granulosas, pueden prevenir una actividad convulsiva en el hipocampo (Krook-Magnuson *et al.*, 2014).

Las células granulares representan la mayoría de los tipos neuronales humanos y se excitan en respuesta a señales enviadas por fibras musgosas, componentes de las aferencias cerebelosas. Estas células granulares envían fibras paralelas a través de la capa de Purkinje para formar miles de sinapsis en las dendritas intermedias y distales de las células de Purkinje utilizando el glutamato como neurotransmisor, el cual tiene un efecto inhibitorio en el sistema nervioso (Petroff, 2002).

Prevenir que estas células granulosas se activen durante una convulsión ha servido para detenerlas de forma efectiva, mientras que la estimulación ha logrado que las convulsiones empeoren (Krook-Magnuson *et al.*, 2014).

El hipocampo es a menudo el foco de las crisis epilépticas, sin embargo, aún no está claro si la epilepsia es generalmente causada por anomalías del hipocampo o si el hipocampo está dañado por los efectos acumulativos de las convulsiones (Ortiz- Vilchis, 2015).

## **5.2 Tratamiento del Parkinson**

Investigadores de la Universidad Carnegie Mellon, en Estados Unidos, (Mastro *et al.*, 2017) han identificado dos grupos neuronales que se pueden activar y desactivar para disminuir los síntomas relacionados con el movimiento de la enfermedad de Parkinson durante más tiempo que las terapias actuales.

La enfermedad de Parkinson se produce cuando las neuronas dopaminérgicas, productoras de dopamina en el cerebro, que se alimentan de los ganglios basales del cerebro mueren y hacen que los ganglios basales dejen de funcionar, evitando que el cuerpo inicie el movimiento voluntario. Por tanto, los ganglios basales son el principal objetivo clínico para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, pero las terapias utilizadas actualmente no ofrecen soluciones a largo plazo (Mastro *et al.*, 2017).

Para entender mejor el comportamiento de las neuronas de los ganglios basales en el Parkinson, se observó el circuito interior de los ganglios basales, en concreto un núcleo llamado globus pallidus (GPe) externo, componente de los ganglios basales que se sabe que contribuye a suprimir las vías motoras en estos, aunque se desconocen los tipos individuales de neuronas presentes en el GPe, su papel en la enfermedad de Parkinson o su potencial terapéutico (Mastro *et al.*, 2017).

El grupo de investigación utilizó la Optogenética para dirigirse a dos tipos celulares en un modelo de ratón para la enfermedad de Parkinson (neuronas PV-GPe y Lhx6-GPe) y descubrieron que al elevar la actividad de las neuronas PV-GPe sobre la de las neuronas Lhx6-GPe, se puede detener el comportamiento neuronal alterado en los ganglios basales y restaurar el movimiento en el modelo de ratón durante al menos cuatro horas, tiempo significativamente superior a los tratamientos actuales (Mastro *et al.*, 2017).

“Aunque la Optogenética se utiliza sólo en modelos animales, se cree que sus hallazgos podrían crear un protocolo nuevo y más eficaz de estimulación cerebral profunda” (Mastro *et al.*, 2017).

### **5.3 Tratamiento de patologías retinianas**

El tratamiento de patologías relacionadas con la visión constituyó el primer ensayo clínico realizado mediante la técnica de la Optogenética, en concreto en el tratamiento de la enfermedad de la retinosis pigmentaria. La retinosis o retinitis pigmentaria engloba un conjunto de enfermedades oculares degenerativas caracterizadas por la pérdida lenta y progresiva de visión provocada por la destrucción de las células fotosensibles de la retina. La elección de esta patología para la primera aplicación humana de la Optogenética responde a tres características (Franco, 2017):

- a) El ojo es el órgano idóneo para esta tecnología ya que es mucho más fácil acceder a este que al cerebro.
- b) Esta patología es ideal para intentar transformar las células nerviosas ganglionares de la retina en células fotosensibles, para suplir la destrucción de las células fotosensibles de la retina, gracias a la Optogenética.
- c) En la retinosis pigmentaria el nervio óptico no está dañado, de modo que la transmisión nerviosa desde las células ganglionares hasta el cerebro está asegurada.

La responsable de este ensayo clínico pionero es la empresa estadounidense RetroSense. El pasado año 2014 la empresa consiguió que su terapia, con el nombre RST-001, recibiese la designación de fármaco huérfano (destinado a un grupo reducido de pacientes) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de la retinosis pigmentaria. En el año 2015, fue aprobada como nuevo fármaco en investigación, y en el año 2016, RetroSense realizó un ensayo que confirmó que los medicamentos habían sido dosificados de forma segura a los pacientes.

La terapia Optogenética RST-001 emplea el gen de la ChR2, para restaurar la visión en células ganglionares de la retina degeneradas por la retinosis pigmentaria. Para ello, se inyectan virus en el ojo con el objetivo de que estas células ganglionares se vuelvan fotosensibles y se genere así una señal eléctrica en respuesta a la luz, como en un ojo sano, lo que restauraría parcialmente la visión.

La primera paciente en someterse a esta terapia ha sido una afectada de retinosis pigmentaria de Texas. La paciente recibió el tratamiento en uno de sus ojos a cargo de un equipo de investigadores dirigidos por David Birch pertenecientes a la Fundación Retina del Sudoeste. Este ensayo clínico se amplió progresivamente hasta alcanzar un total de 15 pacientes (Roska *et al.*, 2014).

El objetivo era que la paciente recuperase parte de su capacidad visual en un ojo que tenía una capacidad visual nula. Las células ganglionares de la retina normalmente transmiten impulsos nerviosos y no reciben luz directamente, por lo que no se sabía qué tipo de visión se obtendría previamente al ensayo (Franco, 2017).

Es relevante destacar que la visión obtenida a partir de células ganglionares fotosensibles para contrarrestar la degeneración de células fotosensibles de la retina supuso en la paciente una importante desventaja, ya que una retina sana adapta su sensibilidad rápidamente a los cambios de iluminación, pero las células fotosensibles originadas de la técnica optogenética posiblemente no podrán adaptarse con la misma facilidad. Por ello nace la idea de las gafas de proyección de luz para complementar la técnica Optogenética facilitando el proceso de adaptación lumínica del ojo tratado.

Previamente al desarrollo de ensayos con pacientes humanos, se aplicó la optogenética a otras células relacionadas con las patologías retinianas, las cuales aportaban diferentes ventajas e inconvenientes respecto a las células ganglionares, elegidas finalmente para el

ensayo clínico. Las otras opciones barajadas a lo largo del tiempo han sido desde un enfoque no dirigido, en el que no hay ingeniería del gen o vector administrado, hasta células bipolares pasando por cuerpos celulares fotorreceptores de cono remanente (Roska *et al.*, 2014).

## 6. CONCLUSIONES

- a) En lo referente a definir el método científico de la Optogenética, podemos concluir que la Optogenética se define como la integración de técnicas genéticas y ópticas con objeto de activar o inhibir una función específica en un grupo concreto de células en tejidos vivos. Combina disciplinas Biológicas (genética, fisiología, etc.) con Físicas (óptica, electromagnetismo, etc.).
- b) Se basa en la introducción en las células de genes exógenos a estas, que codifican proteínas fotosensibles, capaces de modificar el comportamiento celular en respuesta a destellos de luz provenientes de un láser o un LED. La introducción en las células diana de los genes exógenos se puede realizar mediante 3 métodos principales. Las proteínas fotosensibles codificadas pueden ser también de diferentes tipos, cada uno con unas propiedades características del mismo. De forma general se estructura la técnica de la Optogenética en 6 pasos principales.
- c) El estudio bibliométrico realizado nos ha permitido constatar la importancia de la Optogenética en la investigación científica. El elevado número de artículos, su rápida evolución y especialmente, el importante número de citas muestra el gran interés científico de la misma. En relación con las áreas científicas, las más relacionadas con el uso de la Optogenética son la Neurociencia, la Biología celular, la Genética, la Bioquímica, la Microbiología y la Biotecnología.
- d) Finalmente, podemos concluir que existen numerosas aplicaciones de la Optogenética en la biomedicina. Con esta técnica, se están investigando aplicaciones médicas para diversas enfermedades como la epilepsia, el Parkinson, patologías retinianas, patologías cardíacas, lesiones de la Médula espinal, Cáncer, Narcolepsia o la adicción a la cocaína.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Abad Torrent, A. (2014) Anestesiari. Disponible en: <https://anestesiari.org/2014/que-es-la-optogenetica-y-para-que-sirve/> (Accedido: 3 de diciembre de 2019).

Adamantidis, A. R., Zhang, F., Aravanis, A. M., Deisseroth, K., de Lecea, L. (2007) “Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons”, *Nature*, 450(7168), pp. 420-424.

Armstrong, C., Krook-Magnuson, E., Oijala, M., Soltesz, I. (2013) “Closed-loop optogenetic intervention in mice”, *Nature Protocols*, 8(8), pp. 1475-1493.

Barrientos Duque, M. A. (2016) *¿Qué es la Optogenética? Aplicaciones futuras a la práctica clínica*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Cantabria.

Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K. (2005) “Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity”, *Nature Neuroscience*, 8(9), pp. 1263-1268.

Buchen, L. (2010) *Nature*. Disponible en: <https://www.nature.com/news/2010/100505/full/465026a.html> (Accedido: 5 de diciembre de 2019).

Chen, S., Weitemier, A. Z., Zeng, X., He, L., Wang, X., Tao, Y., Huang, A. J. Y., Hashimoto, Y., Kano, M., Iwasaki, H., Parajuli, L. K., Okabe, S., Loong Teh, D. B., All, A. H., Tsutsui-Kimura, I., Tanaka, K. F., Liu, X., McHugh, T. J. (2018) “Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics”, *Science*, 359(6376), pp. 679-684.

De Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L., Gautvik, V. T., Bartlett II, F. S., Frankel, W. N., Van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, Sutcliffe, J. G. (1998) “The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity”. *Proceedings of the National Academy of Science of the U. S. A.*, 95(1), pp. 322-327.

El Médico Interactivo (2017) [Sitio web oficial]. Disponible en: <https://elmedicointeractivo.com/descubren-objetivos-neuronales-restauran-movimiento-modelo-enfermedad-parkinson-20170511135323111639/> (Accedido: 10 de enero de 2020).

Franco, J. (2017) *Infotecnovisión*. Disponible en: <https://www.infotecnovision.com/optogenetica-novedosa-terapia-que-combina-terapia-genica-y-luz/> (Accedido: 11 de enero de 2020).

Garriga Solé, P. (2016) *Modificación del plegamiento y función de opsinas mutadas mediante factores celulares como nueva estrategia terapéutica para enfermedades degenerativas de la retina*. Proyecto de Investigación. Universidad Politécnica de Cataluña.

Genotipia (2019) [Sitio web oficial]. Disponible en: [https://genotipia.com/genetica\\_medica\\_news/optogenetica-cancer/](https://genotipia.com/genetica_medica_news/optogenetica-cancer/) (Accedido: 12 de enero de 2020). Krook-Magnuson, E., Armstrong, C., Oijala, M., Soltesz, I. (2013) “On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy”, *Nature Communications*, 4(1376), pp. 1-8.

Krook-Magnuson, E., Szabo, G. G., Armstrong, C., Oijala, M., Soltesz, I. (2014) “Cerebellar directed optogenetic intervention inhibits spontaneous hippocampal seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy”, *Eneuro*, 1(1), pp. 5-14.

LaLumiere, R. T. (2011) “A new technique for controlling the brain: Optogenetics and its potential for use in research and the clinic”, *Brain Stimulation*, 4(1), pp. 1-6.

Lima, S. Q., Miesenböck, G. (2005) “Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons”, *Cell*, 121(1), pp. 141-152.

Maestre Deltell, Y. (2016) *Optimización de la transfección in vivo e in vitro mediante nanopartículas magnéticas*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.

Mastro, K. J., Zitelli, K. T., Willard, A. M., Leblanc, K. H., Kravitz, A. V. y Gittis, A. H. (2017) “Cell-specific Pallidal Intervention Induces Long-Lasting Motor Recovery in Dopamine-Depleted Mice” *Nature Neuroscience*, 20(6), pp. 815-823.

Morgado, I. (2016) Revista de Neurología. Disponible en: <https://www.neurologia.com/noticia/5552/la-Optogenética-una-tecnica-para-el-control-de-los-procesos-mentales> (Accedido: 8 de noviembre de 2019).

Ortiz-Vilchis, C. M. (2015) “Modelos experimentales en Optogenética y su aplicación en enfermedades neurodegenerativas motoras”, *Elsevier*, 3(2), pp. 162-168.

Pascoli, V., Terrier, J., Espallergues, J., Valjent, E., O'Connor, E. C., Luscher, C. (2014) “Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse”, *Nature*, 509 (7501), pp. 459-64.



Petroff, O. A. C. (2002) “GABA and glutamate in the human brain”, *The Neuroscientist*, 8(6), pp. 562-573.

Redacción Médica (2019) [Sitio web oficial]. Disponible en: <https://www.redaccionmedica.com/secciones/cardiologia/la-Optogenética-abre-vias-a-un-nuevo-tratamiento-de-arritmias-cardiacas-6149> (Accedido: 25 de enero de 2020).

Roska, B., Pepperberg, D., Bryant, L., Agboh, D., Birch, D., Donoso, L., Nirenberg, S., Pan, Z. H., Picaud, S., Van Hooser, S., Vandenberghe, L., Werblin, F., Zhang, F (2014) “Restoring vision to the blind: optogenetics”. *Translational Vision Science & Technology*, 3(7), p. 14-22.

Roza Fernández de Caleyá, C. (2015) “Optogenética”, en Bodega Magro, G., Bodega Magro, J., Carracedo Añón, J., Ciordia Higuera, S., Cisneros Niño, E., Copa Patiño, J. L., González-Triguero, J. M., Gragera Martínez, R. R., Loarce Tejada, Y., López Fernández, L. A., López García, J. A., Paradela Elizalde, A., Plumet Ortega, J., Puebla Jiménez, L., Ramírez Chamond, M. R., Rivera Arconada, I., Roza Fernández de Caleyá, C. (eds.) *Métodos en Biociencias*. 1ª ed. Madrid: Dextra Editorial, pp. 353-364.

Sánchez, M. (2016) Bez. Disponible en: <https://www.bez.es/963344816/Nace-una-neurociencia-que-revolucionara-el-conocimiento-del-cerebro-la-Optogenética.html> (Accedido: 10 de diciembre de 2019).

Sasse, P., Funken, M., Beiert, T., Bruegmann, T. (2019) “Optogenetic termination of cardiac arrhythmia: mechanistic enlightenment and therapeutic application?”, *Frontiers in Physiology*, 10(675), pp. 1-9.

Tønnesen, J. (2013) “Optogenetic cell control in experimental models of neurological disorders”, *Behavioural Brain Research*, 255, pp. 35-43.

Vajtay, T. J., Bandi, A., Upadhyay, A., Swerdel, M. R., Hart, R. P., Lee, C. R., Margolis, D. J. (2019) “Control of Movement Optogenetic and transcriptomic interrogation of enhanced muscle function in the paralyzed mouse whisker pad”, *Neurophysiology*, 121(4), pp. 1491-1500.

Zemelman, B. V., Lee, G. A., Ng, M., Miesenböck, B. (2002) “Selective photostimulation of genetically charged neurons”, *Neuron*, 33(1), pp. 15-22.

## **ANEXO I**

Otros tratamientos optogenéticos en proceso con aplicaciones prometedoras para el conocimiento y cura de diferentes enfermedades son:

### **Tratamiento de patologías cardíacas**

Investigadores de la Universidad de Bonn de Alemania han publicado el pasado junio de 2019 uno de los últimos estudios referentes a tratamiento de patologías cardíacas mediante Optogenética. En el mismo, han conseguido desarrollar células cardíacas fotosensibles (Sasse *et al.*, 2019).

Estas células denominadas miocardiocitos, han incorporado mediante la técnica Optogenética genes codificantes de proteínas fotosensibles generando, por ende, miocardiocitos fotosensibles capaces de activarse e inhibirse por despolarización e hiperpolarización inhibición respectivamente. “Al utilizar la luz, esta tecnología proporciona una precisión espacial y temporal muy alta, que contrasta claramente con la estimulación eléctrica. Además, la expresión específica de cardiomiocitos permitiría la estimulación sin dolor en un futuro” (Sasse *et al.*, 2019).

El grupo de investigación, dirigido por Philipp Sasse, consiguió expresar la ChR2 en miocardiocitos y utilizaron luz para estimular de forma precisa el crecimiento de las células en el corazón de ratones transgénicos. Los pulsos de luz provocaron corrientes eléctricas localizadas y prolongadas en las células cardíacas, según explica el estudio (Sasse *et al.*, 2019).

Expertos aseguran que “la Optogenética permitiría diseñar dispositivos más eficientes y de menor consumo eléctrico y, por tanto, de mayor longevidad que los marcapasos y DAIs (Desfibriladores Automáticos Implantables) tradicionales” (Redacción médica, 2019).

### **Tratamiento de lesiones de la Médula espinal**

Recientes estudios han demostrado que los nervios fotosensibles desarrollados por la técnica Optogenética son capaces de producir movimientos en las extremidades controlados por luz LED en tiempo real. La técnica permite movimientos hacia arriba y hacia abajo de la articulación del tobillo de los roedores de formas suaves y poco fatigantes (Vajtay *et al.*, 2019).

La Optogenética permite en estos tratamientos aplicaciones muy diversas, que van desde restaurar el movimiento en extremidades paralizadas, hasta desactivar señales de dolor no deseados pasando por tratar movimientos musculares rígidos o espásticos, relevante también para el tratamiento del Parkinson (Vajtay *et al.*, 2019).

La estimulación eléctrica de los nervios se utiliza clínicamente para tratar la disfunción respiratoria, intestinal, vesical y sexual en pacientes con lesiones de la médula espinal, así como para mejorar el acondicionamiento muscular en personas con enfermedades degenerativas musculares. Puede controlar las extremidades y prótesis paralizadas. En todos los casos, los impulsos eléctricos enviados a las fibras nerviosas, llamados axones, activan el movimiento en los músculos activados por las fibras (Vajtay *et al.*, 2019).

Los investigadores pudieron controlar el movimiento de la articulación del tobillo de roedores modificados para expresar opsinas en dos nervios concretos de la pierna al aplicar un LED conectada a la piel o implantada en la pierna (Vajtay *et al.*, 2019).

## **Cáncer**

En los últimos años se ha comenzado a pensar en la idea de la Optogenética para el tratamiento del cáncer. Aunque aún no se han desarrollado importantes hallazgos, a finales de 2019 se ha conocido que el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) junto con el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) se disponen a la creación de un proyecto multidisciplinar, coordinado por diversos organismos internacionales, denominado NanoBright. Este, tiene como objetivo el desarrollo de nuevos enfoques ópticos de vanguardia (como es la Optogenética) para el tratamiento de afecciones patológicas del cerebro como tumores sin necesidad de intervenciones invasivas (Genotipia, 2019).

“Las aplicaciones ópticas, como la Optogenética, están revolucionando el estudio de las enfermedades neurológicas, pero se enfrentan a una importante limitación en su traslación clínica debido a la necesidad de modificar genéticamente la zona a intervenir para hacerla sensible a la luz. Con NanoBright buscamos explotar las propiedades naturales de la luz en su interacción con la materia sin necesidad de modificar el tejido neuronal. Esto supone un cambio radical de concepto”, añade una de las investigadoras del CSIC (Genotipia, 2019).

Con estas afirmaciones cabe pensar que se pretende explotar la Optogenética basada fundamentalmente en la técnica de las nanopartículas, dejando atrás los métodos invasivos que utilizaban neurocirugía y “optrods”.

## **Narcolepsia**

Las técnicas optogenéticas in vivo fueron utilizadas por primera vez para el tratamiento de la Narcolepsia (Adamantidis *et al.*, 2007). Los autores de este estudio utilizaron el circuito de las hipocretinas (de Lecea *et al.*, 1998), también llamadas neuronas hipocretinérgicas para la demostración de que esta estimulación mediante técnicas optogenéticas en ratones es necesaria para hacer que el animal despierte. Estas células integran información acerca de los ritmos circadianos, el metabolismo energético y el sistema límbico entre otras muchas funciones que, tienen como objetivo enviar una señal que coordine los diferentes sistemas de vigilia, otorgando de estabilidad al ciclo vigilia-sueño.

El experimento ha permitido establecer una relación causal entre la actividad que realizan las neuronas hipocretinérgicas y el control de las transiciones entre los estados de vigilia y sueño (Adamantidis *et al.*, 2007).

## **Adicción a la cocaína**

Existen líneas de investigación que se están dirigiendo al tratamiento de la ansiedad relacionada con el consumo de drogas. En este caso, el signo del cambio pretende ser la variación de una asociación positiva a una neutral o incluso negativa. Es decir, se estudia que una asociación positiva anómala (adicción), pueda ser convertida en una respuesta neutra o incluso de repulsión. Esta demostración ha sido posible en ratones al reprogramar los circuitos que conectan el hipocampo con la corteza prefrontal, y también en la reprogramación de los circuitos que conectan la amígdala con la corteza prefrontal, de tal manera que en estos casos la adicción a la cocaína se ha visto significativamente disminuida (Pascoli *et al.*, 2014).