

OPTOGENÉTICA: UN HAZ DE LUZ PARA CONOCER LAS FUNCIONES CEREBRALES

Palabras clave: optogenética, memoria, técnica.
Key words: optogenetics, memory, technics.

Una de las grandes preguntas que nos hacemos en neurociencia es cómo la actividad neuronal crea diversas funciones en el cerebro, resultando en un determinado comportamiento. Para poder analizar esta pregunta, nos vemos obligados a analizar lo que ocurre dentro del sujeto experimental mientras ejecuta un comportamiento determinado, para así poder determinar qué circuito específico generó el mismo. Una de las técnicas más utilizadas hoy en día para dicho fin es la optogenética. Desde su creación, el uso de esta técnica se ha incrementado significativamente y actualmente es empleada a nivel mundial por laboratorios de neurociencia cuyo objetivo es dilucidar los enigmas de la actividad cerebral.

One of the big questions we ask in neuroscience is how neuronal activity creates various functions in the brain, resulting in a certain behavior. In order to analyze this question, we are forced to analyze what happens inside the experimental subject while executing a specific behavior, in order to be able to determine which specific circuit generated it. One of today's most used technique is called optogenetics. Since its creation, the use of this technique has significantly increased, being globally applied by the neuroscience field by laboratories whose purpose is to elucidate the enigmas of brain's activity.

■ INTRODUCCIÓN

Para el tiempo en que surge la optogenética, ya existían otras herramientas (como la microscopía de uno o de dos fotones) que nos permitían observar y estudiar la actividad neuronal de distintas áreas (como el soma, las espinas dendríticas y los terminales axonales) pero con la restricción de que el animal debía tener la cabeza fijada a un aparato experimental, que le impedía moverse libremente limitando así el comportamiento que uno podía estudiar (Miyamoto et. al 2015). El desarrollo de la optogenética permitió analizar qué ocurre en un animal que puede moverse libremente,

abriendo un nuevo abanico de posibles comportamientos que pueden ser estudiados en tiempo real: comportamientos sociales (pelea, apareamiento, cuidados maternos), comportamientos relacionados al estrés y a la ansiedad y comportamientos motores (movimiento cuello y cabeza, salto), entre otros. A esta nueva técnica se la llamó optogenética (e.g., Bernstein y Boyden, 2011; Fenno et al., 2011; Zhang et al., 2011; Mei & Zhang, 2012; Packer et al., 2013).

Desde su desarrollo al día de la fecha, el crecimiento en el uso de esta técnica fue exponencial, generando numerosas líneas de inves-

■ **KRAWCZYK MC¹, MILLAN J¹, BLAKE MG², BOCCIA MM^{*1}**

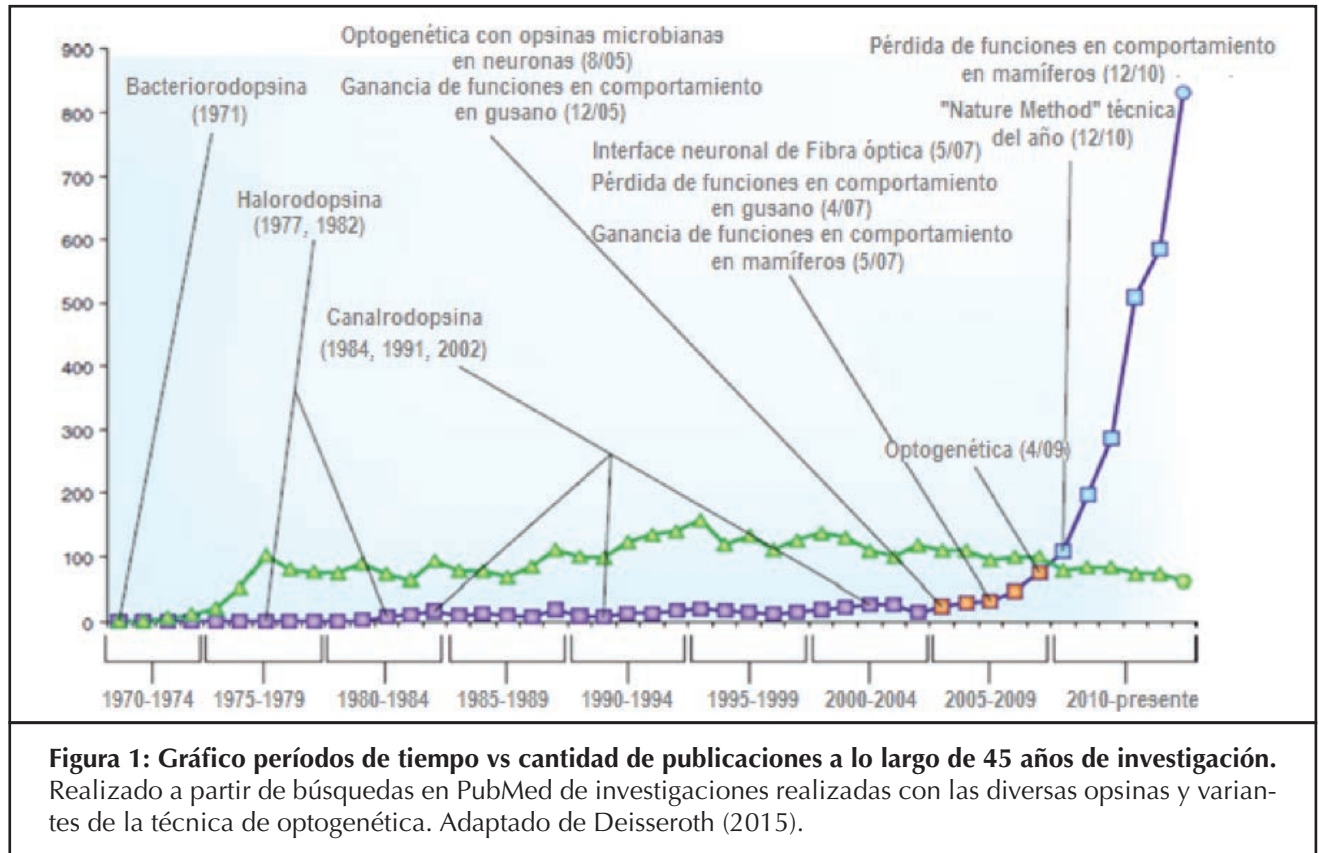
¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Farmacología, Laboratorio de Neurofarmacología de los Procesos de Memoria, Junín 956 5° piso, C1113AAD, Buenos Aires, Argentina.

² Universidad de Buenos Aires, CONICET, Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO), Paraguay, 2155, 7° piso, C1121ABC, Buenos Aires, Argentina

E-mail: mboccia@ffyb.uba.ar

tigación y descubrimientos en distintas áreas de sumo interés (Figura 1). Siguiendo esta línea, en el año 2010, la técnica de optogenética fue elegida como "Método del año" a lo largo de los campos de ciencia e ingeniería por la revista interdisciplinaria de investigación "Nature Methods" (Nat. Meth. Editorial, 2010).

Esta metodología, que combina técnicas de Genética, Óptica y Bioingeniería, permite inhibir o estimular la actividad eléctrica de determinadas neuronas tanto en experimentos *in vivo* (en un animal vivo y en movimiento desarrollando un determinado comportamiento)



como *in vitro* (cultivo celular de un tejido específico) (Deisseroth 2015). Esta herramienta, actualmente utilizada para el estudio de los circuitos neuronales que producen un determinado comportamiento, presenta tres componentes principales:

- Proteínas sensibles a la luz: opsinas
- Técnicas de ingeniería genética (para que las neuronas del área cerebral específica que quiere estudiarse produzcan suficiente cantidad de opsinas)
- Técnicas de bioingeniería (para guiar suficiente luz por un tiempo determinado al área específica en estudio, permitiendo el accionar de las opsinas mientras que el animal desarrolla un comportamiento dado)

La idea general, entonces, es lograr que las neuronas de un sitio específico del cerebro produzcan

suficientes opsinas, las proteínas sensibles a la luz. Luego se envía luz hacia estos sitios del cerebro, lo que activa las opsinas y permite modificar la actividad de estas neuronas. El cambio en la actividad neuronal permite modificar la conducta del animal y, de este modo, estudiarla.

■ ¿QUÉ SON LAS OPSINAS?

Las opsinas son proteínas transmembrana sensibles a la luz que se encuentran en la naturaleza en una variedad de organismos (desde microbios a primates). Las células que poseen estas proteínas cambian su actividad cuando la célula es expuesta a una determinada luz. Cuando mediante técnicas de optogenética se provoca que una determinada célula (una neurona, por ejemplo) exprese opsinas, ya sean naturales o modificadas, puede transformarse la actividad de esa neurona cuando se la expone a la luz. De este modo, en las neuronas del animal que se está estudiando se puede generar:

inducción de uno o más potenciales de acción, supresión/inhibición de una determinada actividad neuronal o modificación de una definida vía de señalización con una precisión de milisegundos en cuanto al instante en el que se generan estos cambios (Guru et al 2015).

Las opsinas naturales (no modificadas por el hombre) pueden dividirse en dos grandes clases:

- Opsinas de Tipo I (Procariontes, algas, hongos)
- Opsinas de Tipo II (Vertebrados e Invertebrados)

La primera clase de opsinas se encuentra en microorganismos procariontes (bacteria, arquea, alga) y algunos eucariontes (hongos y algas). En general son proteínas de membrana que actúan como canales o bombas (Nagel et al 2002, 2003), transduciendo directamente la energía de los fotones en una co-

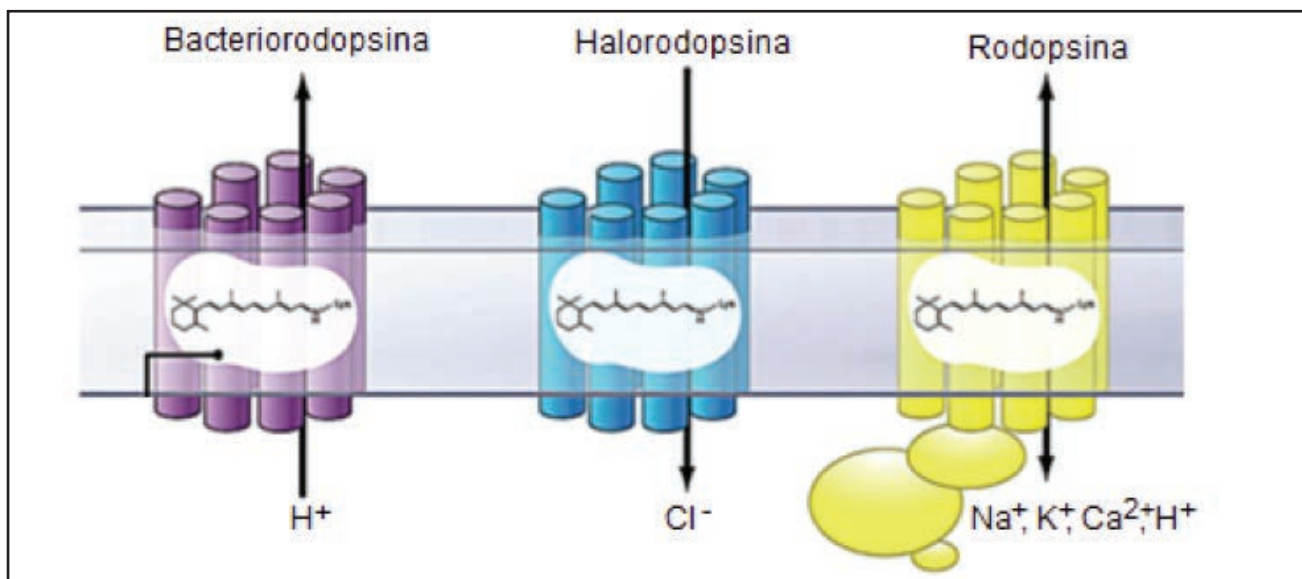


Figura 2: Opsinas de origen microbiano.

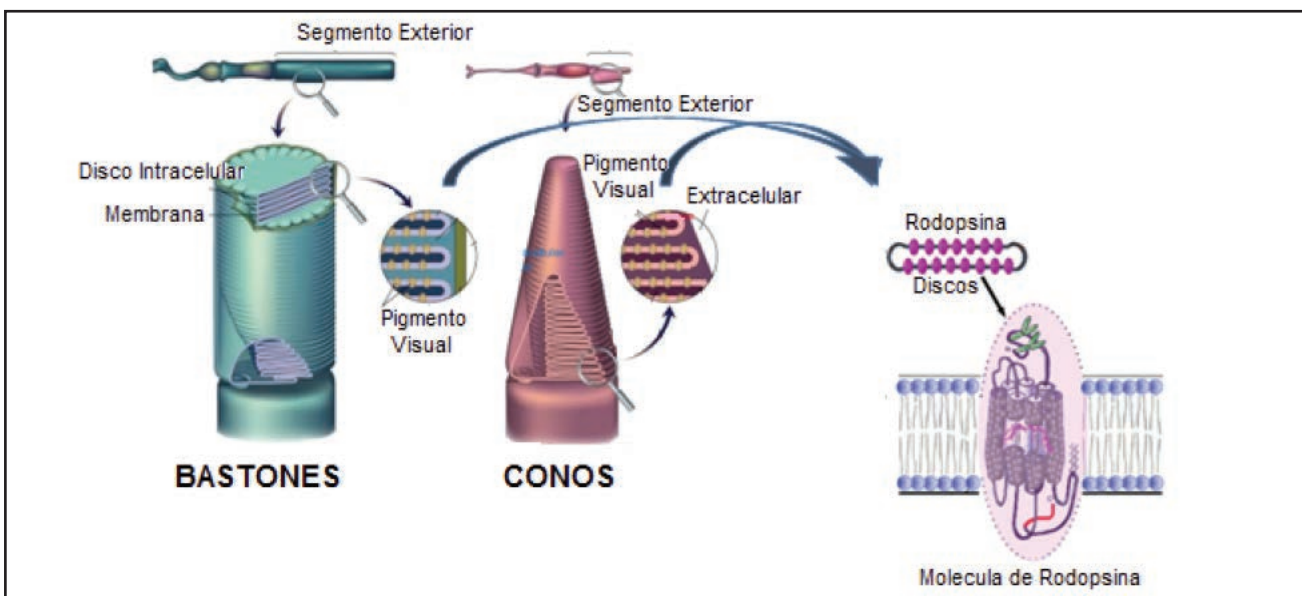


Figura 3: Opsinas de origen vertebrado.

rriente eléctrica. Son utilizadas por su poseedor para una variedad de funciones: navegación hacia fuentes de energía, alejamiento de ambientes hostiles y control de la concentración de diversos iones, entre otras.

De las opsinas que conforman este grupo (Figura 2), tres tipos son actualmente utilizados en optogenética: las Bacteriorodopsinas, las Halorodopsinas y los Canales de Rodopsina (Figura 2). Cuando me-

dante la optogenética se logra que un grupo de neuronas exprese estas opsinas, tanto las bacteriorodopsinas (bombean protones fuera de la célula) como las halorodopsinas (bombean iones cloruro dentro de la célula) generan corrientes hiperpolarizantes que dificultan el disparo de potenciales de acción en la neurona, por lo que suelen inhibir la actividad neuronal. Por el contrario, los canales de rodopsina permiten el ingreso de protones, lo que genera una corriente despolarizante que fa-

vorece el disparo de potenciales de acción en la neurona. A lo largo de los años fueron descubiertas nuevas variantes naturales con diferencias en sus cinéticas, conductancias a iones y propiedades relativas al cambio de color, influenciando positivamente sobre esta técnica (Deisseroth 2015).

Por su parte, las opsinas tipo II se encuentran en células animales y tienen función principalmente en la visión y modulación del ritmo circa-

diano (Figura 3). Éstas son receptores acoplados a proteínas G, por lo que al ser estimuladas inician una cascada de activación (en vez de una activación directa como las proteínas tipo I) generando cambios más lentos en la activación neuronal.

Independientemente del origen o del tipo de opsina, estas proteínas requieren de un vitámero de la vitamina A llamado Retinal. Al unirse el retinal con la opsina, el complejo retinal-opsina se vuelve sensible a la luz. Si en este estado un fotón golpea al retinal, el complejo se isomeriza y pasa a un estado activo. La fotoisomerización resultante inducirá un cambio conformacional en la opsina que lleva a la apertura de canales o a la activación de bombas (dependiendo del tipo de opsina), y provoca cambios en el potencial de membrana que activarán o inhibirán la actividad neuronal.

El retinal ya se encuentra presente en el tejido neuronal de los mamíferos, lo que facilitó en un principio el uso de la optogenética. Por el contrario, dicho vitámero no se encuentra en modelos de invertebrados (como *Drosophila Melanogaster*), por lo que un requisito indispensable para que esta herramienta pueda usarse en los invertebrados es introducir el retinal en un suplemento dietario (Guru et al 2015).

■ ¿CÓMO SE MODIFICA GENÉTICAMENTE A LAS NEURONAS PARA QUE EXPRESEN LAS OPSINAS DE INTERÉS?

Para poder manipular un tipo celular de manera espacio-temporal específica con técnicas de optogenética, es necesario lograr que la célula exprese las opsinas, y para esto hace falta colocarle genes de estas proteínas y luego lograr que estos genes se expresen correctamente en un sitio determinado. Esto puede lle-

varse a cabo de varias maneras. Un método muy popular que permite controlar estrechamente el sitio del cerebro en el que se expresarán las opsinas, es la utilización de sistemas de expresión viral. Para ello se diseña artificialmente un virus, llamado vector, que contiene el gen de una determinada opsina bajo un promotor específico. Este vector viral se inyecta en la región del cerebro en donde deseamos que se expresen las opsinas, que es la región que nos interesa estudiar. Este método ofrece una expresión rápida y robusta de la opsina en el sitio donde se inyectó. Se han empleado diversos tipos de virus (lentivirus, virus de la rabia, adenovirus, virus del herpes simple, entre otros) con la finalidad de introducir dichas proteínas en diferentes modelos animales, tales como: ratones, ratas, zebrafish y primates. Sin embargo, la longitud del material genético que puede llevar un virus es limitado, lo que impone una restricción al tipo de promotor que puede ser utilizado (debido a su tamaño) y en consecuencia, acotando la diversidad de tipos de células que pueden ser manipuladas por esta técnica de ingeniería genética.

Una manera de superar esta limitación es utilizar animales transgénicos, animales que han sido modificados genéticamente para que expresen la opsina en una población neuronal determinada. La desventaja de este método es que para obtener estos animales transgénicos se necesita más esfuerzo y tiempo, y cada vez que se desea trabajar con una nueva opsina debe generarse una nueva línea de ratones transgénicos. Además, con la inyección de un vector viral se logra que las opsinas estén presentes en una localización espacial específica, mientras que esta especificidad se pierde en los animales transgénicos, por lo que su uso es más restringido.

Como los dos métodos tienen ventajas y desventajas, la estrategia dominante actualmente en este campo es la combinación de ambos métodos. Esta estrategia combina una línea de ratones transgénicos que expresan la proteína Cre recombinasa en un sitio en particular junto con la inyección de vectores virales de expresión. La proteína en cuestión es una enzima que cataliza la recombinación entre dos sitios loxP que se encuentran a los extremos de un determinado gen o material genético. La co-localización de dicha enzima y un vector viral que lleva a la opsina permitirá la correcta expresión de la misma en el área específica.

■ EL USO DE LA BIOINGENIERÍA PARA ILUMINAR A LAS NEURONAS ESPECÍFICAS.

Para activar a las distintas opsinas, y de ese modo modificar la actividad de las neuronas que las poseen, debe iluminarse el sitio en el que se encuentran esas neuronas. Como fuente de luz se utilizan diodos emisores de luz (LED de sus siglas en inglés "Light-emitting diodes"), cuyas principales ventajas son el bajo costo, la gran variedad de colores disponibles y la facilidad con la que pueden ser acoplados a fibras ópticas que guían la luz hacia sitios específicos. Esto permite que la luz sea enviada hacia cualquier lugar del cerebro, específicamente hacia el área que contiene las neuronas donde se expresan las opsinas, que es el área cerebral que deseamos estudiar.

Entonces, resumiendo, se modifica genéticamente a un grupo de neuronas para que sean capaces de expresar las proteínas sensibles a la luz, las opsinas. Al ser iluminadas con un haz de luz de determinado color, esas neuronas van a activarse o inhibirse de manera transitoria o

bien sus vías de señalización podrán ser modificadas, dependiendo del tipo de opsina empleada.

■ ¿CUÁL ES LA POTENCIALIDAD DE ESTA TÉCNICA EN LA MEDICINA HOY EN DÍA? OPTOGENÉTICA Y REVERSIÓN DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL SISTEMA VISUAL

En términos generales, las estrategias clásicas propuestas para la restauración de la función visual se centran en sustituir a las células fotorreceptoras perdidas debido a la degeneración (por ejemplo, con progenitores de células madre) o manipulando eléctrica o químicamente a las neuronas no fotorreceptoras sobrevivientes para restaurar la señalización al cerebro, impulsada por la señal lumínica. Las prótesis de retina sólo son apropiadas para degeneraciones fotorreceptoras donde todavía hay un vínculo neuronal funcional con la corteza visual. Las prótesis utilizadas hasta el momento han devuelto la visión de manera limitada.

Surge entonces, por parte de la comunidad científica, la necesidad de buscar nuevos métodos para la restauración de la visión en enfermedades degenerativas de la retina; uno de ellos es la optogenética, mediante la implementación de terapias génicas optogenéticas.

El concepto básico de esta estrategia es o bien mejorar la supervivencia y complementar la capacidad de señalización de los fotorreceptores residuales sensibles a la luz, o bien impartir la propiedad de sensibilización a la luz a neuronas de la retina no sensibles a la misma como medio de restauración de la señalización a la corteza visual (Figura 4). Clínicamente implicaría la inyección de un vector viral para que células específicas de un área determinada de la retina puedan ser ahora sensibles a la luz. Dado que el ojo es transparente, el paciente podría utilizar un dispositivo de realidad virtual aumentada capaz de transmitir pulsos de luz. Ésta técnica no requeriría de cirugías invasivas salvo por los implantes optoelectrónicos. Por lo ex-

puesto, la técnica de optogenética debería ser más fácil de desarrollar y menos costosa de implementar que las utilizadas actualmente.

Sin embargo, como con cualquier técnica nueva, la optogenética no deja de tener sus propios retos. Hay dos principales obstáculos que superar: las cuestiones éticas en torno a la ingeniería genética humana y la posible toxicidad de los vectores virales utilizados.

■ BIBLIOGRAFÍA

Allen BD, Singer AC, Boyden ES (2015) Principles of designing interpretable optogenetic behavior experiments. *Learning & Memory*, 22, 232-238.

Barrett JM, Berlinguer-Palmini R, Degenaar P (2014) Optogenetic approaches to retinal prosthesis. *Visual Neuroscience*, 31, 345-354

Bernstein JG, Boyden ES (2011) Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior.

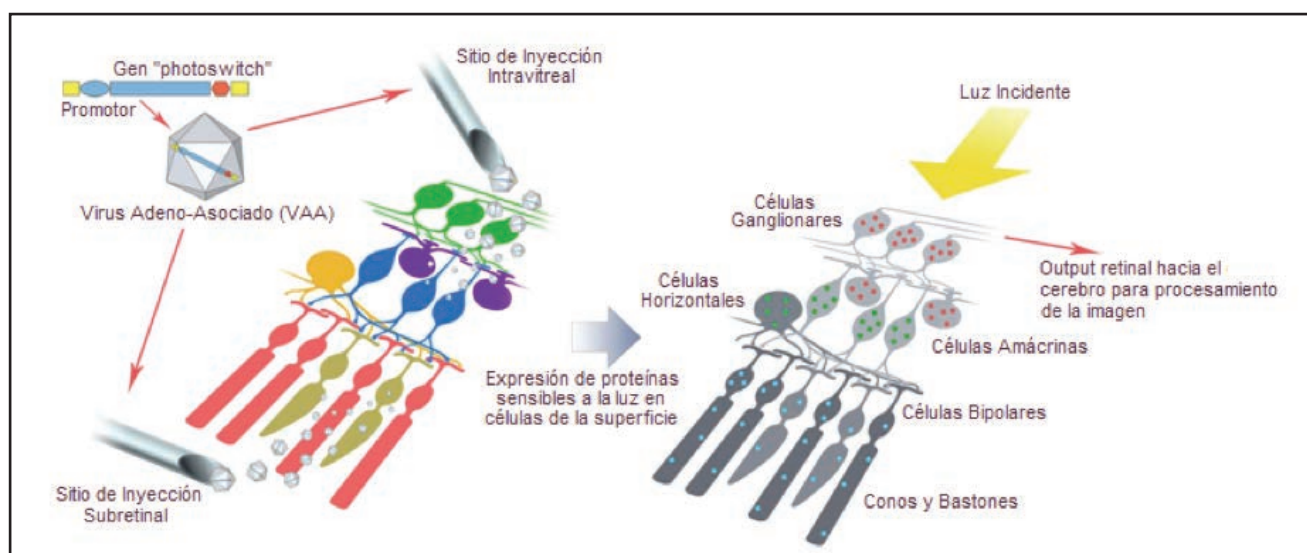


Figura 4: Utilización de la optogenética para la restauración visual en humanos. El concepto actual es el uso de un serotipo o de la versión mutada de AAV para suministrar a la retina un gen que codifica una opsina, por ejemplo, canalrodopsina-2 o halorrodopsina. Entonces, las opsinas se expresarían en la membrana celular donde la incidencia de la luz en la retina generaría la apertura de canales, permitiendo el flujo de iones a través de la membrana. Dicho flujo resultaría en la despolarización o hiperpolarización de las células de la retina, transmitiendo el impulso nervioso a la corteza occipital por medio del nervio óptico.

- Trends Cogn Sci. 15, 592-600.
- Bickle J (2016) Revolutions in Neuroscience. Tool Development. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10, 24
- Deisseroth K (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nature Neuroscience*, 18, 1213-1225
- Fenko L, Yizhar O, Deisseroth K (2011) The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci*. 34, 389-412.
- Francis PJ, Mansfield B, Rose S (2013) Proceedings of the First International Optogenetic Therapies for Vision Symposium. *Translation Vision Science & Technology*, 2, 4
- Guru A., Post RJ, Ho YY, Warden MR (2015) Making Sense of Optogenetics Making sense of optogenetics, 18, 1-8.
- Miyamoto D, Murayama M. (2016) The fiber-optic imaging and manipulation of neural activity during animal behavior. *Neurosci Res*. 103, 1-9.
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*, 296, 2395-2398.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 13940-13945.
- Oesterhelt D, Stoeckenius W (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* *Nature New Biology*, 233, 149-152
- Packer AM, Roska B, Häusser M. (2013) Targeting neurons and photons for optogenetics. *Nat Neurosci*. 16, 805-815.
- Rein ML, Deussing JM (2012) The optogenetic (r)evolution. *Molecular Genetics and Genomics*, 287, 95-109.
- Tochitsky I, Kramer RH (2015) Optopharmacological tools for restoring visual function in degenerative retinal diseases. *Current Opinion Neurobiology*, 34, 74-78.
- Zhang F, Vierock J, Yizhar O, Fenno LE, Tsunoda S, Kianianmomeni A, Prigge M, Berndt A, Cushman J, Polle J, Magnuson J, Hegemann P, Deisseroth K (2011) The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell*. 23, 147, 1446-1457.