

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 093**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2011 PCT/US2011/059283**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061681**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2011 E 11838856 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2635295**

54 Título: **Control y caracterización de la función de la memoria**

30 Prioridad:

05.11.2010 US 410732 P
29.09.2011 US 201161540926 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2018

73 Titular/es:

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
1705 El Camino Real
Palo Alto, CA 94306-1106, US

72 Inventor/es:

DEISSEROTH, KARL y
GOSHEN, INBAL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 661 093 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Control y caracterización de la función de la memoria

5 Antecedentes

La consolidación de memorias remotas se basa tanto en los procesos de consolidación sináptica en la escala de tiempo de minutos a horas, como la consolidación de circuitos durante semanas a años (Frankland y Bontempi, 2005; Squire y Bailey, 2007). El proceso de consolidación contextual de la memoria de miedo a largo plazo requiere la participación temprana del hipocampo, seguido de la neocorteza; en el transcurso de este proceso, una influencia del hipocampo sobre la neocorteza puede permitir que el hipocampo facilite el almacenamiento de memoria cortical a largo plazo, en vez de guardar establemente la propia memoria. Estudios han mostrado que las lesiones hipocámpicas alteran la memoria reciente un día después del entrenamiento, pero las mismas lesiones no tuvieron efecto sobre la memoria remota, varias semanas después del entrenamiento (Anagnostaras et al., 1999; Bontempi et al., 1999; Debiec et al., 2002; Frankland et al., 2004; Kim y Fanselow, 1992; Kitamura et al., 2009; Maren et al., 1997; Maviel et al., 2004; Shimizu et al., 2000; Wang et al., 2003; Winocur et al., 2009). Estudios adicionales sugieren que tanto las memorias hipocámpicas como corticales están en interacción continua.

Trabajo previo sobre el circuito de la memoria ha implicado estudios de lesión física, farmacológica y genética, que han mejorado enormemente el entendimiento de los presentes inventores de los sistemas neurales, pero también han sufrido ciertos retos muy conocidos; por ejemplo, lesiones físicas son altamente eficaces pero carecen de tanto precisión celular como temporal, y otros métodos normalmente implican intercambios entre precisión celular y temporal. Intervenciones genéticas elegantes pueden ser específicas del tipo de célula (McHugh et al., 2007; Nakashiba et al., 2008), pero son lentas en la escala de tiempo de días. Lesiones farmacológicas permiten resolución temporal más alta en la escala de tiempo de minutos (Kitamura et al., 2009; Wiltgen et al., 2010), pero son todavía más lentas que las neuronas y normalmente no son específicas de célula. Existe una necesidad de desarrollar métodos y herramientas que permitan tanto la precisión de tipo célula como el control temporal en la escala de tiempo de milisegundos para el estudio de memoria en animales.

Pueden surgir diversas afecciones psiquiátricas debido a un trastorno en el circuito de la memoria. Por ejemplo, la amnesia (por ejemplo, amnesia no catalogada, retrógrada catalogada, retrógrada focal, etc.) implica una incapacidad para recuperar ciertas memorias, mientras que el trastorno de estrés postraumático (PTSD) implica recuperación no deseada de memorias de miedo. El PTSD es una afección psiquiátrica debilitante común en la que una única exposición a un evento traumático puede conducir a años de función comprometida debido a la repetición de volver a experimentar el traumatismo.

El entendimiento de las vías neurales que subyacen al recuerdo de memoria no deseada puede ayudar en el descubrimiento y el cribado de terapias farmacológicas para tratar pacientes con tales trastornos de la memoria.

Gradinaru et al, Science (2009) 324; 354-359 se refieren a la deconstrucción óptica del circuito neural parkinsoniano. El documento WO 2010/056970 se refiere a estimulación ópticamente basada de células diana y modificaciones a la misma. Fiala et al, Current Biology (2010) 20, R897-R903, revisa enfoques optogenéticos en la neurociencia. El documento US 2009/0093403 describe la estimulación de células diana usando luz. El documento US 2009/0088680 se refiere a un sistema que estimula eléctricamente células diana de un animal vivo usando una estructura alargada, un circuito de modulación y una vía de luz tal como se proporciona por una disposición de fibra óptica. Malin et al, Neurobiol Learn Mem. (2007) 87(2); 295-302 describen la participación de la corteza cingulada anterior rostral en la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria. Johansen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2010), 107; 12692-12697 desvelan que la activación óptica de las células piramidales de la amígdala lateral instruyen al aprendizaje de miedo asociativo. Fanselow y LeDoux, Neuron (1999) 23; 229-232 se refiere al condicionamiento del miedo en la amígdala basolateral. Rogers et al, Neurobiology of Learning and Memory (2006) 86;72-81 se refiere a los efectos de las lesiones subregionales CA1 ventrales y dorsales sobre el rastreo del condicionamiento de miedo.

Sumario

La presente invención proporciona un polinucleótido que codifica una proteína activada por la luz para su uso en un método de tratamiento del trastorno de estrés postraumático (PTSD) en un individuo, en el que dicho método comprende: administrar el polinucleótido que codifica la proteína activada por la luz al campo CA1 dorsal del hipocampo, la corteza cingulada anterior del individuo o la amígdala basolateral del individuo, en el que la proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo, la corteza cingulada anterior o la amígdala basolateral del individuo, y la proteína es sensible a la luz y es capaz de hiperpolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, y activar la proteína por la luz para inhibir reversiblemente la formación o recuperación de una memoria de miedo, tratando así el PTSD en el individuo.

La invención también proporciona un método de cribado de un agente farmacológico que afecta la recuperación o formación de una memoria de miedo, comprendiendo el método: a) poner en contacto neuronas excitadoras en el

campo CA1 dorsal del hipocampo, la corteza cingulada anterior o la amígdala basolateral durante la recuperación o formación de una memoria de miedo en un ratón con un agente farmacológico, en el que dicho ratón comprende una proteína activada por la luz expresada sobre la membrana celular de neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal de su hipocampo, su corteza cingulada anterior o su amígdala basolateral, en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de hiperpolarizar las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, en el que la iluminación de las neuronas inhibe la formación o recuperación de una memoria de miedo; b) inducir la hiperpolarización de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo durante la recuperación de memoria o formación de una memoria de miedo, aplicando luz de una longitud de onda que activa la proteína activada por la luz; y c) determinar si el agente farmacológico afecta la recuperación o formación de una memoria de miedo en presencia o ausencia de la luz.

La presente divulgación también explica ("proporciona") varios otros productos y métodos como se trata en el presente documento a continuación que pueden facilitar el entendimiento de la presente invención, que se define por las reivindicaciones.

Aspectos de la presente divulgación se refieren a controlar o caracterizar la función de la memoria en animales vivos, como se describe en el presente documento. Aunque la presente divulgación no está necesariamente limitada en estos contextos, pueden apreciarse realizaciones de la invención mediante una discusión de los ejemplos usando estos y otros contextos.

Ciertas realizaciones de la presente divulgación se refieren a circuitos especialmente dirigidos que están asociados con la función de la memoria. Realizaciones más particulares se refieren al control espacio-temporal con respecto al circuito neural para identificar dianas de circuito específicas asociadas y correspondientes a la(s) función (funciones) de la memoria (por ejemplo, formación y/o recuperación de memoria).

Realizaciones particulares de la presente divulgación se refieren a la inhibición temporalmente precisa de los circuitos neurales en el hipocampo (tales como las neuronas del campo CA1 dorsal del hipocampo), siendo la precisión suficiente para alterar la función de la memoria. Se ha descubierto que la precisión temporal de la inhibición neural es eficaz para alterar la recuperación de memoria remota, mientras que la inhibición prolongada no tiene efecto significativo sobre la recuperación de memoria remota. Por consiguiente, aspectos de la presente divulgación se refieren a aspectos temporales de tal inhibición. Alternativamente o adicionalmente, métodos para afectar reversiblemente la función de la memoria pueden comprender inhibir temporalmente neuronas de la amígdala (por ejemplo, amígdala basolateral) y/o neuronas de la corteza cingulada (por ejemplo, corteza cingulada anterior). En ciertas realizaciones, esta inhibición se realiza usando un sistema optogenético que implica la expresión de proteínas activadas por la luz (por ejemplo, opsinas) en las células del circuito neural. En otras realizaciones, la inhibición puede realizarse usando estímulo eléctrico directo. Todavía otras realizaciones permiten el uso de productos farmacéuticos temporalmente precisos.

Diversas realizaciones de la presente divulgación se refieren a un sistema optogenético o método que correlaciona el control temporal con un circuito neural con métrica medible. Por ejemplo, una función de la memoria particular podría asociarse a un trastorno neurológico. El sistema optogenético dirige un circuito neural dentro de un individuo para el control selectivo del mismo. El sistema optogenético implica monitorizar al individuo para métrica (por ejemplo, síntomas) asociados al trastorno neurológico. De este modo, el sistema optogenético puede proporcionar información detallada sobre el circuito neural, su función y/o el trastorno neurológico. Pueden usarse uno o más métodos para afectar reversiblemente la función de la memoria para evaluar la eficacia de agentes farmacológicos en el tratamiento de PTSD y/o diversos trastornos de la memoria.

En el presente documento se proporcionan métodos de detección de la memoria usando técnicas optogenéticas expresando proteínas activadas por la luz en una población específica de neuronas implicadas en la función de la memoria, y que afectan la función de la memoria activando la proteína por luz. En algunas variaciones, las proteínas activadas por la luz pueden configurarse para inhibir la despolarización de una neurona en presencia de luz que tiene una longitud de onda específica. En algunas variaciones, las proteínas activadas por la luz pueden configurarse para promover la despolarización de una neurona en presencia de una luz que tiene una longitud de onda específica.

En el presente documento se proporciona un animal no humano que comprende una proteína activada por la luz expresada sobre la membrana celular de neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo del animal, en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, en el que la iluminación de la proteína afecta reversiblemente la función de la memoria. También en el presente documento se proporciona un animal no humano que comprende una proteína activada por la luz expresada sobre la membrana celular de neuronas excitadoras en la corteza cingulada anterior del animal, en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, en el que la iluminación de la proteína afecta reversiblemente la función de la memoria. También en el presente documento se proporciona un animal no humano que comprende una proteína activada por la luz expresada sobre la membrana celular de neuronas excitadoras en la amígdala basolateral del animal, en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las

neuronas son iluminadas con la luz, en el que la iluminación de la proteína afecta reversiblemente la función de la memoria. En algunas realizaciones, la función de la memoria que es afectada cuando las neuronas son iluminadas puede ser la recuperación de memoria y/o la formación de memoria. En algunas realizaciones, la memoria es una memoria de miedo y/o una memoria remota.

5 También en el presente documento se proporciona un corte de tejido cerebral que comprende una región del cerebro seleccionada del grupo que consiste en el campo CA1 dorsal del hipocampo, la amígdala basolateral y la corteza cingulada anterior, en el que una proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de neuronas excitadoras de la región del cerebro, en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, en el que la iluminación de la proteína afecta reversiblemente la función de la memoria.

10 También se proporcionan en el presente documento métodos de afectar reversiblemente la recuperación o formación de memoria en un individuo.

15 En algunas realizaciones, el método de afectar reversiblemente la recuperación o formación de memoria en un individuo comprende: administrar un polinucleótido que codifica una proteína activada por la luz al campo CA1 dorsal del hipocampo en el individuo en el que la proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo y la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, por lo que activar la proteína por la luz afecta reversiblemente la recuperación o formación de memoria de un evento en el individuo. En algunas realizaciones, el método para afectar reversiblemente la recuperación o formación de memoria comprende: inhibir la despolarización de neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo durante la recuperación o formación de memoria de un evento en un individuo, en el que una proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo del individuo en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz.

20 En algunas realizaciones, el método para afectar reversiblemente la recuperación o formación de memoria en un individuo comprende: administrar un polinucleótido que codifica una proteína activada por la luz a la corteza cingulada anterior en el individuo en el que la proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en la corteza cingulada anterior y la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, por lo que activar la proteína por la luz afecta reversiblemente la recuperación o formación de memoria de un evento en el individuo. En algunas realizaciones, el método para afectar reversiblemente la recuperación o formación de memoria comprende: inhibir la despolarización de neuronas excitadoras en la corteza cingulada anterior durante la recuperación o formación de memoria de un evento en un individuo, en el que una proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en la corteza cingulada anterior del individuo en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz.

30 En algunas realizaciones, el método para afectar reversiblemente la recuperación o formación de memoria en un individuo comprende: administrar un polinucleótido que codifica una proteína activada por la luz a la amígdala basolateral en el individuo en el que la proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en la amígdala basolateral y la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, por lo que activar la proteína por la luz afecta reversiblemente la recuperación o formación de memoria de un evento en el individuo. En algunas realizaciones, el método para afectar reversiblemente la recuperación o formación de memoria comprende: inhibir la despolarización de neuronas excitadoras en la amígdala basolateral durante la recuperación o formación de memoria de un evento en un individuo, en el que una proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en la amígdala basolateral del individuo en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz.

35 También en el presente documento se proporcionan métodos de tratamiento del trastorno de estrés postraumático en un individuo. En algunas realizaciones, el método de tratamiento del trastorno de estrés postraumático en un individuo comprende: administrar un polinucleótido que codifica una proteína activada por la luz al campo CA1 dorsal del hipocampo en el individuo en el que la proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo y la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, por lo que activar la proteína por la luz afecta reversiblemente la recuperación o formación de memoria de un evento en el individuo. En algunas realizaciones, el método de tratamiento del trastorno de estrés postraumático en un individuo comprende: administrar un polinucleótido que codifica una proteína activada por la luz a la corteza cingulada anterior en el individuo en el que la proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en la corteza cingulada anterior y la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, por lo que activar la proteína por la luz afecta reversiblemente la recuperación o formación de memoria de un evento en el individuo.

También en el presente documento se proporcionan métodos de cribado de un agente farmacológico que afecta la recuperación o formación de memoria que comprende: a) poner en contacto neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo durante la recuperación o formación de memoria de un evento en un animal no humano con un agente farmacológico, en el que el animal no humano comprende una proteína activada por la luz expresada sobre la membrana celular de neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo del animal, en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz; b) inhibir la despolarización de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo durante la recuperación o formación de memoria de un evento; y c) determinar si el agente farmacológico afecta la recuperación o formación de memoria en presencia o ausencia de la luz. También en el presente documento se proporcionan métodos de cribado de un agente farmacológico que afecta la recuperación o formación de memoria que comprende: a) poner en contacto neuronas excitadoras en la corteza cingulada anterior durante la recuperación o formación de memoria de un evento en un animal no humano con un agente farmacológico, en el que el animal no humano comprende una proteína activada por la luz expresada sobre la membrana celular de neuronas excitadoras en la corteza cingulada anterior del animal, en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz; b) inhibir la despolarización de las neuronas excitadoras en la corteza cingulada anterior durante la recuperación o formación de memoria de un evento; y c) determinar si el agente farmacológico afecta la recuperación o formación de memoria en presencia o ausencia de la luz. También en el presente documento se proporcionan métodos de cribado de un agente farmacológico que afecta la recuperación o formación de memoria que comprende: a) poner en contacto neuronas excitadoras en la amígdala basolateral durante la recuperación o formación de memoria de un evento en un animal no humano con un agente farmacológico, en el que el animal no humano comprende una proteína activada por la luz expresada sobre la membrana celular de neuronas excitadoras en la amígdala basolateral del animal, en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz; b) inhibir la despolarización de las neuronas excitadoras en la amígdala basolateral durante la recuperación o formación de memoria de un evento; y c) determinar si el agente farmacológico afecta la recuperación o formación de memoria en presencia o ausencia de la luz.

La proteína activada por la luz puede ser sensible a la luz y estar configurada de forma que la proteína sea capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz. En algunas realizaciones, la proteína activada por la luz puede seleccionarse del grupo que consiste en NpHR, BR, AR y GtR3 descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la proteína activada por la luz es una proteína NpHR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la proteína NpHR comprende además una señal de exportación de retículo endoplásmico (RE) y/o una señal de tráfico de membrana. Por ejemplo, la proteína NpHR comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3 y una señal de exportación de retículo endoplásmico (RE). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3 está unida a la señal de exportación de RE mediante un conector. En algunas realizaciones, la señal de exportación de RE comprende la secuencia de aminoácidos FXYENE, donde X puede ser cualquier aminoácido. En otra realización, la señal de exportación de RE comprende la secuencia de aminoácidos VXXSL, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación de RE comprende la secuencia de aminoácidos FCYENEV. En algunas realizaciones, la proteína NpHR comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3, una señal de exportación de RE y una señal de tráfico de membrana. En otras realizaciones, la proteína NpHR comprende, de extremo N a extremo C, la secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3, la señal de exportación de RE y la señal de tráfico de membrana. En otras realizaciones, la proteína NpHR comprende, de extremo N a extremo C, la secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3, la señal de tráfico de membrana y la señal de exportación de ER. En algunas realizaciones, la señal de tráfico de membrana deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador hacia adentro humano Kir2.1. En algunas realizaciones, la señal de tráfico de membrana comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV. En algunas realizaciones, la señal de tráfico de membrana está unida a la secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3 por un conector. En algunas realizaciones, la señal de tráfico de membrana está unida a la señal de exportación de RE mediante un conector. El conector puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400 o 500 aminoácidos de longitud. El conector puede comprender además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero no se limita a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente rojo, una proteína verde fluorescente, o una proteína fluorescente cian. En algunas realizaciones, la proteína activada por la luz comprende además un péptido señal del extremo N. En algunas realizaciones, la proteína activada por la luz comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína activada por la luz comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Debe entenderse que una, algunas, o todas de las propiedades de las diversas realizaciones descritas en el presente documento pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para un experto en la materia.

65

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa una variación de un dispositivo o un sistema que puede usarse para aplicar luz de longitudes de onda seleccionadas para afectar la función de la memoria.

La FIG. 2 representa un diagrama de flujo para modificar la función de la memoria.

Las FIGS. 3A y 3B representan variaciones de métodos para evaluar los efectos de un agente farmacológico de prueba sobre los circuitos neurales que subyacen a la función de la memoria.

Las FIGS. 4A-D representan datos experimentales que muestran que la inhibición optogenética específica de neuronas excitadoras en CA1 dorsal reduce la actividad neuronal. La FIG. 4A muestra que la inyección lentiviral doble produjo la expresión de eNpHR3.1 a través de CA1 solo. La FIG. 4B muestra que eNpHR3.1 se expresa en la membrana neuronal alrededor del soma, además de en las dendritas apicales y basales de neuronas de CA1. La FIG. 4C representa datos que demuestran que CaMKII α ::eNpHR3.1 se expresó en el 94 % (458/486 células, de 3 ratones) de neuronas piramidales de CA1, con el 100 % de especificidad (todas las células eNpHR3.1-EYFP fueron CaMKII α positivas). La FIG. 4D representa datos de la administración de luz de 'optodo' *in vivo* y el registro realizado insertando una fibra óptica acoplada a un electrodo de tungsteno a CA1 en ratones anestesiados que expresan eNpHR3.1 (izquierda). La iluminación de 561 nm de neuronas de CA1 en estos ratones produjo una reducción sustancial reversible en la frecuencia de impulsos ($4,93 \pm 1,6$ Hz, $1,31 \pm 0,15$ Hz y $6,45 \pm 2,4$ Hz; antes, durante y después de la administración de luz, respectivamente, en 15 trazados de 2 ratones, $P < 0,02$), sin afectar la amplitud de impulsos promedio ($33,55 \pm 4,94$ μ V, $29,20 \pm 4,4$ μ V y $33,32 \pm 5,45$ μ V; antes, durante y después de la luz). Se muestran un trazado de registro de optodo representativo, además de la frecuencia promedio y amplitud (media \pm EEM).

Las FIGS. 5A-5I representan datos experimentales que muestran que la inhibición optogenética de CA1 en tiempo real bloquea la adquisición y recuperación de miedo contextual. La FIG. 5A muestra que puede administrarse luz bilateral *in vivo* a CA1 insertando una fibra óptica doble mediante guía de cánula bilateral en ratones que se mueven libremente. La FIG. 5B (arriba) representa una secuencia experimental donde se administró iluminación continua de 561 nm durante el entrenamiento de condicionamiento de miedo, y se probaron ratones para su memoria 24 h después sin luz. Un día después, los ratones volvieron a ser entrenados sin luz, y volvieron a probarse sin luz en el cuarto día y con luz en el quinto (abajo). La inhibición optogenética de CA1 durante el entrenamiento de condicionamiento del miedo (luz ENCENDIDA) previno la adquisición en ratones eNpHR3.1 ($n=5$) en comparación con controles ($n=4$) ($39 \pm 5,4$ frente a $7,6 \pm 4,3$ % de bloqueo; medias \pm EEM, $P < 0,005$). Cuando se volvieron a entrenar sin iluminación (Luz APAGADA), los mismos ratones demostraron memoria contextual intacta ($64,6 \pm 6,6$ frente a $49,7 \pm 11,7$ % de bloqueo; $P > 0,5$). Esta memoria contextual de miedo no estuvo disponible para recuerdo tras la administración de luz durante la prueba (luz ENCENDIDA) en los ratones eNpHR3.1 ($42,6 \pm 10,1$ frente a $5,94 \pm 4,1$ % de bloqueo, $P < 0,01$). La FIG. 5C muestra que la inhibición optogenética de CA1 no tuvo efecto ni sobre la adquisición (izquierda) ni el recuerdo (derecha) de la memoria de miedo acondicionado auditivo independiente del hipocampo en ratones eNpHR3.1 ($n=5$) en comparación con controles ($n=4$). La FIG. 5D representa datos que muestran que la inhibición optogenética no tuvo efecto sobre la exploración del contexto antes del condicionamiento en ratones eNpHR3.1 ($n=5$) en comparación con controles ($n=4$). La inhibición optogenética de CA1 tampoco tuvo efecto sobre la exploración de un entorno novedoso. Las FIGS. 5E y 5F muestran que ratones de control ($n=6$) y eNpHR3.1 ($n=4$) exploraron el campo con longitudes de trayectoria similares (564 ± 9 y 618 ± 114 cm, respectivamente) y velocidades similares ($3,3 \pm 0,1$ frente a $3,43 \pm 0,6$ cm/s, respectivamente). La FIG. 5G muestra que no hubo efecto sobre la ansiedad, ya que el porcentaje de tiempo que ratones de control y eNpHR3.1 pasaron en el centro del campo abierto fue similar ($23,8 \pm 2,76$ % frente a $20,46 \pm 5,97$ %, $P > 0,5$). Se presentan trazados de exploración representativos. La FIG. 5H representa la expresión de eNpHR3.0 en amígdala basolateral (BLA). La FIG. 5I muestra que la administración de luz a BLA produjo la adquisición de memoria contextual alterada ($65,5 \pm 7,2$ frente a $9,6 \pm 5,5$ % de bloqueo; $P < 0,001$) y señalada ($69,5 \pm 9,6$ frente a $24,5 \pm 13$ % de bloqueo; $P < 0,05$) en ratones eNpHR3.0 ($n=4$), en comparación con controles ($n=9$).

Las FIGS. 6A-6E representan datos experimentales que muestran que la inhibición optogenética de CA1 interfiere reversiblemente con la recuperación de memoria de miedo remota. La FIG. 6A representa datos que indican que la inhibición optogenética de CA1 previno reversiblemente el recuerdo de la memoria remota que se adquirió 28 días antes, y que nunca fue previamente provocado ($P < 0,0001$; Control $n=14$, $69,8 \pm 5,3$ % de bloqueo en eNpHR3.1 $n=6$, $14 \pm 6,4$ % de bloqueo). Esta alteración del recuerdo fue reversible, ya que cuando los mismos ratones fueron reintroducidos al contexto de condicionamiento al día siguiente sin iluminación demostraron respuestas de miedo intactas ($52,45 \pm 6,0$ frente a $45,18 \pm 11,5$ % de bloqueo; $P > 0,5$). La FIG. 6B representa datos que muestran que el miedo acondicionado auditivo, probado 28 días después del condicionamiento, no fue afectado (Control $n=14$, $22,3 \pm 6,8$ %, eNpHR3.1 $n=6$, $11,8 \pm 3,5$ % de bloqueo en el nuevo contexto; y $72,4 \pm 8,4$ frente a $58,77 \pm 7,9$ % de bloqueo al tono; $P > 0,5$). La FIG. 6C muestra que la inhibición optogenética de CA1 alteró el recuerdo de memoria ultra-remota que se adquirió 63 días antes, y nunca fue previamente provocado ($P < 0,005$; Control $n=9$, $31,8 \pm 3,8$ % de bloqueo eNpHR3.1 $n=6$, $11,3 \pm 3,6$ % de bloqueo). La FIG. 6D representa datos que muestran que la inhibición hipocámpica farmacológica por la administración de TTX y CNQX un día después del condicionamiento previno el recuerdo de miedo reciente (solución salina $n=5$, $56,86 \pm 1,9$ % de bloqueo; TTX+CNQX $n=4$, $26,05 \pm 10,23$ % de bloqueo; $P < 0,05$). La FIG. 6E muestra que la administración de TTX y CNQX un mes después del condicionamiento no afectó el recuerdo de miedo remoto (solución salina $n=8$, $93,93 \pm 2,54$ % de bloqueo; TTX+CNQX $n=9$, $83,8 \pm 4,4$ % de bloqueo; $P > 0,05$).

Las FIGS. 7A-7C representa datos experimentales que muestran que la inhibición optogenética de CA1 precisa, pero no prolongada, bloquea el recuerdo de miedo contextual remoto. La FIG. 7A muestra que la inhibición optogenética de CA1 previene el recuerdo de miedo remoto de una memoria que se adquirió 28 días antes, solo cuando la luz se administró con precisión durante la prueba (grupo preciso, control n=4, 72,65 ± 11,5 % de bloqueo, eNpHR3.1 n=8, 26,9 ± 10,4 % de bloqueo; P<0,01), pero no cuando la luz estuvo ENCENDIDA continuamente durante 30 min antes, además de durante, la prueba (grupo prolongado, control, Control n=3, 70,13 ± 12,2 % de bloqueo, eNpHR3.1 n=4, 67,7 ± 5,6 % de bloqueo; P>0,05). Cuando los ratones del grupo prolongado volvieron a probarse al día siguiente con luz durante la prueba solo, su recuerdo se alteró (grupo prolongado, izquierda, 55,5 ± 8,5 frente a 27,6 ± 8,6 % de bloqueo; P<0,05). La FIG. 7B muestra que la luz prolongada previene el recuerdo de memoria reciente, 24 h después del condicionamiento (Control n=7, 32,2 ± 10,6 % de bloqueo, eNpHR3.1 n=3, 4 ± 2,6 % de bloqueo; P<0,05). La FIG. 7C muestra que eNpHR3.1 previno continuamente y completamente el impulso provocado durante 30 min, como se muestra en el trazado de registro. Trazados detallados de secciones 1 (aparición de inhibición) 2 (durante la inhibición continua) y 3 (fin de la inhibición y recuperación) se presentan abajo a la izquierda. Se presentan el porcentaje promediado de impulsos provocados satisfactorios antes de la luz, durante la administración de luz (después de 5 min y 30 min de luz ENCENDIDA) y recuperación después de la luz APAGADA (abajo derecha; n=4 ratones, 10 células).

La FIG. 8 representa datos experimentales que muestran que la inhibición optogenética de CA1 interfiere con el recuerdo de miedo permanente. Izquierda: Memoria de miedo remota que se adquirió 5 semanas antes y fue eficientemente recordada (Control n=8, 79,0 ± 8,9 % de bloqueo; eNpHR3.1 n=6, 67,8 ± 12,1 % de bloqueo; P>0,5) ya no estuvo disponible para recuerdo bajo la inhibición optogenética de CA1 (77,2 ± 4,3 % frente a 12,8 ± 4,4 % de bloqueo; P0,0001). Derecha: Esta alteración del recuerdo no produjo borrado de memoria, ya que cuando los mismos ratones fueron reintroducidos al contexto de condicionamiento sin iluminación demostraron otra vez respuesta de miedo intacta (61,5 ± 6,7 frente a 58,3 ± 3,5 % de bloqueo; P>0,5). Cuando la iluminación se introdujo otra vez en el centro del ensayo de prueba, después de que la memoria ya hubiera sido recordada, cesó repentinamente la respuesta de miedo (65,2 ± 6,9 frente a 15,9 ± 5,2 % de bloqueo; P0,001).

La FIG. 9A-9H representa datos experimentales que muestran el mapeo de cerebro completo de la actividad de circuitos controlada por el hipocampo durante el recuerdo remoto. La FIG. 9A representa un experimento donde los ratones fueron condicionados al miedo bajo administración de luz, y se recogieron cerebros 90 min después del entrenamiento. La FIG. 9B muestra cortes de cerebro ceñidos para c-Fos y DAPI. Se muestran la expresión de control de YFP y eNpHR3.1. La región CA1 de la que se tomaron estas imágenes está marcada por un cuadrado blanco en la FIG. 9C. La FIG. 9C representa imágenes representativas de CA1, ACC y BLA. La anatomía se muestra por tinción nuclear con DAPI, y los márgenes de la amígdala están marcados con una línea amarilla discontinua. Barra de escala blanca: 150 µm. La FIG. 9D muestra que la inhibición optogenética de CA1 durante FC redujo la expresión del marcador de activación neuronal c-Fos en CA1 (n = 2 a 4 ratones, 6 a 15 cortes por grupo; P<0,01), pero no en ACC o BLA. En BLA, los niveles de actividad fueron similarmente elevados en tanto los ratones de control como eNpHR3.1 (p<0,0001). La FIG. 9E representa un experimento donde otro grupo de ratones fue entrenado, y entonces volvieron a exponerse al contexto de condicionamiento 28 días después del condicionamiento. Se recogieron cerebros para tinción 90 min después de la prueba. La FIG. 9F representa imágenes representativas de CA1, ACC y BLA después de la memoria remota. Barra de escala blanca: 150 µm. La FIG. 9G muestra que el recuerdo remoto 28 días después del condicionamiento produjo un aumento pequeño, pero significativo, en la expresión de c-Fos en CA1 en ratones de control (P<0,005), y niveles de actividad altamente elevados en ACC (P<0,0001) y BLA (P<0,0001). La inhibición de la luz durante la exposición al contexto bloqueó completamente la actividad de CA1 (P<0,05), y redujo significativamente la actividad de ACC y BLA (P<0,0001 y P<0,0001, respectivamente), en comparación con el control. La FIG. 9H muestra patrones globales en la actividad cerebral entre el condicionamiento (día 0) y el recuerdo remoto (día 28). Los niveles de actividad en CA1 disminuyeron significativamente en los ratones de control (P<0,005) del día 0 al día 28. Los niveles de actividad en ACC aumentaron significativamente en tanto los ratones de control (P<0,0001) como eNpHR3.1 (P<0,001) del día 0 al día 28. Los niveles de actividad en BLA aumentaron significativamente en los ratones de control (P<0,001), pero no en eNpHR3.1.

La FIG. 10 representa datos experimentales que muestran que la inhibición optogenética de la corteza cingulada anterior (ACC) precisa y prolongada altera el recuerdo de memoria de miedo remota, pero no reciente. La FIG. 10A representa la expresión de eNpHR3.0 en la corteza cingulada anterior (ACC). La FIG. 10B representa un experimento donde la administración de luz precisa produjo la inhibición del recuerdo de memoria remoto (Control n=5, 81,6 ± 4,9 % de bloqueo; eNpHR3.0 n=5, 53,8 ± 11 % de bloqueo; P<0,05), pero no reciente (75,9 ± 5,4 frente a 76 ± 2,9 % de bloqueo). La FIG. 10C representa otro experimento donde luz prolongada en ACC también produjo la inhibición del recuerdo de memoria remota (Control n=3, 78,0 ± 6,2 % de bloqueo; eNpHR3.0 n=8, 15,9 ± 5,2 % de bloqueo; P<0,05), pero no reciente (78,5 ± 12,7 frente a (77,2 ± 4,3 % de bloqueo).

Descripción detallada

La presente divulgación se cree que es útil para modificar la función de la memoria temporalmente. Aplicaciones específicas de la presente invención facilitan la alteración de la recuperación de memoria y/o respuestas emocionales asociadas a la recuperación de memoria. Como muchos aspectos de las realizaciones de ejemplo

desveladas en el presente documento se refieren a y se construyen significativamente sobre desarrollos previos en este campo, la siguiente discusión resume tales desarrollos previos para proporcionar un entendimiento sólido de la base y enseñanzas subyacentes de las que podrían extraerse detalles de implementación y modificaciones. Es en este contexto que se proporciona la siguiente discusión. Aunque la presente invención no está necesariamente limitada a tales aplicaciones, pueden apreciarse diversos aspectos de la invención mediante una discusión de diversos ejemplos usando este contexto.

Se ha descubierto que la alteración (temporal) del circuito del hipocampo dorsal CA1 es eficaz para prevenir la adquisición de memoria contextual del miedo. Consistente con esto, una teoría de redes neurales actual sugiere que el proceso de consolidación de la memoria empieza con modificaciones a corto plazo en las conexiones entre el hipocampo y la corteza, que permiten que el hipocampo active los sitios corticales relevantes que contribuyen a la memoria completa, en vez de guardar la propia memoria. Aunque estos trazados corticales se co-activan repetidamente, los cambios graduales de larga duración en las conexiones entre ellos se producen hasta que con el tiempo estas conexiones son lo suficientemente fuertes como para respaldar la memoria sin participación hipocámpica.

Sorprendentemente, se ha descubierto que la alteración del circuito del hipocampo dorsal CA1 es eficaz para bloquear el recuerdo de memoria del miedo, incluso después de que se crea que ha ocurrido la reorganización cortical.

De acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación, se tratan métodos, sistemas o dispositivos que se refieren a controlar los circuitos neurales. El control con respecto al circuito neural puede incluir la inhibición o excitación, que pueden cada uno incluir el encendido coordinado, y/o la susceptibilidad modificada a las entradas de circuito externas. Por ejemplo, la inhibición puede llevarse a cabo usando una proteína activada por la luz, tal como un canal de iones y/o bomba iónica (por ejemplo, NpHR y variantes de NpHR). Tales canales de iones mueven el potencial de membrana de la neurona lejos de su voltaje umbral para disuadir o inhibir los potenciales de acción. En otro caso, la excitación puede llevarse a cabo usando una proteína activada por la luz, tal como un canal de iones (por ejemplo, ChR2 y variantes de ChR2). Tales canales de iones pueden hacer que el potencial de membrana se mueva hacia y/o pase el voltaje umbral, excitando o fomentando así potenciales de acción. De acuerdo con diversas realizaciones, puede usarse una proteína activada por la luz para desplazar (temporalmente) el potencial en reposo de una neurona para aumentar o disminuir su susceptibilidad a las entradas de circuitos externos. Estas diversas opciones también pueden usarse en combinación.

Los dispositivos y métodos proporcionados en el presente documento pueden afectar reversiblemente la función de la memoria. Por ejemplo, los métodos descritos a continuación pueden usarse para controlar y/o caracterizar los circuitos neurales que subyacen a la memoria a largo plazo y corto plazo, además de diversos tipos de memorias, que incluyen memorias de miedo o estresantes. Los métodos pueden también afectar a diversas etapas de la función de la memoria (por ejemplo, adquisición, consolidación y recuerdo de memoria). En algunas variaciones para afectar la función de la memoria (por ejemplo, tal como la formación y/o recuperación de memoria), la función de la memoria se afecta aplicando luz a neuronas de la región del hipocampo dorsal CA1, en la amígdala basolateral (BLA) y/o en la corteza cingulada anterior (ACC) que expresan proteínas activadas por la luz. En presencia de luz, estas proteínas activadas por la luz pueden inhibir la despolarización de las neuronas, alterando así la formación y/o recuperación de memorias. Aunque se describen métodos a modo de ejemplo en el contexto de la adquisición y recuerdo de memorias contextuales basadas en el miedo remotas y recientes, debe entenderse que los dispositivos y métodos desvelados en el presente documento pueden usarse para afectar otras etapas de la función de la memoria, además de otros tipos de memorias (por ejemplo, memorias señaladas).

Diversas realizaciones descritas en el presente documento y mostradas en las figuras pueden implementarse juntas y/o en otras maneras. Uno o más de los puntos representados en los dibujos/figuras también pueden implementarse en una manera más separada o integrada, o eliminarse y/o convertirse en inoperables en ciertos casos, como es útil según aplicaciones particulares. Por ejemplo, pueden implementarse realizaciones que implican los tratamientos para PTSD como se trata en el presente documento usando liberación de fármaco temporalmente controlada. En vista de la descripción en el presente documento, aquellos expertos en la materia reconocerán que pueden hacerse muchos cambios al mismo.

Expresión de proteínas activadas por la luz en células diana

La actividad de una neurona (por ejemplo, neuronas implicadas en la función de la memoria) puede afectarse usando varios mecanismos. Pueden usarse métodos deterministas para afectar la actividad neuronal para controlar y/o caracterizar los circuitos neurales que subyacen a diversas funciones del cerebro. Por ejemplo, pueden afectarse respuestas neuronales aplicando agentes farmacológicos (por ejemplo, tetrodotoxina (TTX), 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona (CNQX), picrotoxina, estrichnina, etc.) y/o por estimulación eléctrica (por ejemplo, electrodos). En algunas variaciones, la actividad neuronal puede afectarse activando ciertos tipos de proteínas sobre la membrana de la neurona, que puede hiperpolarizar o despolarizar la membrana celular. Por ejemplo, proteínas activadas por la luz que llegan a ser permeables a ciertos iones (por ejemplo, cationes, aniones) en presencia de luz con una cierta longitud de onda pueden expresarse en una neurona. Ejemplos de proteínas activadas por la luz

pueden incluir canales y/o bombas de iones activados por la luz, que se describen adicionalmente más adelante.

En algunas variaciones, pueden adaptarse genes opsina microbianos para sus usos en neurociencia. Estas opsinas permiten la transducción de trenes de pulsos de luz en cambios de potencial en la membrana en la escala de milisegundos en tipos de células específicos dentro del cerebro de mamífero intacto (por ejemplo, canalrodopsina (ChR2), canalrodopsina *Volvox* (VChR1) y halorodopsina (NpHR)). ChR2 es una rodopsina derivada del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. El término "rodopsina", como se usa en el presente documento, es una proteína que comprende al menos dos elementos estructurales, una proteína opsina, y un cofactor covalentemente unido, normalmente retinal (retinaldehído). La rodopsina ChR2 se deriva de la opsina canalopsina-2 (Chop2), originalmente llamada clamiopsina-4 (Cop4) en el genoma de *Chlamydomonas*. Las propiedades temporales de una canalrodopsina despolarizante, ChR2, incluyen rápida cinética de activación y desactivación, proporcionando la generación de trenes de potenciales de acción controlados con precisión. Para aplicaciones que buscan la activación de larga escala de tiempo, se ha descubierto que puede ralentizarse la cinética de disociación normalmente rápida de las canalrodopsinas. Por ejemplo, ciertas implementaciones de canalrodopsinas aplican 1 mW/mm² de luz durante prácticamente todo el tiempo en el que se desea la despolarización, que puede ser inferior a la deseable.

Proteínas activadas por la luz que generan hiperpolarización o inhiben la despolarización de la membrana en respuesta a luz con cierta(s) longitud(es) de onda puede(n) expresarse en las neuronas excitadoras (por ejemplo, neuronas glutamatérgicas) de la región CA1 dorsal del hipocampo (CA1), regiones de la amígdala basolateral (BLA) y de la corteza cingulada anterior (ACC). La Tabla 1 a continuación muestra diversos ejemplos de proteínas activadas por la luz que pueden expresarse en las neuronas excitadoras para inhibir la despolarización o hiperpolarizar las neuronas en presencia de luz de una cierta longitud de onda. Descripción adicional de estas y otras proteínas activadas por la luz puede encontrarse en la solicitud PCT N.º PCT/US11/028893, titulada "LIGHT SENSITIVE ION PASSING MOLECULES", presentada el 17 de marzo de 2011. Como se usa en el presente documento, "NpHR", "BR", "AR" y "GtR3" incluyen proteínas naturales y variantes funcionales (que incluyen variantes que existen de forma natural).

Tabla 1

Proteínas activadas por la luz	Origen biológico	Sensibilidad de longitud de onda	Acción definida
NpHR	<i>Natronomonas pharaonis</i>	680 nm de utilidad (con serie 3.0) 589 nm máx	Inhibición (hiperpolarización)
BR	<i>Halobacterium helobium</i>	570 nm máx	Inhibición (hiperpolarización)
AR	<i>Acetabularia acetabulum</i>	518 nm máx	Inhibición (hiperpolarización)
GtR3	<i>Guillardia theta</i>	472 nm máx	Inhibición (hiperpolarización)

Realizaciones de la presente divulgación incluyen variantes de aminoácido relativamente menores de las secuencias que existen de forma natural. En un caso, las variantes son mayores que aproximadamente el 75 % homólogas a la secuencia de proteínas de las secuencias que existen de forma natural. En otras variantes, la homología es superior a aproximadamente el 80 %. Aún otras variantes tienen homología superior a aproximadamente el 85 %, superior al 90 %, o incluso de hasta aproximadamente el 93 % a aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 98 %. Homología en este contexto significa similitud de secuencias o identidad, prefiriéndose identidad. Esta homología puede determinarse usando técnicas convencionales conocidas en el campo del análisis de secuencias. Las composiciones de realizaciones de la presente divulgación incluyen las secuencias de proteína y ácidos nucleicos proporcionadas en el presente documento, que incluyen variantes que son superiores a aproximadamente el 50 % homólogas a la secuencia proporcionada, superiores a aproximadamente el 55 % homólogas a la secuencia proporcionada, superiores a aproximadamente el 60 % homólogas a la secuencia proporcionada, superiores a aproximadamente el 65 % homólogas a la secuencia proporcionada, superiores a aproximadamente el 70 % homólogas a la secuencia proporcionada, superiores a aproximadamente el 75 % homólogas a la secuencia proporcionada, superiores a aproximadamente el 80 % homólogas a la secuencia proporcionada, superiores a aproximadamente el 85 % homólogas a la secuencia proporcionada, superiores a aproximadamente el 90 % homólogas a la secuencia proporcionada, o superiores a aproximadamente el 95 % homólogas a la secuencia proporcionada.

En el presente documento se proporciona animales no humanos que comprenden una proteína activada por la luz expresada sobre la membrana celular de neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo, corteza cingulada anterior y/o amígdala basolateral del animal, en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, en el que la iluminación de la proteína afecta reversiblemente la función de la memoria. En algunas realizaciones, la proteína activada por la luz está seleccionada del grupo que consiste en NpHR, BR, AR y GtR3 descritas en el presente documento. Por ejemplo, cualquiera de las proteínas NpHR descritas en el presente documento puede expresarse sobre la

membrana celular de las neuronas diana.

También en el presente documento se proporcionan cortes de tejido cerebral que comprenden una región del cerebro seleccionada del grupo que consiste en el campo CA1 dorsal del hipocampo, la amígdala basolateral y la corteza cingulada anterior, en el que una proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de neuronas excitadoras de la región del cerebro, en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, en el que la iluminación de la proteína afecta reversiblemente la función de la memoria. En algunas realizaciones, los cortes de tejido cerebral son cortes de tejido cultivados tomados de los animales no humanos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la proteína activada por la luz está seleccionada del grupo que consiste en NpHR, BR, AR y GtR3 descrito en el presente documento. Por ejemplo, cualquiera de las proteínas NpHR descritas en el presente documento puede expresarse sobre la membrana celular de las neuronas diana.

En algunas realizaciones, neuronas de las regiones CA1, BLA y/o ACC pueden expresar ChR2. A menos que se establezca de otro modo, la divulgación incluye varias variantes similares. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, Chop2, ChR2-310, Chop2-310 y canalrodopsina Volvox (VChR1). Para más detalles sobre VChR1, puede hacerse referencia a "Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*", Nat Neurosci. June 2008, 11(6):631-3. Epub 2008 Apr. 23. En otras implementaciones, pueden hacerse modificaciones similares a otras moléculas de opsina o activadas por la luz. Por ejemplo, pueden hacerse modificaciones/mutaciones a ChR2 o variantes de VChR1. Además, las variantes modificadas pueden usarse en combinación con bombas de iones activadas por la luz.

Como se usa en el presente documento, la estimulación de una célula diana se usa generalmente para describir la modificación de propiedades de la célula. Por ejemplo, el estímulo de una célula diana puede producir un cambio en las propiedades de la membrana celular que puede conducir a la despolarización o polarización de la célula diana. En un caso particular, la célula diana es una neurona y el estímulo puede afectar la transmisión de impulsos facilitando o inhibiendo la generación de impulsos (potenciales de acción) por la neurona.

Para más detalles sobre proteínas activadas por la luz (por ejemplo, opsinas), puede hacerse referencia a la publicación PCT WO 2010/056970, titulada "OPTICALLY-BASED STIMULATION OF TARGET CELLS AND MODIFICATIONS THERETO," a Deisseroth et al.

Realizaciones de la presente divulgación se refieren a la implementación de cambios biestables en la excitabilidad de poblaciones elegidas como diana. Esto incluye, pero no está necesariamente limitado a, el mutante doble ChR2-C128S/D156A. Se ha encontrado que este mutante doble ChR2-C128S/D156A es bien tolerado en neuronas hipocámpicas cultivadas y preserva las propiedades de SFO esenciales de activación de tipo etapa rápida con pulsos breves individuales de luz azul, y desactivación con luz verde o amarilla. En particular, el espectro de activación de ChR2-C128S/D156A alcanza el máximo a 445 nm. Se encontró un segundo pico de desactivación a 390-400 nm, con desactivación más rápida, pero menos completa, en comparación con el pico de desactivación a 590 nm. Se encontró que las fotocorrientes de pico en células que expresan ChR2-C128S/D156A eran robustas y comparables con aquellas de ChR2-D156A ($231,08 \pm 31,19$ e.e.m.; n=9 células y $320,96 \pm 78,26$ e.e.m.; n=7 células, respectivamente).

A continuación se activaron neuronas individuales transfectadas y de pinzamiento zonal de membrana con pulsos de 100 ms de luz de 470 nm. Para garantizar durante registros muy largos que la disminución de corriente no sería atribuible a la reducción de células, cada célula se desactivó con pulsos de luz prolongados de 590 nm a distintos intervalos para determinar la magnitud de la corriente de SFO restante en cada momento de tiempo. Sorprendentemente, neuronas que expresan ChR2-C128S/D156A dieron lugar a fotocorrientes sostenidas que fueron más estables que aquellas de células que expresan cualquier mutante individual solo. El ajustar una curva de descomposición monoexponencial a la relación de Idesactivación / Iactivación con el tiempo reveló una constante de tiempo de descomposición espontánea de 29,3 minutos para ChR2-C128S/D156A, que indica que las mutaciones C128 y D156 actúan sinérgicamente para retardar la descomposición del estado abierto de ChR2. De acuerdo con la mejora requerida para la aplicación anticipada a comportamientos de mamífero complejos, todavía estuvieron presentes porciones significativas de la corriente de SFO de mutante doble hasta 20 minutos después del pulso de fotoactivación individual.

Basándose en esta cinética de descomposición sorprendentemente lenta, el gen de mutante doble se denomina gen SSFO (de opsina de función de etapa estabilizada). SSFO también se usa como clave para la proteína activa. Ambos restos probablemente participan en el cierre de los canales de ChR2 (modulación), y ambas mutaciones probablemente estabilizan la configuración de estado abierto del canal

Sin estar limitados por teoría, aspectos de la presente divulgación se refieren al descubrimiento de que SSFO puede ser completamente bloqueado en la progresión del fotociclo, y puede, por tanto, representar la máxima estabilidad posible con ingeniería de fotociclos. Por ejemplo, a diferencia de ChR2 C128X y ChR2-D156A, el fotociclo de SSFO no parece acceder a productos secundarios desprotonados inactivos adicionales que probablemente rompen el fotociclo en etapas del fotociclo posteriores no alcanzadas en este mutante, haciendo a su vez el SSFO incluso más

fiable para uso repetido *in vivo* que las mutaciones individuales parentales.

Realizaciones de la presente divulgación se refieren a la sensibilidad de SSFO a la luz. Por ejemplo, las canalrodopsinas con constantes de descomposición lentas actúan eficazmente de integradores de fotones. Esto puede ser particularmente útil para enfoques más sensibles menos invasivos a la modulación de circuitos optogenéticos, todavía con acción fácilmente valorable sobre la población neuronal diana mediante la modulación de la longitud de pulsos de luz. Se ha descubierto que, incluso a intensidad de la luz extraordinariamente baja (de tan solo $8 \mu\text{W mm}^{-2}$), podrían obtenerse cientos de picoamperios de fotocorrientes de célula completa de neuronas que expresan SSFO, que aumentaron con la cinética monoexponencial en respuesta a luz de 470 nm durante el tiempo de iluminación entero. Otros aspectos se refieren al uso de constantes de tiempo de activación que se correlacionan linealmente con la potencia de luz de activación en una escala log-log, que es indicativa de una relación de la ley de la potencia y que sugiere que SSFO es un integrante puro, con exposición fotónica total con el tiempo como el único determinante de la fotocorriente. Por ejemplo, se cree que el número de fotones por área membrana requeridos para que las fotocorrientes alcancen una activación inferior a la máxima dada (tiempo a τ) es independientemente constante de la potencia de luz de activación.

Ejemplo realizaciones de la presente divulgación se refieren al uso de una quimera híbrida de ChRI/VChRI, que no contiene secuencia de ChR2 en absoluto y deriva de dos genes opsinas que no se expresan bien individualmente, y se denomina en el presente documento C1V1. Realizaciones de la presente divulgación también se refieren a mejoras de la membrana que se dirigen a VChR1 mediante la adición de una señal de tráfico de membrana derivada del canal $K_{ir}2.1$. Imágenes confocales de neuronas cultivadas que expresan VChR1-EYFP revelaron una gran proporción de proteína intracelular en comparación con ChR2; por tanto, para mejorar la membrana que se dirige a VChR1, los presentes inventores añadieron una señal de tráfico de membrana derivada del canal Kir2.1. La membrana que se dirige a este VChR1-ts-EYFP fue ligeramente potenciada en comparación con VChR1-EYFP; sin embargo, las fotocorrientes medias registradas de neuronas hipocámpicas cultivadas que expresan VChR1-ts-EYFP fueron solo ligeramente mayores que aquellas de VChR1-EYFP. Por consiguiente, realizaciones de la presente divulgación se refieren a VChR1 que se modifica intercambiando hélices con hélices correspondientes de otras ChR. Por ejemplo, se ha descubierto una fuerte mejora en dos quimeras donde las hélices 1 y 2 se sustituyeron con los segmentos homólogos de ChR1. Se descubrió que si los sitios de corte y empalme estuvieran en el bucle intracelular entre las hélices 2 y 3 (en el resto de ChR1 Ala145) o dentro de la hélice 3 (en el resto de ChR1 Trp163), las quimeras resultantes serían ambas robustamente expresadas y mostrarían fotocorriente similarmente potenciada y propiedades espectrales. Este resultado fue inesperado ya que ChR1 se expresa solo débilmente y se integra poco en membranas de la mayoría de las células hospedadoras de mamífero. La quimera híbrida ChR1/VChR1 resultante se denomina en el presente documento C1V1.

Aspectos de la presente divulgación se refieren a la expresión de C1V1 en neuronas cultivadas (por ejemplo, neuronas hipocámpicas). Pruebas experimentales han mostrado varios resultados sorprendentes y útiles, que se tratan en más detalle en lo sucesivo. C1V1-EYFP presenta fluorescencia promedio sorprendentemente mejorada en comparación con VChR1-EYFP. Fotocorrientes de células completas en neuronas que expresan C1V1 fueron mucho más grandes que aquellas de VChRI-EYFP y VChR1-ts-EYFP, y la selectividad iónica fue similar a la de ChR2 y VChR1. La adición de la señal de tráfico de Kir2.1 entre C1V1 y YFP potenció adicionalmente las fotocorrientes un 41 % adicional (fotocorrientes medias de C1V1-ts-EYFP fueron extremadamente grandes, casi diez veces superiores a VChR1 no mutado (WT)). Los niveles de fluorescencia media se correspondieron estrechamente con las fotocorrientes medidas (fluorescencia media $33,32 \pm 33,32 \pm 33,32 \pm 2,8$ y $33,32 \pm 3,8$ para VChR1-EYFP, VChR1-ts-EYFP, C1V1-EYFP y C1V1-ts-EYFP, respectivamente), sugiriendo que el aumento en los tamaños de fotocorrientes resultó principalmente de la expresión mejorada de estos canales en neuronas de mamífero. La fluorescencia somática total (medida como la densidad integrada de píxeles) se correlacionó linealmente con el tamaño de fotocorriente en células grabadas/copiadas individuales a través de las diferentes construcciones (VChR1, VChR1-ts-EYFP, C1V1, C1V1-ts-EYFP). Esto sugiere (sin estar limitado por la teoría) que el aumento de la fotocorriente de C1V1 resulta de los cambios de expresión funcional en neuronas.

Diversas realizaciones de la presente divulgación se refieren a opsinas o proteínas activadas por la luz con rápidas constantes de descomposición. Esta propiedad puede ser particularmente útil para proporcionar control preciso del impulso, por ejemplo, con el fin de interferir mínimamente con conductancias intrínsecas, desencadenar impulsos individuales por pulso de luz y/o minimizar los potenciales de meseta durante los trenes de pulsos de luz. Resultados experimentales sugieren que las fotocorrientes provocadas por la luz registradas en C1V1-ts-EYFP se descompusieron con una constante de tiempo similar a la de VChR1. Aspectos de la presente divulgación se refieren, por tanto, a modificaciones en la región de cromóforo para mejorar la cinética del fotociclo, inactivación reducida y/o posible absorción desplazada al rojo adicional.

Una realización se refiere a una mutación de ChETA correspondiente, E162T, cuyos experimentos sugieren que proporciona un fotociclo acelerado (por ejemplo, casi 3 veces) (puede hacerse referencia a Gunaydin, et al., Ultrafast optogenetic control, Nat Neurosci, 2010). Sorprendentemente, se mostró que esta mutación desplazaba el espectro de acción hipsocrómico a 530 nm, mientras que mutaciones análogas en ChR2 u otras rodopsinas microbianas han causado un desplazamiento al rojo.

Otra realización se dirige hacia una mutación de glutamato-122 a treonina (C1V1-E122T). Pruebas experimentales mostraron que C1V1-E122T se inactiva solo el 26 % en comparación con el 46 % de inactivación de ChR2; además, el espectro se desplazó además al rojo a 546 nm.

5 Otra realización de la presente divulgación se dirige hacia un mutante doble de C1V1 que incluye tanto mutaciones E122T como E162T. Pruebas experimentales han mostrado que la inactivación de la corriente fue incluso más baja que en el mutante E122T y el fotociclo fue más rápido en comparación con E162T. Esto sugiere que se conservaron múltiples propiedades útiles de las mutaciones individuales juntas en el mutante doble.

10 **Polinucleótidos que codifica proteínas activadas por la luz**

Pueden administrarse proteínas activadas por la luz u opsinas descritas en el presente documento en neuronas por métodos conocidos en la técnica, tales como por un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica las proteínas. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende un casete de expresión. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un vector, tal como un vector viral seleccionado del grupo que consiste en un vector de AAV, un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector de VHS y un vector lentiviral.

Por ejemplo, pueden ponerse en contacto neuronas con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína activada por la luz operativamente unida a un promotor específico de célula, en el que dichas neuronas expresan la proteína activada por la luz sobre la membrana celular. En algunas variaciones, el promotor específico de célula es un promotor de proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina Ha (CaMKIIa). En algunas variaciones, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica luz activable eNpHR3.1 o eNpHR3.0 está operativamente unida a un promotor de CaMKIIa en el vector. En algunas variaciones, la proteína activada por la luz se expresa en neurona glutamatérgica excitadora en la región CA1, BLA y/o ACC. Puede usarse cualquier vector que pueda usarse para administración génica. En algunas variaciones, puede usarse un vector viral (tal como AAV, adenovirus, lentivirus, un retrovirus).

En algunas realizaciones, el vector es un vector de AAV recombinante. Vectores de AAV son virus de ADN de tamaño relativamente pequeño que pueden integrar, en una forma estable y específica de sitio, el genoma de las células que infectan. Son capaces de infectar un amplio espectro de células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento celular, morfología o diferenciación, y no parecen estar implicados en las patologías humanas. El genoma de AAV ha sido clonado, secuenciado y caracterizado. Engloba aproximadamente 4700 bases y contiene una región de repetición terminal invertida (ITR) de aproximadamente 145 bases en cada extremo, que sirve de origen de replicación para el virus. El resto del genoma se divide en dos regiones esenciales que llevan las funciones de encapsidación: la parte izquierda del genoma, que contiene el gen rep implicado en la replicación viral y la expresión de los genes virales; y la parte derecha del genoma, que contiene el gen cap que codifica las proteínas de la cápside del virus.

Pueden prepararse vectores de AAV usando métodos convencionales en la materia. Son adecuados virus adeno-asociados de cualquier serotipo (véase, por ejemplo, Blacklow, pp. 165-174 de "Parvoviruses and Human Disease" J. R. Pattison, ed. (1988); Rose, Comprehensive Virology 3:1, 1974; P. Tattersall "The Evolution of Parvovirus Taxonomy" In Parvoviruses (JR Kerr, SF Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p5-14, Hudder Arnold, London, UK (2006); y DE Bowles, JE Rabinowitz, RJ Samulski "The Genus Dependovirus" (JR Kerr, SF Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) pa15-23, Hudder Arnold, London, UK (2006). Métodos de purificación de vectores pueden encontrarse en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6566118, 6989264 y 6995006 y el documento WO/1999/011764 titulado "Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors". La preparación de vectores híbridos se describe en, por ejemplo, la solicitud PCT N.º PCT/US2005/027091. Se ha descrito el uso de vectores derivados de los AAV para la transferencia de genes *in vitro* e *in vivo* (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional N.º: 91/18088 y WO 93/09239; las patentes de EE.UU. N.º: 4.797.368, 6.596.535 y 5.139.941; y la patente europea N.º: 0488528). Estas publicaciones describen diversas construcciones derivadas de AAV en las que los genes rep y/o cap están delecionados y sustituidos por un gen de interés, y el uso de estas construcciones para transferir el gen de interés *in vitro* (en células cultivadas) o *in vivo* (directamente en un organismo). Los AAV recombinantes defectuosos en la replicación según la divulgación pueden prepararse co-transfectando un plásmido que contiene la secuencia de ácidos nucleicos de interés flanqueada por dos regiones de repetición terminal invertida (ITR) de AAV y un plásmido que lleva los genes de encapsidación de AAV (genes *rep* y *cap*), en una línea celular que se infecta con un virus auxiliar humano (por ejemplo, un adenovirus). Los recombinantes de AAV que se producen se purifican entonces por técnicas convencionales.

En algunas realizaciones, el (los) vector(es) para su uso en los métodos de la divulgación se encapsidan en una partícula de virus (por ejemplo, partícula de virus AAV que incluye, pero no se limita a, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV 12, AAV 13, AAV 14, AAV 15 y AAV 16). Por consiguiente, la divulgación incluye una partícula de virus recombinante (recombinante debido a que contiene un polinucleótido recombinante) que comprende cualquiera de los vectores descritos en el presente documento. Métodos de producción de tales partículas son conocidos en la técnica y se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.596.535.

Para las células de animales descritas en el presente documento, se entiende que uno o más vectores pueden administrarse a células neurales, células de corazón, o células madre. Si se usa más de un vector, se entiende que pueden administrarse a la misma vez o en momentos diferentes a las células de animales.

5 Por ejemplo, en algunas variaciones, se llevaron a cabo genes de opsina C1V1 en neuronas generando vectores lentivirales que codifican C1V1-ts-EYFP y diversas combinaciones de mutaciones puntuales tratadas en el presente documento. Las opsinas se expresaron entonces en neuronas hipocámpicas cultivadas y se registraron las fotocorrientes de células completas en condiciones de estimulación idénticas (pulsos de 2 ms, luz a 542 nm, 5,5 mW/mm²). Fotocorrientes en células que expresan C1V1, C1V1-E162T y C1V1-E122T/E162T fueron todas robustas y tuvieron una mayor tendencia que las fotocorrientes de ChR2-H134R. Los experimentos también incluyeron una comparación de fluorescencia de YFP somática integrada y fotocorrientes de células que expresan C1V1-E122T/E162T y de células que expresan ChR2-H134R. Sorprendentemente, células C1V1-E122T/E162T mostraron fotocorrientes más fuertes que células ChR2-H134R a niveles de fluorescencia equivalentes. Esto sugiere que C1V1 podría poseer una conductancia unitaria más alta en comparación con ChR2-H134R. Los resultados de pruebas sugieren que la cinética de C1V1-E122T fue más lenta que la de C1V1-E122T/E162T y esas células que expresan C1V1-E122T respondieron más fuertemente a la luz roja (630 nm) que las células que expresan el mutante doble. Esto puede ser particularmente útil para generar impulsos optogenéticos en respuesta a luz roja.

20 De acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación, neuronas inhibitoras y/o excitadoras que residen dentro del mismo microcircuito van a ser elegidas como diana con la introducción de diversas proteínas activadas por la luz (por ejemplo, opsinas). Se realizaron pruebas experimentales por C1V1-E122T/E162T y ChR2-H134R expresados por separado bajo el promotor de CaMKIIa en neuronas hipocámpicas cultivadas. Células que expresan C1V1-E122T/E162T dieron impulsos en respuesta a pulsos de luz verde de 2 ms (560 nm) pero no a pulsos de luz violeta (405 nm). A diferencia, células que expresan ChR2-H134R dieron impulsos en respuesta a pulsos de luz a 405 nm de 2 ms, pero no a pulsos de luz de 561 nm de 2 ms.

30 Diversas realizaciones de la presente divulgación se refieren a la activación independiente de dos poblaciones neuronales dentro de cortes de cerebro vivo. Se realizaron pruebas experimentales por CaMKIIa-C1V1-E122T/E162Ts-eYFP y EF1a-DIO-ChR2-H134R-EYFP en mPFC de 20 ratones PV::Cre. En células PYR que no expresan, pulsos de luz de 405 nm desencadenaron las corrientes posinápticas inhibitoras robustas y rápidas (IPSC) debido a la activación directa de células PV, mientras que pulsos de luz a 561 nm solo desencadenaron las IPSC polisinápticas de larga latencia esperadas de la conducción de células piramidales que expresan C1V1 de neuronas inhibitoras locales.

35 **Activación por luz de proteínas expresadas en neuronas**

Puede usarse cualquier dispositivo que sea capaz de aplicar luz que tenga una longitud de onda para activar las proteínas activadas por la luz expresadas en una neurona para despolarizar y/o hiperpolarizar la neurona. Por ejemplo, puede usarse un dispositivo de administración de luz (100) para activar canales de iones y/o bombas iónicas para afectar el voltaje de membrana de una o más neuronas representadas en la FIG. 1. Como se muestra aquí, el dispositivo de administración de luz (100) está configurado para proporcionar estímulo óptico a una región diana del cerebro. El dispositivo de administración de luz (100) puede comprender una base (102), una guía de cánula (104) que está unida a la base, y uno o más conductos ópticos (106) unidos a la base mediante la guía de cánula. La base (102) puede comprender uno o más puertos de administración de luz (108) que están situados para administrar luz desde los conductos ópticos (106) a regiones de tejido elegidas como diana (101), tal como la región CA1 (103). Los conductos ópticos (106) pueden ser fibras ópticas, donde el extremo proximal de la fibra está unido a una fuente de luz óptica (no mostrada), y el extremo distal está en comunicación con los puertos de administración de luz (108). La fuente de luz óptica puede ser capaz de proporcionar luz continua y/o luz pulsada, y puede ser programable para proporcionar luz en secuencias de pulsos predeterminadas. El dispositivo de administración de luz (100) puede tener cualquier número de conductos ópticos (106) según pueda ser deseable, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, etc. Los conductos ópticos (106) pueden cada uno llevar luz de las mismas longitudes de onda o diferentes. La luz administrada puede tener una longitud de onda entre 450 nm y 600 nm, tal como luz amarilla o verde. El dispositivo de administración de luz (100) puede tener cualquier número de puertos de administración de luz (108) como puede ser deseable, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, etc. En algunas variaciones, puede ser el mismo número de puertos de administración de luz que los conductos ópticos mientras que en otras variaciones puede haber diferente número de conductos ópticos y puertos de administración de luz. Por ejemplo, puede ser un único conducto óptico que transporta la luz a dos o más puertos de administración de luz. Alternativamente o adicionalmente, un único conducto óptico puede conectar un único puerto de administración de luz. La guía de cánula (104) puede configurarse para ayudar a asegurar y alinear los conductos ópticos (106) con los puertos de administración de luz (108). En algunas realizaciones, el dispositivo de administración de luz (100) está configurado para administrar luz bilateral a la región CA1 (103) para afectar la formación y recuperación de memorias. Los dispositivos de administración de luz también pueden comprender uno o más electrodos de medición que pueden configurarse para medir actividad neural. Por ejemplo, los electrodos de medición pueden registrar cambios en el potencial de membrana (por ejemplo, potenciales de acción) y/o flujo de corriente a través de una membrana de una o más neuronas a medida que las neuronas responden a un estímulo. En algunas variaciones, los electrodos de medición pueden medir la respuesta eléctrica de una o más neuronas a la estimulación óptica. Los electrodos de

medición pueden ser electrodos extracelulares o intracelulares.

Métodos de afectación de la función de la memoria

5 Como se describe en el presente documento, las regiones de tejido diana (101) pueden incluir tejido neural con células que tienen proteínas activadas por la luz diseñadas para modificar el voltaje de membrana de las células en respuesta a luz. En algunas variaciones, pueden usarse proteínas activadas por la luz para alterar la formación y/o recuperación de memorias inhibiendo la despolarización de las neuronas en las regiones CA1, BLA y ACC del cerebro. Realizaciones de la presente divulgación se refieren a alterar la adquisición de memoria, recuerdo y/o asociaciones entre respuestas de memoria y emocionales, tales como el miedo. En una realización particular, la función de un circuito neural implicado en la memoria se altera por la activación de canales de iones activados por la luz (por ejemplo, usando NpHR, BR, AR, etc.) y/o bombas (por ejemplo, una bomba de protones GtR3). En ciertas implementaciones, esta alteración puede implementarse durante la formación de memoria. En otras implementaciones, esta alteración puede implementarse antes o durante la recuperación de la memoria. Esto puede ser particularmente útil para trastornos psiquiátricos o neurológicos que implican el recuerdo de memoria, tal como PTSD. De acuerdo con ciertas realizaciones, la alteración puede ser desencadenada en respuesta a un evento desencadenador de la memoria u otro estímulo externo que se presenta y/o controla para la alteración. Por ejemplo, la alteración puede proporcionarse en respuesta a un desencadenante para una memoria a un individuo condicionado a responder al desencadenante. En otro caso, un individuo puede desencadenar activamente la alteración. Por ejemplo, un individuo puede desencadenar la alteración cuando experimenta una memoria asociada a PTSD. Otras realizaciones de la presente divulgación se refieren a fomentar la adquisición de memoria, recuerdo y/o asociaciones entre respuestas de memoria y emocionales. Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para determinar la función de neurona(s) y/o circuitos neuronales en la función de la memoria, y/o para tratar trastornos asociados al deterioro de la memoria.

25 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para afectar reversiblemente la recuperación o formación de memoria en un individuo comprenden administrar un polinucleótido que codifica una proteína activada por la luz al campo CA1 dorsal del hipocampo, corteza cingulada anterior o amígdala basolateral en el individuo en el que la proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo, corteza cingulada anterior o amígdala basolateral, y la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, por lo que activar la proteína por la luz afecta reversiblemente la recuperación o formación de memoria de un evento en el individuo. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para afectar reversiblemente la recuperación o formación de memoria en un individuo comprenden inhibir la despolarización de neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo, corteza cingulada anterior o amígdala basolateral durante la recuperación o formación de memoria de un evento en un individuo, en el que una proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo, corteza cingulada anterior o amígdala basolateral del individuo en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz. En algunas realizaciones, el evento es un evento de miedo.

45 En el presente documento se proporciona métodos de tratamiento del trastorno de estrés postraumático en un individuo que comprende: administrar un polinucleótido que codifica una proteína activada por la luz al campo CA1 dorsal del hipocampo, corteza cingulada anterior o amígdala basolateral en el individuo en el que la proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo, corteza cingulada anterior o amígdala basolateral, y la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, por lo que activar la proteína por la luz afecta reversiblemente la recuperación o formación de memoria de un evento en el individuo.

50 En el presente documento se proporciona métodos de cribado de un agente farmacológico que afecta la recuperación o formación de memoria que comprende: a) poner en contacto neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo, corteza cingulada anterior o amígdala basolateral durante la recuperación o formación de memoria de un evento en un animal no humano con un agente farmacológico, en el que el animal no humano comprende una proteína activada por la luz expresada sobre la membrana celular de neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo, corteza cingulada anterior o amígdala basolateral del animal, en el que la proteína es sensible a la luz y es capaz de inhibir la despolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz; b) inhibir la despolarización de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo, corteza cingulada anterior o amígdala basolateral durante la recuperación o formación de memoria de un evento; y c) determinar si el agente farmacológico afecta la recuperación o formación de memoria en presencia o ausencia de la luz.

65 Como se usa en el presente documento, un "individuo" es un mamífero que incluye un ser humano. Mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja, animales para deportes, mascotas, primates, ratones y ratas. Individuos también incluyen animales de compañía que incluyen, pero no se limitan a, perros y gatos. En un aspecto, un individuo es un ser humano. En otro aspecto, un individuo es un animal no humano. Como se usa en el presente documento, "animales no humanos" incluyen mamíferos no humanos.

Un ejemplo de un método de control o modificación de la función de la memoria de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación se representa en la FIG. 2. Un evento desencadenante temporal (202) proporciona un punto de referencia para implementar el control con respecto a la función de la memoria. Como se trata en el presente documento, la naturaleza temporal del control puede ser particularmente útil. Aunque no se limita a esto, el evento desencadenante de la memoria (202) puede unirse a un evento de entrenamiento. Por ejemplo, un individuo (por ejemplo, animales no humanos, mamíferos, seres humanos) puede ser introducido a un estímulo diseñado para entrenar al individuo a responder a un estímulo particular. El evento desencadenante de la memoria (202) podría ser la introducción del estímulo particular al individuo. En otro caso, el evento desencadenante de la memoria podría ser en respuesta a una respuesta o acción del individuo (por ejemplo, una indicación de que el individuo está experimentando un evento de PTSD). Las instrucciones de control (204) determinan cómo la fuente de estímulos (206) aplica un estímulo (208) a una población de células (210). Estas instrucciones de control pueden determinarse y aplicarse en función de una diana deseada. La diana deseada puede definirse por, por ejemplo, uno o más de atributos temporales, localización espacial y/o tipo de célula. El estímulo (208) produce la modificación de la función de la memoria (212). El efecto del estímulo puede entonces monitorizarse, observarse y/o evaluarse (214). La monitorización puede usarse para ajustar (216) las instrucciones de control (204), ajustando así el estímulo para el resultado previsto. Diversas realizaciones tratadas en el presente documento proporcionan ejemplos adicionales que pueden usarse a propósito de (o además de) un proceso tal para controlar y caracterizar los circuitos neurales que subyacen a la función de la memoria.

20 Afectación de la recuperación de memoria inhibiendo las neuronas de CA1 y ACC

Una variación de un método para alterar la recuperación de memoria puede comprender inhibir las neuronas excitadoras de la región CA1 (por ejemplo, bloqueando o reduciendo la despolarización de la membrana, y/o promoviendo la hiperpolarización de la membrana). Canales de iones activados por la luz, tales como eNpHR3.1 o NpHR3.0, pueden expresarse en neuronas localizadas en la región CA1 de un individuo administrando un polinucleótido que codifica la proteína de canal a la región. El canal de iones eNpHR3.1 o NpHR3.0 se activa en presencia de luz amarilla (por ejemplo, que tiene una longitud de onda de aproximadamente 591 nm). El individuo puede proveerse de un dispositivo de administración de luz, tal como el dispositivo de administración de luz (100) descrito anteriormente. El dispositivo de administración de luz puede estar situado en el individuo de forma que la luz amarilla sea capaz de ser administrada a las neuronas de CA1. Después de o durante la recuperación de una memoria (por ejemplo, cualquier memoria no deseada tal como una memoria de miedo o estresante), el dispositivo de administración de luz puede activarse para administrar luz amarilla a las neuronas de CA1, inhibiendo así su despolarización, y alterando el recuerdo de la memoria. Una vez el recuerdo de memoria ha sido suficientemente alterado, el dispositivo de administración de luz puede ser desactivado. Tras la desactivación del dispositivo de administración de luz, el individuo puede recobrar la capacidad de recuperar memorias sin alteración. Este método puede usarse para alterar el recuerdo de memorias recientes (por ejemplo, memorias de eventos que ocurrieron hace menos de un día en el pasado) y el recuerdo de memorias remotas (por ejemplo, memorias de eventos que ocurrieron hace más de un día en el pasado, 1 semana en el pasado, 2 semanas en el pasado, 4 semanas en el pasado, 8 semanas o más en el pasado, etc.). En algunas variaciones, neuronas excitadoras de ACC pueden expresar proteínas activadas por la luz similares, y pueden ser similarmente inhibidas para alterar la recuperación de memorias remotas.

Pueden usarse métodos de alteración de la recuperación de memoria que comprenden inhibir las neuronas de la región CA1 en un animal no humano, tal como un ratón. Por ejemplo, ratones que expresan eNpHR3.1 o NpHR3.0 en las neuronas de la región CA1 fueron entrenados en una cámara de FC personalizada, donde se introdujeron en el contexto A y luego se expusieron dos veces a un tono seguido de un choque en las patas. En una sesión de prueba, la luz verde administrada a las neuronas eNpHR3.1 o NpHR3.0 CA1 interfirió con la capacidad de los ratones para recordar la memoria (es decir, a la memoria de miedo o estresante), como se mide por una reducción en el bloqueo (por ejemplo, bloqueo contextual). En una sesión de pruebas separada donde las neuronas de CA1 eNpHR3.1 o NpHR3.0 no están expuestas a la luz, los ratones son capaces de recordar la memoria de miedo formada durante la sesión de entrenamiento, como se mide por tasas normales de bloqueo. En algunas variaciones, la sesión de prueba puede producirse un día o menos después de la sesión de entrenamiento, mientras que en otras variaciones, la sesión de prueba puede producirse cuatro semanas o más después de la sesión de entrenamiento. El aplicar luz verde a las neuronas de CA1 eNpHR3.1 de los ratones inhibe reversiblemente la despolarización de las neuronas, alterando así el recuerdo de memorias de miedo contextual recientes y/o remotas. El quitar la luz verde de las neuronas de CA1 eNpHR3.1 o NpHR3.0 restaura la capacidad de los ratones para recordar memorias de miedo contextuales recientes y/o remotas.

También pueden usarse métodos para alterar reversiblemente el recuerdo o la recuperación de memorias remotas después de que la memoria haya sido repetidamente recordada y consolidada. Por ejemplo, ratones que tienen neuronas de CA1 que expresan eNpHR3.1 o NpHR3.0 pueden ser entrenadas como se ha descrito anteriormente. En una sesión de prueba cinco semanas después de la sesión de entrenamiento, los ratones fueron capaces de recordar la memoria formada durante el entrenamiento, sin embargo, cuando las neuronas de CA1 eNpHR3.1 o NpHR3.0 se expusieron a luz verde, ya no fueron capaces de recordar la memoria. La posterior exposición de las neuronas de CA1 eNpHR3.1 o NpHR3.0 a luz verde alteraron la recuperación de la memoria de miedo. En algunos métodos, el recuerdo de memoria puede ser alterado exponiendo las neuronas de CA1 eNpHR3.1 o NpHR3.0 a luz

tras el inicio de la memoria recuerdo y/o durante el recuerdo de memoria. Por ejemplo, aplicar luz verde a las neuronas de CA1 eNpHR3.1 o NpHR3.0 al mismo tiempo que el inicio del recuerdo (por ejemplo, al principio de la sesión de prueba) altera el recuerdo de la memoria. Cuando se aplicó luz verde a las neuronas de CA1 eNpHR3.1 o NpHR3.0 durante el recuerdo de memoria (por ejemplo, aplicando la luz algún tiempo después de que haya empezado la sesión de prueba, tal como en el centro de la sesión de prueba), los ratones recordaron inicialmente y respondieron a la memoria de miedo (por bloqueo), pero luego dejaron rápidamente de presentar la respuesta de miedo después de que se aplicara la luz. Estos métodos pueden usarse en un individuo con PTSD que tiene neuronas de CA1 que expresan eNpHR3.1, donde un dispositivo de administración de luz puede activarse al mismo tiempo y/o durante la recuperación de una memoria de miedo con el fin de alterar y/o interrumpir reversiblemente el recuerdo de esa memoria de miedo. La posterior desactivación del dispositivo de administración de luz puede restaurar la capacidad de que el individuo recuerde esta y otras memorias.

Pueden usarse métodos de alteración de la recuperación de memoria que comprenden inhibir las neuronas de la región ACC en un no humano, tal como un ratón. Por ejemplo, ratones que expresan eNpHR3.1 en las neuronas de ACC pueden ser entrenados como se ha descrito anteriormente. En una sesión de prueba, cuatro semanas después de la sesión de entrenamiento, la luz verde administrada a las neuronas de ACC eNpHR3.1 interfirió con la capacidad de los ratones para recordar la memoria formada durante el entrenamiento. El eliminar la luz verde de las neuronas de CA1 eNpHR3.1 restaura la capacidad de los ratones a memorias de miedo remotas.

Afectación de la formación de memoria inhibiendo el hipocampo CA1

Aunque inhibir la despolarización de neuronas excitadoras en la región CA1 (y en algunos casos hiperpolarizar estas neuronas) puede interferir con la recuperación de memoria, tal inhibición puede también alterar la formación de memoria. Una variación de un método para alterar la formación de memoria puede comprender inhibir las neuronas de la región CA1 durante la formación de una memoria tal como una memoria contextual. Canales de iones activados por la luz, tales como eNpHR3.1, pueden expresarse en neuronas localizadas en la región CA1 de un individuo como se describe previamente. El individuo puede proveerse de un dispositivo de administración de luz, tal como el dispositivo de administración de luz (100) descrito en el presente documento. Durante la formación de una memoria (por ejemplo, una memoria de miedo o estresante), el dispositivo de administración de luz puede activarse para administrar luz verde a las neuronas de CA1, inhibiendo así su despolarización y alterando la formación de la memoria. Una vez la formación de memoria ha sido suficientemente alterada, el dispositivo de administración de luz puede ser desactivado. Tras la desactivación del dispositivo de administración de luz, el individuo puede recobrar la capacidad de formar memorias sin alteración.

Pueden usarse métodos de alteración de la formación de memoria que comprenden inhibir las neuronas de la región CA1 en un animal no humano, tal como un ratón. Por ejemplo, se entrenaron ratones que expresaban eNpHR3.1 en las neuronas de la región CA1 en una cámara de FC personalizada, mientras que se administraba luz verde a las neuronas de CA1 eNpHR3.1. Durante el entrenamiento, los ratones se introdujeron en un primer contexto y luego se expusieron a un tono seguido de un choque en la pata. En una sesión de prueba posterior sin la aplicación de luz, los ratones no presentaron memoria del entrenamiento, como se mide por una reducción en el bloqueo contextual. Los mismos ratones se sometieron a sesión de entrenamiento separada donde las neuronas de CA1 eNpHR3.1 no se expusieron a la luz. Los ratones fueron entonces capaces de recordar la memoria en una sesión de prueba posterior. En algunas variaciones, la sesión de prueba puede producirse un día o menos después de la sesión de entrenamiento, mientras que en otras variaciones, la sesión de prueba puede producirse cuatro semanas después de la sesión de entrenamiento. El aplicar luz verde a las neuronas de CA1 eNpHR3.1 de los ratones inhibió reversiblemente la despolarización de las neuronas, alterando así la formación de memorias recientes y/o remotas. El eliminar la luz verde de las neuronas de CA1 eNpHR3.1 restauró la capacidad de los ratones para formar las memorias de miedo.

Afectación de la formación de memoria inhibiendo la amígdala basolateral

Algunas variaciones de métodos de alteración de la formación de memoria pueden comprender administrar luz a neuronas que expresan eNpHR3.1 en la BLA durante la formación de memoria. Canales de iones activados por la luz, tales como eNpHR3.1, pueden expresarse en neuronas localizadas en la BLA de un individuo. El individuo puede proveerse de un dispositivo de administración de luz, tal como el dispositivo de administración de luz (100) descrito anteriormente. El dispositivo de administración de luz puede estar situado en el individuo de forma que luz verde sea capaz de ser administrada a las neuronas de BLA. Después de o durante la formación de una memoria (por ejemplo, una memoria de miedo o estresante), el dispositivo de administración de luz puede activarse para administrar luz verde a las neuronas de BLA, inhibiendo así su despolarización, y alterando la formación de la memoria. Una vez se ha alterado suficientemente la formación de memoria, el dispositivo de administración de luz puede ser desactivado. Tras la desactivación del dispositivo de administración de luz, el individuo puede recobrar la capacidad de adquirir memorias sin disrupción.

Métodos de alteración de la adquisición de memoria que comprenden inhibir las neuronas de la región BLA pueden usarse en un animal no humano, tal como un ratón. Por ejemplo, puede administrarse luz verde a ratones que expresan eNpHR3.1 en las neuronas de BLA durante una sesión de entrenamiento de condicionamiento de miedo

como se ha descrito anteriormente. Los ratones pueden entonces probarse para determinar si adquirieron la memoria de miedo de la sesión de entrenamiento. Luz verde administrada a BLA durante la sesión de entrenamiento puede alterar la capacidad de los ratones para adquirir una memoria de miedo o estresante.

5 Cribado de fármacos que reparan la formación o recuperación de memoria

El controlar el circuito neural que subyace a la función de la memoria puede proporcionar una herramienta para evaluar el efecto de agentes farmacológicos sobre la recuperación de la memoria. Por ejemplo, puede usarse inhibición de las neuronas que expresan eNpHR3.1 de la región CA1 y/o ACC y/o BLA para evaluar la eficacia de diversos agentes farmacológicos para la restauración del recuerdo de memoria. Un ejemplo de un método para identificar un agente farmacológico que activa la despolarización o excitación de neuronas excitadoras no humanas en la región CA1 y/o ACC y/o BLA se representa en la FIG. 3A. El método (300) puede comprender administrar una proteína activada por la luz a la región CA1 y/o ACC y/o BLA del cerebro (302) e inhibir la despolarización de neuronas excitadoras de la región CA1 y/o ACC (303). Como se ha descrito anteriormente, inhibir la despolarización puede comprender aplicar luz que tiene una longitud de onda seleccionada (por ejemplo, amarilla o verde) para canales de iones eNpHR3.1 expresados en las neuronas de la región CA1 y/o ACC para prevenir la generación de potenciales de acción. También pueden expresarse otros tipos de canales activados por la luz para inhibir la despolarización de estas células excitadoras, tales como variantes de NpHR, BR, AR, y bombas de protones tales como GtR3. El efecto de la inhibición de activar los canales de iones eNpHR3.1 puede ser eléctricamente medido usando métodos de pinzamiento zonal de membrana de células sueltas o células completas (304). En algunas variaciones, la actividad eléctrica de las células excitadoras de la región CA1 y/o ACC puede medirse usando electrodos individuales y/o matrices multielectrodo. Las neuronas inhibidas de la región CA1 y/o ACC pueden entonces ponerse en contacto con un agente farmacológico de prueba (306). La actividad eléctrica de las neuronas puede ser similarmente medida (308). Las mediciones eléctricas de las neuronas excitadoras de la región CA1 y/o ACC y/o BLA antes y después de poner en contacto con el agente farmacológico de prueba pueden compararse con determinar si el agente de prueba activa y/o restaura la despolarización de las neuronas (310). El método (300) puede usarse repetidamente según se desee para cribar cualquier número o variedad de agentes farmacológicos.

Un ejemplo de un método de identificación de agente farmacológico que puede ser eficaz para restaurar la formación de memoria o recuperación en un animal no humano se representa en la FIG. 3B. El método (320) puede comprender administrar una proteína activada por la luz a la región CA1 y/o ACC y/o BLA del cerebro (322) y aplicar luz que tiene una longitud de onda seleccionada (por ejemplo, amarilla o verde) para canales de iones eNpHR3.1 expresados sobre las neuronas de la región CA1 y/o ACC y/o BLA para prevenir la generación de potenciales de acción (323). Otros tipos de canales activados por la luz también pueden expresarse para inhibir la despolarización de estas células excitadoras, tales como variantes de NpHR, BR, AR, y bombas de protones tales como GtR3. Puede medirse la respuesta del animal no humano en presencia de la luz durante la formación o recuperación de memoria (324). En algunas variaciones, la memoria puede formarse durante una sesión de entrenamiento donde el individuo se introduce en el contexto A y se expone a un tono acompañado por un choque en la pata, y la respuesta a la recuperación de memoria puede ser el bloqueo cuando se introduce en el contexto A y/o cuando suena el tono. Las neuronas inhibidas de la región CA1 y/o ACC pueden entonces ponerse en contacto con un agente farmacológico de prueba (326). La respuesta del animal no humano puede ser similarmente medida (328). Puede evaluarse la respuesta del animal no humano antes y después de poner en contacto con el agente farmacológico de prueba para determinar si el agente de prueba afecta la formación o recuperación de memoria en presencia de luz (330). En algunas variaciones, el método (320) puede usarse durante la formación de memoria (por ejemplo, una sesión de entrenamiento) para evaluar el efecto del agente farmacológico sobre la formación de memoria. El método (320) también puede usarse durante la recuperación de memoria (por ejemplo, una sesión de prueba algún tiempo después de una sesión de entrenamiento) para evaluar el efecto del agente farmacológico sobre la recuperación de memoria. El método (320) puede usarse repetidamente según se desee para cribar cualquier número o variedad de agentes farmacológicos.

50 Variaciones sobre la precisión temporal que pueden aplicarse a todos los métodos anteriores

En algunas variaciones de los métodos descritos anteriormente, la inhibición de las neuronas que expresan la proteína activada por la luz (por ejemplo, eNpHR3.1 o eNpHR3.0) puede aplicarse en un punto preciso en el tiempo. Por ejemplo, neuronas que expresan eNpHR3.1 en la región CA1 pueden ser iluminadas por luz durante la sesión de prueba solo. La inhibición temporalmente precisa de neuronas que expresan eNpHR3.1 puede alterar el recuerdo de memoria. Aplicar con precisión luz a las neuronas que expresan eNpHR3.1 en la región CA1 de ratones durante la sesión de prueba puede inhibir la recuperación de memoria del miedo remota y/o reciente en un animal. En otras variaciones de los métodos descritos anteriormente, la inhibición de las neuronas que expresan eNpHR3.1 puede aplicarse durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, neuronas que expresan eNpHR3.1 en la región CA1 pueden ser iluminadas por luz antes de la sesión de prueba (por ejemplo, 30 minutos o más antes de la sesión de prueba). La inhibición prolongada de las neuronas que expresan eNpHR3.1 en la región CA1 del hipocampo puede afectar la recuperación de memorias de forma diferente de la inhibición precisa de las neuronas de CA1. Por ejemplo, la aplicación de luz prolongada (es decir, inhibición prolongada) a neuronas de CA1 puede afectar el recuerdo de miedo contextual reciente, pero puede no afectar el recuerdo de memoria contextual remota.

Métodos de tratamiento del PTSD

Pueden usarse uno o más de los métodos descritos anteriormente para tratar individuos con PTSD. Pueden usarse aspectos de la presente divulgación para tratar pacientes con PTSD, en los que una memoria perturbadora recurrente puede detenerse a medida que aparece apagando reversiblemente una memoria de miedo remota en tiempo real antes y después de la reconsolidación, o en tiempo real después de que haya sido recuperada. En algunas variaciones, un método de tratamiento de PTSD puede comprender administrar un vector viral que codifica una proteína activada por la luz a un individuo. La proteína activada por la luz puede configurarse para inhibir la despolarización de la neurona en presencia de luz con una longitud de onda específica. Ejemplos de tales proteínas activadas por la luz pueden incluir NpHR, BR, AR y GrR3. Como se describe previamente, el vector viral puede administrarse a cualquier población de neuronas o tipo (por ejemplo, las neuronas excitadoras de las regiones del cerebro CA1, ACC y BLA). Durante el recuerdo de una memoria no deseada (por ejemplo, una memoria de miedo o estresante), la(s) neurona(s) que expresa(n) la proteína activada por la luz pueden inhibirse de la despolarización, alterando así la recuperación de la memoria no deseada. En algunas variaciones, inhibir la despolarización de la(s) neurona(s) puede comprender aplicar luz de la longitud de onda específica a las neuronas que expresan las proteínas activadas por la luz. Posteriormente (por ejemplo, después de que se haya alterado el recuerdo de la memoria no deseada), puede eliminarse la luz. Esto puede restaurar la función de la memoria de forma que las memorias puedan ser recuperadas sin alteración. Estas etapas pueden repetirse y pueden ser deseables en el transcurso del tratamiento de PTSD.

De acuerdo con otra realización de la presente divulgación, pueden inhibirse memorias relacionadas con drogas para reducir el comportamiento de búsqueda de drogas. Otras realizaciones se refieren a la capacidad para afectar instantáneamente la cognición por modulación de diferentes áreas del cerebro con el fin de estudiar la función de poblaciones neuronales específicas en procesos de memoria. La inhibición de neuronas por ciertas proteínas activadas por la luz y activación por otras proteínas activadas por la luz puede permitir una disección temporal, genética y especial más fina de los circuitos neuronales que subyacen a diversas funciones y comportamientos del cerebro.

En el presente documento se proporciona métodos de alteración del recuerdo de memoria, comprendiendo el método: inhibir la función del circuito del hipocampo dorsal CA1 con una precisión temporal de la inhibición que es suficiente para alterar los efectos de la recuperación de memoria remota. En algunas realizaciones, la etapa de inhibir es sensible a un evento desencadenador de la memoria. En algunas realizaciones, la etapa de inhibir incluye activar opsinas sensibles a la luz expresadas en células del circuito del hipocampo dorsal CA1. En algunas realizaciones, la etapa de inhibir incluye aplicar un pulso eléctrico mediante uno o más electrodos situados cerca del circuito del hipocampo dorsal CA1. En algunas realizaciones, la etapa de inhibir incluye liberar un fármaco en una localización próxima al circuito del hipocampo dorsal CA1. En algunas realizaciones, los efectos de la recuperación de memoria remota incluyen respuestas emocionales a una memoria remota.

También en el presente documento se proporcionan métodos de alteración de la memoria creación, comprendiendo el método: inhibir la función del circuito del hipocampo dorsal CA1 con una precisión temporal de la inhibición que es suficiente para alterar la creación de memoria remota. En algunas realizaciones, la etapa de inhibir es sensible a un evento desencadenador de la memoria. En algunas realizaciones, la etapa de inhibir incluye activar opsinas sensibles a la luz expresadas en células del circuito del hipocampo dorsal CA1. En algunas realizaciones, la etapa de inhibir incluye aplicar un pulso eléctrico mediante uno o más electrodos situados cerca del circuito del hipocampo dorsal CA1. En algunas realizaciones, la etapa de inhibir incluye liberar un fármaco en una localización próxima al circuito del hipocampo dorsal CA1. En algunas realizaciones, los efectos de la recuperación de memoria remota incluyen respuestas emocionales a una memoria remota.

También en el presente documento se proporcionan métodos de fomento de la función de la memoria, comprendiendo el método: excitar la función del circuito del hipocampo dorsal CA1 para promover la creación de memoria remota o la recuperación de memoria remota.

También en el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento de un trastorno neurológico asociado a la recuperación de memoria remota, comprendiendo el método: en respuesta a la recuperación de la memoria remota, inhibir la función del circuito del hipocampo dorsal CA1 con una precisión temporal de la inhibición que es suficiente para alterar los efectos de la recuperación de la memoria remota.

Ejemplos

Se proporcionan a continuación diversos experimentos y ejemplos según la divulgación en el presente documento.

En la exploración de la contribución de tipos definidos de células a la memoria remota usando métodos optogenéticos (que son órdenes de magnitud más rápidos en la aparición y compensación que los métodos anteriores), se encontró que incluso muchas semanas después del condicionamiento contextual (lejos de la fase "remota"), el recuerdo de la memoria contextual del miedo fue suprimido por inhibición optogenética de neuronas excitadoras en la región CA1 del hipocampo – en tiempos cuando estudios previos no habían encontrado influencia

detectable del hipocampo. No se observaron efectos de esta intervención en la locomoción, ansiedad, o la formación de memoria señalada, y sorprendentemente, la memoria contextual remota podría ser instantáneamente suprimida por la inhibición de CA1 incluso en medio de una sesión de comportamiento de movimiento libre. Los experimentos descritos a continuación confirmaron que observaciones previas, sin embargo, como extender la inhibición optogenética del hipocampo para corresponderse con las escalas de tiempo farmacológicas típicas, convirtieron la dependencia del hipocampo remota en la independencia del hipocampo remota; métodos optogenéticos también confirmaron la importancia de la escala de tiempo remota de la corteza cingulada anterior (ACC), y mostraron que el hipocampo participa en el reclutamiento de ACC para el recuerdo remoto. Estos hallazgos tienen amplias implicaciones para la interpretación de datos de fármaco y de lesiones, iluminan aspectos confusos de la bibliografía clínica del hipocampo y descubren un dinamismo sorprendente en la recuperación de memoria, en la que el circuito neural subyacente desplaza adaptivamente las estructuras por defecto implicadas en la memoria - que normalmente dependen del hipocampo incluso en momentos de tiempo remotos, pero que se mueven flexiblemente para alternar mecanismos en la escala de tiempo de minutos.

Pueden usarse diversos tipos de proteínas activadas por la luz para controlar y caracterizar los circuitos neurales que subyacen a la función de la memoria. Por ejemplo, pueden usarse variantes de NpHR para inhibir la despolarización y/o hiperpolarizar una neurona. eNpHR de tercera generación tiene una señal de tráfico entre el gen y el fluoróforo y ha mostrado direccionamiento de la membrana mejorado y elevadas hiperpolarizaciones inducidas por la luz. Se usó este eNpHR de tercera generación para perturbar las neuronas en la región CA1 del hipocampo para determinar su función en tanto la adquisición y recuerdo de memoria reciente como remota. Se usó un vector lentiviral que codifica eNpHR3.1 fusionado en marco con proteína fluorescente amarilla potenciada (eNpHR3.1-EYFP) bajo el control del promotor de la proteína cinasa IIα dependiente de calcio/calmodulina (CaMKIIα), selectivo para neuronas glutamatérgicas excitadoras en el hipocampo. eNpHR3.1 es una versión truncada de eNpHR3.0 con una delección del péptido señal del extremo N intrínseco que es similar a eNpHR3.0 en tanto la fotocorriente como la hiperpolarización inducida en neuronas.

Procedimientos experimentales

Sujetos. Se obtuvieron ratones C57BL6 de edad 6 a 8 semanas de Charles River. Los ratones se alojaron cuatro a cinco por jaula en una colonia mantenida en un ciclo inverso de 12 h de luz / oscuridad y se les dio comida y agua a voluntad. Los protocolos experimentales fueron autorizados por la Universidad de Stanford IACUC y cumplen las normas de la guía de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y uso de animales de laboratorio.

Producción de virus. Se produjo el lentivirus CaMKIIα-eNpHR3.1-EYFP para inyección *in vivo* como se describe previamente (Gradinaru et al., 2010; Zhang et al., 2007). Se construyó el plásmido de virus adeno-asociado (AAV) CaMKIIα-eNpHR3.0-EYFP clonando eNpHR3.0-EYFP en un esqueleto de AAV que llevaba el promotor CaMKIIα usando los sitios de restricción BamHI y EcoRI. Se serotipificaron los vectores de AAV recombinantes con proteínas de cubierta de AAV5 y se encapsidaron con el vector Core en la Universidad de Carolina del Norte; los títulos fueron 2×10^{12} partículas/ml. Los mapas para AAV CaMKIIα::eNpHR3.0 y Lenti CaMKIIα::eNpHR3.1 están disponibles en línea en www.optogenetics.org.

Inyección estereotáctica de virus, implantación de cánula/cable de red y administración de luz. Se anestesiaron ratones con isoflurano, la cabeza se colocó en un aparato estereotáctico (Kopf Instruments, Tujunga, CA; estereomicroscopio de Leica). Se aplicó pomada oftálmica para prevenir el secado del ojo. Se hizo una incisión de la línea media del cuero cabelludo y entonces se realizó una pequeña craneotomía y el virus se administró usando una jeringa de 10 µl y una aguja de metal fina de 34 de calibre (World Precision Instruments, Sarasota, FL). El volumen de inyección y caudal (1 µl a 0,1 µl/min) se controlaron por una bomba de inyección (WPI). Después de la inyección, la aguja se dejó en el sitio durante 5 minutos adicionales y luego se sacó lentamente. Para la inhibición optogenética de CA1, se microinyectaron 2 µl de lentivirus concentrado que llevaba CaMKIIα::eNpHR3.1-EYFP en dos sitios en el CA1 (1 µl/sitio) de tanto el hipocampo adulto izquierdo como derecho. Sitio uno: anteroposterior (AP), -1,5 mm del bregma, mediolateral (ML) ± 1 mm, dorsoventral (DV) -1,5; sitio dos: AP, -2,5 mm, ml, ± 2 mm, DV -1,5 mm. Entonces se colocó una cánula guía bilateral (2,5 mm centro a centro; PlasticsOne, Roanoke, VA) 0,5 mm encima de CA1 (AP, -1,94 mm, ml, ± 1,25 mm, DV -1 mm), y se fijó al cráneo usando cemento dental (C&B metabond, Parkell, Edgwood, NY). La piel se pegó de nuevo con adhesivo de tejido Vetbond. El animal se mantuvo en una almohadilla calefactora hasta que se recuperó del anestésico. Se administró buprenorfina (0,03 mg/kg) por vía subcutánea al principio del procedimiento quirúrgico para minimizar la molestia. Para inhibir la actividad neuronal, se administró bilateralmente luz verde (561 nm, describir láser, etc.) mediante dos fibras ópticas de 300 µm de espesor (Thorlabs, Newton, NJ) que se insertaron mediante las cánulas guía, con una protuberancia de 0,5 mm. Los ratones de control o bien no fueron infectados con eNpHR3.1, pero también se implantaron con la cánula que administraba la luz en CA1, o bien se infectaron con eNpHR3.1 y se implantaron, pero se conectaron a una fibra fantasma que terminó la administración de luz en la superficie del cerebro. Por tanto, los ratones de control experimentaron señales visuales idénticas e información contextual como los ratones experimentales asociados a administración de luz por láser. Para la inhibición optogenética de la amígdala basolateral (BLA), se microinyectaron 1,5 µl de AAV5 CaMKIIα::eNpHR3.0-EYFP en tanto BLA izquierda como derecha (AP, -1,5 mm, ml, ± 3,47 mm, DV -5 mm). Entonces se colocó un cable de conexión (una virola de metal, 2,5 mm de diámetro con un espesor de 200 µm, 5 mm de longitud, fibra óptica desnuda partida; Doric lenses Inc., Quebec, Canadá) en cada BLA (AP, -

1,5 mm, ml, \pm 3,47mm, DV -4,8 mm), y se fijó al cráneo usando cemento dental. Se administró bilateralmente luz verde mediante dos fibras ópticas de 200 μ m de espesor (Doric lenses) que se unieron al cable de conexión usando un manguito de plástico conector. Para la inhibición optogenética de la corteza cingulada anterior (ACC), se microinyectó 1,0 μ l de AAV5 CaMKII α ::eNpHR3.0-EYFP en tanto ACC izquierda como derecha (AP, +1 mm, ml, \pm 0,35 mm, DV -2,2 mm). Entonces se colocó unilateralmente un cable de conexión (Doric lenses Inc.) sobre un ACC, tan próximo como fuera posible a la línea media (AP, +1 mm, ml, \pm 0,2 mm, DV -1,25 mm), y se fijó al cráneo usando cemento dental. Se administró luz verde mediante una fibra óptica de 200 μ m de espesor (Doric lenses) unida al cable de conexión. Para la inhibición optogenética del bulbo olfativo (OB), se microinyectó 1,0 μ l de AAV5 CaMKII α ::eNpHR3.0-EYFP en tanto OB izquierdo como el derecho (AP, +4,5 mm, ml, \pm 0,75 mm, DV -3,25 y -2 mm). Entonces se colocó unilateralmente un cable de conexión (Doric lenses Inc.) sobre un OB, tan próximo como fuera posible a la línea media (AP, +4,5 mm, ml, \pm 0,15 mm, DV -1,4 mm), y se fijó al cráneo usando cemento dental. Se administró luz verde mediante una fibra óptica de 200 μ m de espesor (Doric lenses) unida al cable de conexión.

Inmunohistoquímica. Para medir la diseminación y determinar la especificidad de la expresión de eNpHR-EYFP en neuronas CaMKII α positivas, se anestesiaron ratones con ketamina/xilazina y se perfundieron transcárdicamente con PBS frío, seguido de 4 % de paraformaldehído (PFA) disuelto en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Se extrajeron los cerebros y se fijaron posteriormente en 4 % de PFA en PBS durante 3 h a 4 °C, y luego se equilibraron en 30 % de sacarosa en PBS. Se cortaron secciones coronales de 40 μ m de espesor en un microtomo de congelación (Leica) y se guardaron en crioprotector (25 % de glicerol, 30 % de etilenglicol, en PBS) a 4 °C hasta que se procesaron para inmunohistoquímica. Se lavaron secciones de flotación libre en PBS y luego se incubaron durante 30 min en 0,2 % de Triton X-100 (Tx100) y 2 % de suero de burro normal (NDS). Se incubaron cortes durante la noche con anticuerpo primario en 2 % de NDS (anti-CaMKII α de ratón 1:500, Abcam, Cambridge, MA; anti-GABA de conejo 1:500, Millipore, Billerica, MA; anti-c-Fos de conejo 1:500, EMD Darmstadt, Alemania). Entonces se lavaron las secciones con PBS y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios (anti-ratón de mono conjugado con Cy3, anti-conejo de burro conjugado con cualquiera de Cy3 o Cy5, todos 1:1000, Jackson Laboratories, West grove, PA). Entonces se lavaron los cortes, se incubaron con DAPI (1:50.000) durante 20 min, se lavaron otra vez y se montaron sobre portaobjetos con PVA-Dabco (Sigma). Se adquirieron imágenes de fluorescencia confocal en un microscopio de barrido láser usando un objetivo de aire de 5X o de 10X, o un objetivo de inmersión de 40X. Para determinar la tasa de transducción viral, los presentes inventores calcularon el porcentaje de neuronas inmunorreactivas con CaMKII α por 40 X campo que también fueron eNpHR-EYFP-positivas.

Registro de optodo *in vivo*. Se llevaron a cabo estimulación óptica y registro eléctrico simultáneos en CA1 como se ha descrito previamente (Gradinaru et al., 2007) usando un optodo que consiste en un electrodo de tungsteno extracelular (1 M Ω , \sim 125 μ m) fuertemente atado con una fibra óptica (200 μ m de diámetro de núcleo, 0,2 N.A.), con la punta del electrodo sobresaliendo ligeramente más allá del extremo de la fibra (\sim 0,4 mm) para garantizar la iluminación de las neuronas registradas. Los registros se realizaron con el optodo inicialmente situado en el límite de CA1 (AP, -1,94 mm; ml, 1,4 mm; DV, -1,1) y se bajaron gradualmente en incrementos de 0,1 mm. La fibra óptica se acopló a un diodo de láser en estado sólido de 473 nm con \sim 20 mW de salida de la fibra de 200 μ m. Se hicieron registros unitarios individuales en ratones anestesiados con una mezcla de ketamina/xilazina (ketamina, 80 mg/kg; xilazina, 15-20 mg/kg) diluida en PBS. Se registraron señales y se filtro con filtro paso banda a 300 Hz bajo/5 kHz alto usando un amplificador 1800 Microelectrode AC.

Medición del aprendizaje y memoria en el paradigma de condicionamiento de miedo. El aparato de condicionamiento de miedo consistió en una jaula de condicionamiento cuadrada (18 x 18 x 30 cm), con un suelo de rejilla cableado con un generador de choques y un mezclador, rodeado por una cámara acústica (Coulbourn instruments, PA, EE.UU.). El aparato se modificó para permitir la administración de luz durante el entrenamiento y/o prueba. Para inducir el condicionamiento de miedo, los ratones se colocaron en la jaula durante 120 segundos, y luego se hizo sonar un tono puro (2,9 kHz) durante 20 s, seguido de un choque en la pata de 2 s (0,5 mA para memoria a corto plazo, 1 mA para memoria a largo plazo). Entonces se repitió este procedimiento, y 30 s después de la administración del segundo choque los ratones se devolvieron a su jaula hogar. El condicionamiento de miedo se evaluó por una medición continua del bloqueo (inmovilidad completa), la respuesta de miedo conductual dominante (Fanselow, 2000). El bloqueo se midió continuamente durante el ensayo de prueba por un investigador experimentado cegado al grupo de tratamiento. Para probar el condicionamiento de miedo contextual, los ratones se colocaron en la jaula de condicionamiento original, y se midió el bloqueo durante 5 min. Para probar el condicionamiento de miedo acondicionado auditivo, se colocaron en un contexto diferente – una jaula en forma de pirámide con un suelo liso. Como control para la influencia del entorno novedoso, se midió el bloqueo durante 2,5 min en esta nueva jaula, y entonces se hizo sonar el tono a 2,9 kHz durante 2,5 min, durante el cual se midió el bloqueo condicionado. Este paradigma básico se aplicó en condiciones variables en los diferentes experimentos: En el primer experimento (Fig. 5) los ratones se entrenaron y se probaron del siguiente modo: Día 1- entrenamiento con administración de luz continua de 561 nm (luz ENCENDIDA). Día 2 - pruebas contextuales y condicionadas (separadas 2 h) sin administración de luz (luz APAGADA). Día 3 - entrenamiento, luz APAGADA. Día 4 - prueba, luz APAGADA. Día 5 - pruebas contextuales y condicionadas, luz ENCENDIDA. En el primer experimento de memoria remota (Fig. 6A): Día 1 - entrenamiento, luz APAGADA. Día 29 - pruebas contextuales y condicionadas, luz ENCENDIDA. Día 30 - prueba, luz APAGADA. En un segundo experimento de memoria remota (Fig. 6C): Día 1 - entrenamiento, luz APAGADA. Día 64 - prueba contextual, luz ENCENDIDA. En un tercer experimento (Fig. 8): Día 1

- entrenamiento, luz APAGADA. Día 36 - prueba, luz APAGADA. Día 37 - prueba, luz ENCENDIDA. Día 38 - prueba con 3 min de luz APAGADA seguido de 3 min de luz ENCENDIDA.

En el experimento de BLA (Fig. 5H-I) los ratones fueron entrenados en el día 1 con luz ENCENDIDA, y se probaron para miedo contextual y condicionado en el día 2 con luz APAGADA. En los experimentos de ACC (Fig. 10A-B) y OB, los ratones se entrenaron en el día 1 con luz APAGADA, se probaron en el día 2 con luz ENCENDIDA, y luego se probaron en el día 29 con luz ENCENDIDA. Para la exposición a luz prolongada (Fig. 7A, B, 10C), se pasaron las fibras ópticas a través de la jaula de condicionamiento a jaula de alojamiento regular con lecho, y se administró luz en esta jaula durante 30 min. El ratón se colocó entonces en la jaula de condicionamiento durante una prueba de cinco min, ya que la administración de luz continuó sin interrupción. Se analizaron los resultados de las pruebas contextuales y condicionadas por una prueba de la t de Student o ANOVA bilateral, seguido de pruebas a posteriori, según fuera aplicable.

Administración de fármaco. Para los experimentos farmacológicos (Fig. 6D-E), se implantaron ratones con una cánula doble encima de CA1. La cánula, procedimiento quirúrgico y localización fueron los mismos que en los experimentos de administración de luz. Como se describe por Kitamura et al. (Kitamura et al., 2009), se infundieron TTX (Sigma, 20 μ M) y CNQX (Tocris Bioscience, Ellisville, MO; 3 mM) o solución salina en un volumen de 1 μ l mediante una cánula interna de acero inoxidable de 28 de calibre (PlasticsOne) que era 0,5 mm más larga que la cánula guía. La cánula interna se conectó a una bomba de micro-jeringa (Harvard Apparatus, Holliston, MA) por un tubo PE20. Se administraron soluciones a una velocidad constante de 200 nl/min, y la cánula de inyección se retiró 2 min tras la terminación de la inyección para evitar el derrame de la cánula guía.

Prueba de campo abierto. Se realizó la prueba de campo abierto en una pista de plástico abierta (50 cm de largo x 50 cm de ancho x 40 cm de profundidad). Los ratones se colocaron individualmente en el centro de la cámara y se dejó que exploraran libremente durante 3 min. Se midió la actividad en tanto el centro como la periferia del campo usando un sistema de seguimiento por vídeo automatizado (Biobserve, Bonn, Alemania). El porcentaje de tiempo en el centro se define como el porcentaje de tiempo total que pasó en el área central de 35 x 35 cm del campo abierto.

Medición electrofisiológica de la inhibición continua de impulsos provocados por eNpHR3.1. Se inyectaron cuatro ratones del experimento de exposición a luz prolongada como se ha descrito anteriormente, se sometieron a prueba conductual, y entonces se sacrificaron y se hicieron cortes para fisiología. Se prepararon cortes coronales que contenían CA1 dorsal perfundiendo solución helada de sacarosa transcárdicamente que contenía (en mM): NaHCO₃ 26, KCl 2,5, NaH₂PO₄ 1,25, MgSO₄·H₂O 10, CaCl₂·H₂O 0,5, glucosa 11 y sacarosa 234, y posteriormente cortando cortes de 300 micrómetros en la misma solución helada de sacarosa. Se hicieron registros electrofisiológicos bajo la perfusión constante de aCSF, que contuvo (en mM): NaCl 126, NaHCO₃ 26, KCl 2,5, NaH₂PO₄ 1,25, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2 y glucosa 10. Todos los registros se realizaron a 32 °C. Se llenaron electrodos de parche (resistencia de la punta = 2-6 M Ω) con (en mM): gluconato de K 130, KCl 10, Hepes 10, EGTA 10 y MgCl₂ (pH ajustado a 7,3 con KOH). La resistencia en serie fue normalmente 10-20 M Ω , y los experimentos se interrumpieron si se superó 30 M Ω . El potencial de membrana se corrigió para un potencial de la unión líquida medido de 7 mV. La inducción de potenciales de acción se hizo inyectando corriente que oscila de 200 pA a 10 Hz. Se administró luz para la activación de eNpHR3.1 usando una fuente de luz halógena X-Cite 120W mediante un filtro de 531 \pm 20 nm y un objetivo de agua de 40x/0,8 NA a 7 mW/mm².

Comparación electrofisiológica entre eNpHR3.1 y eNpHR 3,0 en neuronas cultivadas. Cultivos hipocámpicos: Se prepararon neuronas hipocámpicas cultivadas primarias a partir de crías de rata Sprague-Dawley P0. Se aislaron las regiones CA1 y CA3, se digirieron con 0,4 mg/ml de papaína (Worthington, Lakewood, NJ), y se pusieron sobre cubreobjetos de vidrio previamente recubiertos con 1:30 de Matrigel (Beckton Dickinson Labware, Bedford, MA) a una densidad de 65.000/cm². Los cultivos se mantuvieron en una estufa de incubación húmeda con 5 % de CO₂ con medio Neurobasal-A (Invitrogen Carlsbad, CA) que contenía 1,25 % de FBS (Hyclone, Logan, UT), 4 % de suplemento B-27 (GIBCO, Grand Island, NY), Glutamax 2 mM (GIBCO) y FUDR (2 mg/ml, Sigma).

Transfección con fosfato de calcio. Se cultivaron neuronas hipocámpicas de 6-10 DIV a 65.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. Mezcla de ADN/CaCl₂ para cada pocillo: 1,5-3 μ g de ADN (preparación libre de endotoxina QIAGEN) + 1,875 μ l de CaCl₂ 2 M (concentración de Ca²⁺ final 250 mM) en 15 μ l de H₂O total. A ADN/CaCl₂ se añadieron 15 μ l de 2X solución salina tamponada con HEPES (pH 7,05), y el volumen final se mezcló bien pipeteando. Después de 20 min a TA, los 30 μ l de mezcla de ADN/CaCl₂/HBS se añadieron gota a gota a cada pocillo (de los que el medio de crecimiento se había eliminado temporalmente y se substituyó con 400 μ l de MEM templado) y se dejó que avanzara la transfección a 37 °C durante 45-60 min. Cada pocillo se lavó entonces con 3 X 1 ml de MEM templado y se substituyó el medio de crecimiento. La expresión de opsina se observó generalmente en el plazo de 20-24 h.

Electrofisiología. Se realizaron registros de pinzamiento zonal de membrana de células completas como se ha descrito previamente (solución intracelular: gluconato de K 129 mM, HEPES 10 mM, KCl 10 mM, MgATP 4 mM, Na₃GTP 0,3 mM, valorada a pH 7,2; Tyrode extracelular: NaCl 125 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 3 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 30 mM y HEPES 25 mM, valorada a pH 7,3). Para los registros de pinzamiento de voltaje se mantuvieron las células a -70 mV. Se administró luz de una lámpara de 300W DG-4 (Sutter Instruments, Novato, CA) mediante

un filtro de 593/40 nm (Semrock, Rochester, NY) y un objetivo de agua Leica 40X/0,8NA; la potencia de la luz en la muestra fue 3 mW/mm². Los datos de pinzamiento zonal de membrana de células completas son de neuronas hipocámpicas cultivadas ya sea transfectadas o transducidas con eNpHR3.0 y eNpHR3.1 lentiviral y se dejó que se expresaran durante una semana. La expresión fue conducida por el promotor de CaMKII α humano y se visualizó por fusión con EYFP.

Obtención de imágenes de la activación neuronal por tinción de cFos. Se entrenaron ratones de control YFP y eNpHR3.1 con administración de luz durante el condicionamiento (sin exposición a tono, de manera que solo se induciría el miedo del contexto), y se sacrificaron 90 min después para probar para los niveles de c-Fos (descritos en detalle en la sección inmunohistoquímica anterior). Se sacrificaron otros dos grupos de ratones de control no entrenados y eNpHR3.1 de sus jaulas hogar. Para la memoria remota, controles YFP y ratones eNpHR3.1 fueron condicionados al miedo sin luz, se expusieron al contexto de condicionamiento con luz 28 días después, y se sacrificaron 90 min después para probar para los niveles de cFos. Los grupos de control en este momento fueron ratones de control y eNpHR3.1 que fueron entrenados, y luego se sacrificaron de sus jaulas hogar 28 días después sin ser re-expuestos al contexto de condicionamiento.

Resultados

La inhibición optogenética específica de neuronas excitadoras en CA1 dorsal reduce la actividad neuronal.

Se encontró que la administración estereotáctica del vector CaMKII α ::eNpHR3.1 producía expresión específica de CA1 (Fig. 4A). eNpHR3.1 es una versión truncada de eNpHR3.0 con una delección del péptido señal del extremo N intrínseco, que tiene efectos comparables sobre el potencial de membrana. eNpHR3.1 se dirige a la membrana neuronal, y se expresa alrededor del soma, además de en las dendritas apicales y basales de neuronas de CA1 (Fig. 4B). Dentro del área transfectada, el 94 % (458/486 células, de 3 ratones) de las células CaMKII α expresaron eNpHR3.1, y el promotor proporcionó especificidad completa; todas las células eNpHR3.1-EYFP también fueron CaMKII α positivas (Fig. 4C). La proteína eNpHR3.1 se expresó en CA1, pero en estas condiciones de expresión no en otros sub-campos hipocámpicos, en la corteza parietal por encima de los sitios de inyección, en tálamo o en la habénula. Pudo observarse la vía de la cánula (en el bregma -1,94) encima de los sitios de expresión. El volumen de infección cubrió una fracción sustancial de CA1 dorsal (0,875 \pm 0,05 mm³; N=12 ratones).

Para verificar el efecto fisiológico de eNpHR3.1 en la actividad neuronal de CA1, se realizaron registros de 'optodo' (estimulación óptica y registro eléctrico simultáneos usando un electrodo extracelular acoplado a un cable de fibra óptica) de neuronas CA1 en ratones anestesiados (Fig. 4D izquierda), y los experimentos confirmaron que la iluminación continua de 561 nm de neuronas de CA1 excitadoras inhibió potentemente el impulso inhibido *in vivo* (Fig. 4D) de una forma temporalmente precisa y reversible, sin afectar las amplitudes de impulso. La iluminación de 561 nm de neuronas de CA1 en estos ratones produjo una reducción marcada reversible en la frecuencia de impulso (4,93 \pm 1,6 Hz, 33,32 \pm 0,15 Hz, y 33,32 \pm 2,4 Hz; antes, durante y después de la administración de luz, respectivamente, en 15 trazados de 2 ratones, P<0,02), sin afectar la amplitud de impulso promedio 33,32 \pm 4,94 μ V, 33,32 \pm 4,4 μ V, y 33,32 \pm 5,45 μ V; antes, durante y después de luz). Se muestran un trazado de registro de optodo representativo, además de la frecuencia y amplitud promedio (media \pm EEM).

La inhibición optogenética de CA1 bloquea la adquisición y recuperación de miedo contextual.

La participación del hipocampo en el condicionamiento de miedo contextual se basa en lesiones físicas, farmacológicas y genéticas a esta estructura, en la que el intervalo entre lesión y prueba oscila de décimas de minutos a varias semanas (Anagnostaras et al., 1999; Kim y Fanselow, 1992; Kitamura et al., 2009; Shimizu et al., 2000; Wiltgen et al., 2010), que podría permitir la adaptación y compensación dentro del circuito neural relevante. Para probar primero si la inhibición optogenética de CA1 en tiempo real podría modular la formación de memoria, se administró luz verde continua bilateral (561nm) mediante dos fibras ópticas insertadas mediante un sistema de cánula doble que se dirigía a CA1 dorsal (Fig. 5A) en ratones libres de movimiento en una cámara de FC personalizada. La luz se administró a todos los ratones, y fue acompañada por inhibición de CA1 en eNpHR3.1, pero no ratones de control (que o bien estuvieron infectados, pero implantados con una cánula y recibieron luz en CA1, o bien ratones infectados e implantados con una fibra fantasma que no se extiende en el cerebro). Durante el entrenamiento de condicionamiento de miedo, los ratones se introdujeron en el contexto A, y entonces se expusieron dos veces a un tono seguido de un choque en la pata, con administración de luz bilateral continua de 561 nm, y los ratones se probaron para su memoria 24 h después sin luz. La memoria de miedo se evaluó entonces al día siguiente en ausencia de inhibición óptica. La inhibición optogenética dorsal de CA1 durante el entrenamiento previno completamente la adquisición de miedo contextual de ratones eNpHR3.1 (n=5) en comparación con controles (n=4) (39 \pm 5,4 frente a (77,2 \pm 4,3 % de bloqueo; medias \pm EEM, P<0,005 (Fig. 5B, izquierda). Para probar si el efecto de inhibición optogenética era reversible, todos los ratones volvieron entonces a entrenarse en el mismo contexto sin administración de luz, y se probaron otra vez al día siguiente; de hecho, los ratones eNpHR3.1 presentaron memoria contextual intacta (64,6 \pm 6,6 frente a 49,7 \pm 11,7 % de bloqueo; P>0,5) cuando no se administró luz durante el entrenamiento (Fig. 5B, centro).

A continuación, se probó si la inhibición optogenética de CA1 dorsal podría también interferir con el recuerdo de memoria. Para este fin se probaron los mismos ratones, esta vez con administración de luz durante el recuerdo, y se encontró que la memoria que estaba presente el día antes no estaba disponible para recuerdo con iluminación

(Fig. 5B, derecha; $42,6 \pm 10,1$ frente a $5,94 \pm 4,1$ % de bloqueo, $P < 0,01$). Estos experimentos respaldan el entendimiento previo de que el hipocampo es requerido para la adquisición y recuerdo de memoria de miedo contextual reciente, demostrando directamente la importancia en tiempo real de células excitadoras de CA1 en estos procesos. Para verificar que estos efectos fueron específicos para las memorias de miedo contextuales y no la adquisición del miedo y los mecanismos de expresión del miedo en general, los mismos ratones se probaron en un contexto diferente para su memoria del tono; ratones eNpHR3.1 ($n=5$) demostraron adquisición de memoria del miedo condicionada auditiva intacta tras la inhibición de luz de CA1 durante el entrenamiento (Fig. 5C, izquierda), además de recuerdo de miedo condicionado intacto con iluminación durante la prueba (Fig. 5C, derecha) en comparación con controles ($n=4$). Estos hallazgos demuestran la especificidad funcional de la manipulación optogenética en afectar solo la tarea dependiente del hipocampo.

Para validar adicionalmente el sistema optogenético, se llevaron a cabo varios experimentos de control adicionales. Debido a que la exploración espacial es crítica para la adquisición de miedo contextual (McHugh y Tonegawa, 2007), se midió el tiempo de exploración dentro de la cámara de condicionamiento durante el entrenamiento con estimulación de luz, y no se encontró diferencia entre animales que expresan eNpHR3.1 ($n=5$) y animales de control ($n=5$; Fig. 5D). La inhibición optogenética de CA1 tampoco tuvo efecto sobre la exploración de un entorno novedoso. Para verificar que la inhibición optogenética de CA1 no tuvo un efecto ansiolítico, se probaron ratones para la exploración de campo abierto durante la administración de luz; no se encontraron diferencias en la longitud de la trayectoria (Fig., 5E; 564 ± 9 y 618 ± 114 cm, eNpHR3.1 y control respectivamente), velocidad (Fig. 5F; $3,3 \pm 0,1$ frente a $3,43 \pm 0,6$ cm/s, eNpHR3.1 y control respectivamente), o el porcentaje de tiempo pasado en el centro del campo (que sirve de un signo de comportamiento relacionado con la ansiedad) entre ratones que expresan eNpHR3.1 ($n=6$) y de control ($n=4$; Fig. 5 g; $23,8 \pm 2,76$ % frente al $20,46 \pm 5,97$ %, $P > 0,5$).

Finalmente, se inyectaron bilateralmente ratones en la amígdala basolateral (BLA; Fig. 5H) en lugar del hipocampo y se encontró que era posible inhibir optogenéticamente tanto la adquisición de FC contextual (Fig. 5I; $65,5 \pm 7,2$ frente a $9,6 \pm 5,5$ % de bloqueo; $P < 0,001$) como la condicionada auditiva (Fig. 5I; $69,5 \pm 9,6$ frente a $24,5 \pm 13$ % de bloqueo; $P < 0,05$) en ratones eNpHR3.0 ($n=4$), en comparación con controles ($n=9$), ya que era de esperar de hallazgos previos que la adquisición del propio miedo y la expresión de miedo reciente y remoto dependieran de la amígdala (Han et al., 2009; Johansen et al., 2010; Killcross et al., 1997; LeDoux, 2000; Lee et al., 2006; Maren y Quirk, 2004). Juntos esta constelación de hallazgos confirma la validez del sistema optogenético en tiempo real, rápido, específico del tipo de célula, reversible, y respaldan una amplia matriz de hallazgos previos importantes en la bibliografía de la memoria demostrando directamente la función en tiempo real del hipocampo en la adquisición y recuerdo.

La inhibición optogenética de CA1 interfiere reversiblemente con la recuperación de memoria del miedo remota. Se exploró la función del hipocampo en el recuerdo de memoria remota. Se entrenó un grupo de ratones con FC contextual como antes y los sujetos se probaron 4 semanas después (Fig. 6A), lejos en la fase remota cuando no se esperaba participación del hipocampo. Sorprendentemente, se encontró que la inhibición de CA1 durante el recuerdo bloqueó completamente la memoria de miedo remota ($P < 0,0001$; Control $n=14$, $69,8 \pm 5,3$ % de bloqueo eNpHR3.1 $n=6$, $14 \pm 6,4$ % de bloqueo). Esta interferencia con el recuerdo fue reversible; cuando los mismos ratones volvieron a probarse al día siguiente sin iluminación, la memoria de miedo se expresó completamente como en los controles (Fig. 6A; $52,45 \pm 6,0$ frente a $45,18111,5$ % de bloqueo; $P > 0,5$). Además, los ratones eNpHR3.1 demostraron recuerdo de memoria de miedo condicionada auditiva intacta con iluminación durante la prueba condicionada (Fig. 6B; Control $n=14$, $22,3 \pm 6,8$ %, eNpHR3.1 $n=6$, $11,8 \pm 3,5$ % de bloqueo en el nuevo contexto; y $72,4 \pm 8,4$ frente a $58,77 \pm 7,9$ % de bloqueo al tono; $P > 0,5$), demostrando además que los mecanismos de expresión del miedo siguieron intactos. Para probar si el hipocampo todavía estaría implicado en el recuerdo de miedo contextual incluso a intervalos de tiempo mucho más largos, se entrenó otra población de ratones y esta cohorte se probó 9 semanas después de FC contextual. Se encontró que la inhibición de CA1 durante el recuerdo bloqueó la memoria de miedo remota incluso después de este intervalo muy largo y nunca fue previamente provocada (Fig. 6C; $P < 0,005$; Control $n=9$, $31,8 \pm 3,8$ % de bloqueo eNpHR3.1 $n=6$, $11,3 \pm 3,6$ % de bloqueo).

Estos resultados señalan a la participación continua del hipocampo en las memorias de miedo contextuales remotas, sugiriendo que el hipocampo intacto es todavía el activador por defecto del trazado de memoria. Contrastan con las teorías actuales basadas en lesiones físicas, farmacológicas o genéticas elegantes y pioneras al hipocampo, en las que el intervalo entre la lesión y la prueba de recuerdo oscilan de decenas de minutos a varias semanas (Anagnostaras et al., 1999; Kim y Fanselow, 1992; Kitamura et al., 2009; Shimizu et al., 2000; Wiltgen et al., 2010). De hecho, los experimentos demostraron que la inhibición farmacológica del hipocampo usando TTX y CNQX, como se informó previamente (Kitamura et al., 2009), afectaron solo el recuerdo de miedo reciente (Fig. 6D; solución salina $n=5$, $56,86 \pm 1,9$ % de bloqueo; TTX+CNQX $n=4$, $26,05 \pm 10,23$ % de bloqueo; $P < 0,05$) pero no el remoto (Fig. 6E; solución salina $n=8$, $93,93 \pm 2,54$ % de bloqueo; TTX+CNQX $n=9$, $12,8 \pm 4,4$ % de bloqueo; $P > 0,05$) si se usa el protocolo de FC, que confirma estudios previos. Así, la velocidad y especificidad de la optogenética podría permitir en su lugar probar la función causal de células y circuitos como se emplean en el comportamiento de animales, no permitiendo la expresión de mecanismos compensatorios. Esta hipótesis se probó explícitamente a continuación.

La inhibición optogenética de CA1 precisa, pero no prolongada, bloquea el recuerdo de miedo contextual remoto.

Para probar la hipótesis de que la precisión temporal es un factor crítico que representa la discrepancia entre los hallazgos optogenéticos y farmacológicos, se repitió el experimento optogenético remoto con o bien iluminación limitada a la duración de la prueba como antes (Fig. 7A "precisa"), o bien con iluminación prolongada durante 30 min antes de la prueba y durante la prueba para imitar una intervención más lenta y dejar tiempo para que participen los mecanismos compensatorios putativos (Fig. 7A "prolongados"). La inhibición optogenética precisa inhibió significativamente la memoria remota, mientras que la inhibición prolongada no tuvo efecto detectable sobre la recuperación de memoria remota (Fig. 7A). Además, cuando los ratones del grupo prolongado volvieron a probarse al día siguiente con administración de luz precisa (durante la prueba solo), los mismos ratones presentaron recuerdo de miedo inhibido (Fig. 7A derecha). En otras palabras, la inhibición optogenética de CA1 previene el recuerdo de miedo remoto de una memoria que se adquirió 28 días antes, solo cuando la luz se administró con precisión durante la prueba (grupo preciso, Control n=4, 72,65 ± 11,5 % de bloqueo, eNpHR3.1 n=8, 26,9 ± 10,4 % de bloqueo; P<0,01), pero no cuando la luz estuvo ENCENDIDA continuamente durante 30 min antes, además de durante la prueba (grupo prolongado, control, Control n=3, 70,13 ± 12,2 % de bloqueo, eNpHR3.1 n=4, 67,7 ± 5,6 % de bloqueo; P>0,05). Cuando los ratones del grupo prolongado volvieron a probarse al día siguiente con luz durante la prueba solo, se alteró su recuerdo (grupo prolongado, izquierda, 55,5 ± 8,5 frente a 27,6 ± 8,6 % de bloqueo; P<0,05).

Para validar estos resultados, se realizaron tanto controles conductuales como fisiológicos. Primero, se confirmó que la inhibición de CA1 mediada por eNpHR3.1 prolongada, que no tuvo efecto sobre la memoria remota, todavía podía bloquear la memoria reciente. Para este fin, se entrenó un nuevo grupo de ratones y se probaron al día siguiente con iluminación prolongada durante 30 min antes de la prueba y luego durante la prueba. Se encontró que la inhibición optogenética prolongada inhibió significativamente el recuerdo de memoria de miedo reciente (Fig. 7B; Control n=7, 32,2 ± 10,6 % de bloqueo, eNpHR3.1 n=3, 4 ± 2,6 % de bloqueo; P<0,05), similar al efecto farmacológico (Fig. 6D). Segundo, se realizaron registros de pinzamiento zonal de membrana de células completas (en cortes preparados a partir del grupo prolongado en la Fig. 4A), que revelaron que la capacidad de eNpHR3.1 para suprimir el impulso era estable durante los periodos de registro de 30 min, como era de esperar (Gradinaru et al., 2010), y era completamente reversible (Fig. 7C). Se presentan trazados detallados de secciones 1 (aparición de la inhibición) 2 (durante la inhibición continua) y 3 (fin de la inhibición y recuperación) en la parte inferior izquierda. Se presentan el porcentaje promediado de impulsos provocados satisfactorios antes de la luz, durante la administración de luz (después de 5 min y 30 min de luz ENCENDIDA) y recuperación después de la luz APAGADA (abajo derecha; n=4 ratones, 10 células).

La inhibición optogenética de CA1 interfiere con el recuerdo de miedo continuo.

Se entrenó otra población de ratones y las cohortes se probaron 5 semanas después de FC contextual con la investigación del recuerdo de luz encendida y luz apagada remoto de orden invertido, verificando primero la persistencia de los trazados de memoria (sin luz durante la prueba, observando rendimiento similar en tanto los grupos de eNpHR3.1 como de control como era de esperar; Fig. 8 izquierda; control n=8, 79,0 ± 8,9 % de bloqueo; eNpHR3.1 n=6, 67,8 ± 12,1 % de bloqueo; P>0,5). Al día siguiente, los mismos ratones se probaron con iluminación, y el grupo de NpHR3.1 dejó de recordar la memoria contextual (Fig. 8 izquierda; 77,2 ± 4,3 % frente a 12,8 ± 4,4 % de bloqueo; P<0,0001). Este efecto fue a su vez completamente reversible, ya que al día siguiente, cuando se probaron sin administración de luz, los ratones eNpHR3.1 demostraron memoria contextual intacta (Fig. 8 derecha; 61,5 ± 6,7 frente a 58,3 ± 3,5 % de bloqueo; P>0,5). Y, lo que es más importante, tan pronto como la luz se administró otra vez a CA1 dentro de esta sesión, después de que los ratones ya hubieran recordado el contexto aversivo y expresado el miedo, cesó inmediatamente la respuesta de miedo (Fig. 8 derecha, 65,2 ± 6,9 frente a 15,9 ± 5,2 % de bloqueo; P<0,001) en eNpHR3.1 pero no en los animales de control.

Junto estos datos pueden unificar ciertos diversos hallazgos, respaldando inmediatamente el trabajo previo revelando que el trazado de memoria remota no es guardado solo en el hipocampo (ya que cuando se da tiempo suficiente para compensar la inactivación hipocámpica, el trazado de memoria puede todavía ser recuperado por otras estructuras, en línea con los informes previos), pero revelando al mismo tiempo el sorprendente hallazgo de que el hipocampo intacto puede ser un activador por defecto del trazado de memoria remota y participa activamente en su mantenimiento durante toda la sesión de recuerdo.

Mapeo del cerebro completo de la actividad del circuito controlada por el hipocampo durante el recuerdo remoto.

Estudios previos de la expresión de productos génicos inmediatos-tempranos (por ejemplo zif268 y c-Fos), y otras medidas globales de actividad neural han indicado que la transición de memoria reciente a remota puede ir acompañada de una disminución en la actividad hipocámpica y un aumento en la actividad neocortical (en ACC y corteza prefrontal; Bontempi et al., 1999; Frankland et al., 2004; Hall et al., 2001; Maviel et al., 2004). Para extender este enfoque de mapeo de actividad al establecimiento del control optogenético de CA1, se administró inhibición mediada por eNpHR3.1 durante el entrenamiento o el recuerdo remoto, y se evaluó la inducción del producto génico temprano-inmediato c-Fos a través del cerebro completo. Los ratones se condicionaron al miedo con administración de luz, y se recogieron los cerebros 90 min después del entrenamiento (Fig. 9A). Se tiñeron cortes de cerebro para c-Fos y DAPI (Fig. 9B). Se muestran la expresión de control YFP y eNpHR3.1. La región CA1 de la que se toman estas imágenes está marcada por un cuadrado blanco en la Fig. 9C. Tras el entrenamiento, ratones que expresan eNpHR3.1 demostraron expresión sustancialmente reducida de c-Fos específicamente en CA1 en comparación con

animales de control entrenados (Fig. 9C-D; $n = 2$ a 4 ratones, 6 a 15 cortes por grupo; $P < 0,01$), pero mostraron actividad de BLA equivalente a la de controles entrenados (Fig. 9C-D; $p < 0,0001$) que reveló la interacción independiente del hipocampo esperada del circuito del miedo durante el entrenamiento. Obsérvese que las barras y líneas de las Fig. 9D, 9G y 9H referenciadas por (900) son datos del grupo "Control-Ninguno", (902) son datos del grupo "NpHR-Ninguno", (904) son datos del grupo "Control-Miedo" y (906) son datos del grupo "NpHR-Miedo". No se observaron cambios significativos en los niveles de actividad de ACC en este momento. Se muestran imágenes representativas de CA1, ACC y BLA. La anatomía se muestra por tinción nuclear de DAPI, y los márgenes de la amígdala están marcados con una línea discontinua. Barra de escala blanca: 150 μm .

Se condicionó otro grupo de ratones, y entonces se volvió a exponer al contexto 28 días después del condicionamiento en presencia o ausencia de inhibición optogenética de CA1; como antes, los ratones que expresan eNpHR3.1 demostraron recuerdo remoto alterado. 90 min después los cerebros se recogieron y se tiñeron para c-Fos (Fig. 9E) para capturar patrones de actividad del cerebro completo relacionados con la memoria putativos bajo control del hipocampo en este momento de tiempo remoto. Enigmáticamente, se observó un aumento pequeño, pero significativo, en CA1c-Fos en ratones de control, pero no en eNpHR3.1 (Fig. 9F-G; $P < 0,005$) siguiendo el recuerdo remoto. Se muestran imágenes de CA1, ACC y BLA representativas tras la memoria remota. Barra de escala blanca: 150 μm . Esta población de células CA1 pareció estar causalmente implicada en el reclutamiento de actividad relacionada con la memoria remota del cerebro completo, ya que el aumento en la actividad de ACC ($P < 0,0001$) en este momento de tiempo remoto observado en animales de control se redujo en ratones inhibidos por eNpHR3.1/CA1 ($P < 0,0001$). Incluso más sorprendentemente, se observaron poblaciones de células activadas en BLA ($P < 0,0001$) en ratones de control (que reconocieron el contexto y expresaron el miedo), pero no en los ratones eNpHR3.1 inhibidos por CA1 (que se encontró además que eran incapaces de recordar el contexto; Fig. 9F-G; $P < 0,0001$). Como se representa en la Fig. 9G, el recuerdo remoto 28 días tras el condicionamiento produjo un aumento pequeño, pero significativo, en la expresión por c-Fos de CA1 en ratones de control, y aumentó altamente los niveles de actividad en ACC y BLA. La inhibición de luz durante la exposición al contexto bloqueó completamente la actividad de CA1 ($P < 0,05$), y redujo significativamente la actividad de ACC y BLA, en comparación con el control.

Observaciones adicionales indican a la especificidad de esta población reclutada por CA1 en el momento de tiempo remoto. Ratones que expresan eNpHR3.1 mostraron una elevación en la actividad de la corteza prefrontal equivalente a la de los controles, y no se observaron cambios significativos en los niveles de actividad de la corteza parietal en ninguno de los grupos. A diferencia, como se observa anteriormente, los niveles de actividad en ACC fueron significativamente reclutados en la memoria remota solo, y a un menor grado en el establecimiento de la inhibición de CA1 mediada por eNpHR3.1 (Fig. 9H centro), también de acuerdo con informes previos (Bontempi et al., 1999; Frankland et al., 2004; Hall et al., 2001; Maviel et al., 2004). La FIG. 9H representa patrones globales en la actividad del cerebro entre el recuerdo de condicionamiento (día 0) y remoto (día 28). Los niveles de actividad en CA1 disminuyeron significativamente en los ratones de control ($P < 0,005$) del día 0 al día 28. Los niveles de actividad en ACC aumentaron significativamente en tanto los ratones de control ($P < 0,0001$) como eNpHR3.1 ($P < 0,001$) del día 0 al día 28. Los niveles de actividad en BLA aumentaron significativamente en los ratones de control ($P < 0,001$) pero no en eNpHR3.1. Juntos estos datos señalan a una función para esta pequeña población de neuronas de CA1 en organizar los patrones de actividad del cerebro completo asociados a la memoria contextual remota.

La inhibición optogenética de ACC inhibe la memoria contextual remota pero no reciente. Como se encontró que la población de neuronas de CA1 activas durante la memoria contextual estuviera causalmente implicada en organizar completamente la actividad neuronal de ACC como se muestra anteriormente, y como la investigación previa ha implicado a la ACC en el almacenamiento de memoria de miedo remota (Bontempi et al., 1999; Fischer et al., 2007; Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004), se exploró la inhibición optogenética de memorias direccionando ACC directamente ya fuera un día o un mes tras el FC contextual. La FIG. 10A representa la expresión de eNpHR3.0 en la corteza cingulada anterior (ACC). De plena conformidad con estudios previos (Frankland et al., 2004), la inhibición optogenética de ACC no tuvo efecto sobre la memoria reciente ($75,9 \pm 5,4$ frente a $76 \pm 2,9$ % de bloqueo), pero alteró significativamente la memoria remota (Fig. 10B; Control $n=5$, $81,6 \pm 4,9$ % de bloqueo; eNpHR3.0 $n=5$, $53,8 \pm 11$ % de bloqueo; $P < 0,05$).

Se repitió el mismo experimento en un nuevo grupo de ratones, pero esta vez se administró iluminación prolongada durante 30 min antes de la prueba y luego durante la prueba. Otra vez se encontró que la inhibición optogenética de ACC alteró significativamente la memoria remota (Control $n=3$, $78,0 \pm 6,2$ % de bloqueo; eNpHR3.0 $n=8$, $15,9 \pm 5,2$ % de bloqueo; $P < 0,05$), pero no tuvo efecto sobre la memoria reciente (Fig. 10C; $78,5 \pm 12,7$ frente a $77,2 \pm 4,3$ % de bloqueo). A diferencia, cuando se direccionó otra región de entrada cortical importante para fines de control, los bulbos olfativos (OB), y se probó el efecto de inhibición optogenética durante tanto el recuerdo de miedo reciente como remoto, no se encontró efecto sobre el recuerdo en ningún momento de tiempo. Este resultado demuestra inmediatamente que una disminución repentina en una fuente importante de salida sináptica a la corteza no influye no específicamente en el recuerdo, y también señala a la especificidad de ACC en la memoria remota (de acuerdo con el trabajo previo). Juntos, estos hallazgos respaldan la importancia remota de la neocorteza, y también ilustran que incluso tras la reorganización cortical, existe un requisito por defecto para el hipocampo en recordar los trazados de memoria remota.

Se demostró recientemente el borrado irreversible de memorias remotas en el hipocampo y la corteza por administración de PKW (Migues et al; Pastalkova et al 2006; Shema et al 2009; Shema et al 2007) y en la amígdala por ablación selectiva de neuronas previamente marcadas (Han et al 2009). Por otra parte, los trazados de memoria remota que se supuso que se perdieron debido al daño neuronal estuvieron disponibles para recuerdo tras el enriquecimiento ambiental y las modificaciones de cromatina (Fischer et al 2007). La optogenética, por otra parte, permite la prevención de recuerdos reversibles, sin borrado de memoria permanente. El hallazgo de que el hipocampo es todavía el activador por defecto del recuerdo de memoria de miedo contextual puede ser debido al hecho que muchos ponen células (Moser et al 2008) en el re-trazado de CA1 en respuesta al condicionamiento de miedo (Moita et al 2004), y puede contribuir a un reconocimiento más rápido del contexto. De hecho, se mostró repetidamente que lesiones hipocámpicas inducían la amnesia retrógrada para memoria espacial (Broadbent et al 2006; Martin et al 2005).

Cuando se recuperan memorias remotas están disponibles para reconsolidación, que las hace susceptibles a la alteración, pero también pueden intensificar el trazado (Dudai 2006; Morris et al 2006; Nader y Hardt 2009; Tronson y Taylor 2007; Wang y Morris). La capacidad de apagar reversiblemente una memoria de miedo remota en tiempo real, antes y después de la reconsolidación, e incluso en tiempo real después de ya haya sido recuperada, puede abrir una excitante vía terapéutica para pacientes con PTSD, en los que una memoria perturbadora recurrente puede detenerse a medida que aparece, sin afectar permanentemente otras memorias. Adicionalmente, pueden inhibirse las memorias relacionadas con las drogas para reducir el comportamiento de búsqueda de drogas (Everitt et al 2001; Lee et al 2005; Robbins et al 2008). La capacidad de afectar instantáneamente la cognición por modulación optogenética de diferentes áreas del cerebro puede servir de base para futuros estudios que vuelven a examinar la función de poblaciones neuronales específicas en procesos de memoria y permitir una disección temporal, genética y espacial más fina de los circuitos neuronales que los subyacen.

Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para los fines de claridad de entendimiento, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Referencias

- Adamantidis, A.R., Zhang, F., Aravanis, A.M., Deisseroth, K., and de Lecea, L. (2007). Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450, 420-424.
- Anagnostaras, S.G., Maren, S., and Fanselow, M.S. (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci* 19, 1106-1114.
- Aravanis, A.M., Wang, L.P., Zhang, F., Meltzer, L.A., Mogri, M.Z., Schneider, M.B., and Deisseroth, K. (2007). An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J Neural Eng* 4, S143-156.
- Bolhuis, J.J., Stewart, C.A., and Forrest, E.M. (1994). Retrograde amnesia and memory reactivation in rats with ibotenate lesions to the hippocampus or subiculum. *Q J Exp Psychol B* 47, 129-150.
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., and Jaffard, R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400, 671-675.
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8, 1263-1268.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., and Clark, R.E. (2006). Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learn Mem* 13, 187-191.
- Cipolotti, L., and Bird, C.M. (2006). Amnesia and the hippocampus. *Curr Opin Neurol* 19, 593-598.
- Debiec, J., LeDoux, J.E., and Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36, 527-538.
- Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A.K., Miesenbock, G., Ting, A., and Schnitzer, M.J. (2006). Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci* 26, 10380-10386.
- Dudai, Y. (2006). Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol* 16, 174-178.
- Everitt, B.J., Dickinson, A., and Robbins, T.W. (2001). The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Res Brain Res Rev* 36, 129-138.
- Fanselow, M.S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110, 73-81.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., and Tsai, L.H. (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178-182.
- Frankland, P.W., and Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6, 119-130.
- Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., and Silva, A.J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304, 881-883.
- Gradinaru, V., Thompson, K.R., Zhang, F., Mogri, M., Kay, K., Schneider, M.B., and Deisseroth, K. (2007). Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27, 14231-14238.
- Gradinaru, V., Zhang, F., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Prakash, R., Diester, I., Goshen, I., Thompson, K.R., and Deisseroth, K. (2010). Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* 141, 154-165.
- Hall, J., Thomas, K.L., and Everitt, B.J. (2001). Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and

- amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci* 21, 2186-2193.
- Han, J.H., Kushner, S.A., Yiu, A.P., Hsiang, H.L., Buch, T., Waisman, A., Bontempi, B., Neve, R.L., Frankland, P.W., and Josselyn, S.A. (2009). Selective erasure of a fear memory. *Science* 323, 1492-1496.
- 5 Johansen, J.P., Hamanaka, H., Monfils, M.H., Behnia, R., Deisseroth, K., Blair, H.T., and LeDoux, J.E. (2010). Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12692-12697.
- Killcross, S., Robbins, T.W., and Everitt, B.J. (1997). Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* 388, 377-380.
- 10 Kim, J.J., and Fanselow, M.S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256, 675-677.
- Kitamura, T., Saitoh, Y., Takashima, N., Murayama, A., Niibori, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Sugiyama, H., and Inokuchi, K. (2009). Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell* 139, 814-827.
- LeDoux, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23, 155-184.
- 15 Lee, J.L., Di Ciano, P., Thomas, K.L., and Everitt, B.J. (2005). Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior. *Neuron* 47, 795-801.
- Lee, J.L., Milton, A.L., and Everitt, B.J. (2006). Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci* 26, 10051-10056.
- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24, 897-931.
- 20 Maren, S., Aharonov, G., and Fanselow, M.S. (1997). Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res* 88, 261-274.
- Maren, S., and Quirk, G.J. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5, 844-852.
- Martin, S.J., de Hoz, L., and Morris, R.G. (2005). Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* 43, 609-624.
- 25 Maviel, T., Durkin, T.P., Menzaghi, F., and Bontempi, B. (2004). Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305, 96-99.
- McHugh, T.J., Jones, M.W., Quinn, J.J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J.K., Lowell, B.B., Fanselow, M.S., Wilson, M.A., and Tonegawa, S. (2007). Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* 317, 94-99.
- 30 McHugh, T.J., and Tonegawa, S. (2007). Spatial exploration is required for the formation of contextual fear memory. *Behav Neurosci* 121, 335-339.
- Moita, M.A., Rosis, S., Zhou, Y., LeDoux, J.E., and Blair, H.T. (2004). Putting fear in its place: remapping of hippocampal place cells during fear conditioning. *J Neurosci* 24, 7015-7023.
- 35 Morris, R.G., Inglis, J., Ainge, J.A., Olverman, H.J., Tulloch, J., Dudai, Y., and Kelly, P.A. (2006). Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* 50, 479-489.
- Moscovitch, M., Nadel, L., Winocur, G., Gilboa, A., and Rosenbaum, R.S. (2006). The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 16, 179-190.
- 40 Moser, E.I., Kropff, E., and Moser, M.B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci* 31, 69-89.
- Nadel, L., and Moscovitch, M. (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7, 217-227.
- Nader, K., and Hardt, O. (2009). A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 10, 224-234.
- 45 Nakashiba, T., Young, J.Z., McHugh, T.J., Buhl, D.L., and Tonegawa, S. (2008). Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science* 319, 1260-1264.
- Phelps, E.A., and LeDoux, J.E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* 48, 175-187.
- 50 Riedel, G., Micheau, J., Lam, A.G., Roloff, E.L., Martin, S.J., Bridge, H., de Hoz, L., Poeschel, B., McCulloch, J., and Morris, R.G. (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 2, 898-905.
- Robbins, T.W., Ersche, K.D., and Everitt, B.J. (2008). Drug addiction and the memory systems of the brain. *Ann N Y Acad Sci* 1141, 1-21.
- 55 Shimizu, E., Tang, Y.P., Rampon, C., and Tsien, J.Z. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 290, 1170-1174.
- Squire, L.R., and Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5, 169-177.
- Squire, L.R., and Bayley, P.J. (2007). The neuroscience of remote memory. *Curr Opin Neurobiol* 17, 185-196.
- 60 Sutherland, R.J., O'Brien, J., and Lehmann, H. (2008). Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal, ventral, or complete hippocampal damage. *Hippocampus* 18, 710-718.
- Sutherland, R.J., Sparks, F.T., and Lehmann, H. (2010). Hippocampus and retrograde amnesia in the rat model: a modest proposal for the situation of systems consolidation. *Neuropsychologia* 48, 2357-2369.
- Tronson, N.C., and Taylor, J.R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8, 262-275.
- 65 Wang, H., Shimizu, E., Tang, Y.P., Cho, M., Kyin, M., Zuo, W., Robinson, D.A., Alaimo, P.J., Zhang, C.,

Morimoto, H., et al. (2003). Inducible protein knockout reveals temporal requirement of CaMKII reactivation for memory consolidation in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4287-4292.

Wang, S.H., and Morris, R.G. (2010). Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu Rev Psychol* 61, 49-79, C41-44.

5 Wang, S.H., Teixeira, C.M., Wheeler, A.L., and Frankland, P.W. (2009). The precision of remote context memories does not require the hippocampus. *Nat Neurosci* 12, 253-255.

Wiltgen, B.J., Zhou, M., Cai, Y., Balaji, J., Karlsson, M.G., Parivash, S.N., Li, W., and Silva, A.J. (2010). The Hippocampus Plays a Selective Role in the Retrieval of Detailed Contextual Memories. *Curr Biol* 20, 1336-1344.

10 Winocur, G., Frankland, P.W., Sekeres, M., Fogel, S., and Moscovitch, M. (2009). Changes in context-specificity during memory reconsolidation: selective effects of hippocampal lesions. *Learn Mem* 16, 722-729.

Winocur, G., Moscovitch, M., and Bontempi, B. (2010). Memory formation and long-term retention in humans and animals: convergence towards a transformation account of hippocampal-neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48, 2339-2356.

15 Winocur, G., Moscovitch, M., and Sekeres, M. (2007). Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nat Neurosci* 10, 555-557.

Zhang, F., Wang, L.P., Brauner, M., Liewald, J.F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P.G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., et al. (2007). Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446, 633-639.

Secuencias

20

La secuencia de aminoácidos de GtR3 sin la secuencia de péptidos señal (SEQ ID NO: 1)

```

A S S F G K A L L E F V F I V F A C I T L L L G I N A A K S K
A A S R V L F P A T F V T G I A S I A Y F S M A S G G G W V I
A P D C R Q L F V A R Y L D W L I T T P L L L I D L G L V A G
V S R W D I M A L C L S D V L M I A T G A F G S L T V G N V K
W V W W F F G M C W F L H I I F A L G K S W A E A A K A K G G
D S A S V Y S K I A G I T V I T W F C Y P V V W V F A E G F G
N F S V T F E V L I Y G V L D V I S K A V F G L I L M S G A A
T G Y E S I
    
```

25

La secuencia de aminoácidos de GtR3 con la secuencia de péptidos señal de ChR2 (SEQ ID NO: 2)

```

M D Y G G A L S A V G R E L L F V T N P V V V N G S V L V P E
D Q C Y C A G W I E S R G T N G A S S F G K A L L E F V F I V
F A C I T L L L L G I N A A K S K A A S R V L F P A T F V T G I
A S I A Y F S M A S G G G W V I A P D C R Q L F V A R Y L D W
L I T T P L L L I D L G L V A G V S R W D I M A L C L S D V L
M I A T G A F G S L T V G N V K W V W W F F G M C W F L H I I
F A L G K S W A E A A K A K G G D S A S V Y S K I A G I T V I
T W F C Y P V V W V F A E G F G N F S V T F E V L I Y G V L D
V I S K A V F G L I L M S G A A T G Y E S I
    
```

ES 2 661 093 T3

La secuencia de aminoácidos de NpHR sin la secuencia de péptidos señal (SEQ ID NO: 3)

V T Q R E L F E F V L N D P L L A S S L Y I N I A L A G L S I
L L F V F M T R G L D D P R A K L I A V S T I L V P V V S I A
S Y T G L A S G L T I S V L E M P A G H F A E G S S V M L G G
E E V D G V V T M W G R Y L T W A L S T P M I L L A L G L L A
G S N A T K L F T A I T F D I A M C V T G L A A A L T T S S H
L M R W F W Y A I S C A C F L V V L Y I L L V E W A Q D A K A
A G T A D M F N T L K L L T V V M W L G Y P I V W A L G V E G

I A V L P V G V T S W G Y S F L D I V A K Y I F A F L L L N Y
L T S N E S V V S G S I L D V P S A S G T P A D D

5

La secuencia de aminoácidos de NpHR con la secuencia de péptidos señal (SEQ ID NO: 4)

M T E T L P P V T E S A V A L Q A E V T Q R E L F E F V L N D
P L L A S S L Y I N I A L A G L S I L L F V F M T R G L D D P
R A K L I A V S T I L V P V V S I A S Y T G L A S G L T I S V
L E M P A G H F A E G S S V M L G G E E V D G V V T M W G R Y
L T W A L S T P M I L L A L G L L A G S N A T K L F T A I T F
D I A M C V T G L A A A L T T S S H L M R W F W Y A I S C A C
F L V V L Y I L L V E W A Q D A K A A G T A D M F N T L K L L
T V V M W L G Y P I V W A L G V E G I A V L P V G V T S W G Y
S F L D I V A K Y I F A F L L L N Y L T S N E S V V S G S I L
D V P S A S G T P A D D

10

La secuencia de aminoácidos de eNpHR3.0 (SEQ ID NO: 5)

M T E T L P P V T E S A V A L Q A E V T Q R E L F E F V L N D P L L A S S L Y I N I A L A G L S I L L F V F M T R G L D D
P R A K L I A V S T I L V P V V S I A S Y T G L A S G L T I S V L E M P A G H F A E G S S V M L G G E E V D G V V T M W G
R Y L T W A L S T P M I L L A L G L L A G S N A T K L F T A I T F D I A M C V T G L A A A L T T S S H L M R W F W Y A I S
C A C F L V V L Y I L L V E W A Q D A K A A G T A D M F N T L K L L T V V M W L G Y P I V W A L G V E G I A V L P V G V T
S W G Y S F L D I V A K Y I F A F L L L N Y L T S N E S V V S G S I L D V P S A S G T P A D D A A A K S R I T S E G E Y I
P L D Q I D I N V V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K
L P V P W P T L V T T F G Y G L Q C F A R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K
F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G
S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S Y Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T L G M D E
L Y K F C Y E N E V

15

ES 2 661 093 T3

La secuencia de aminoácidos de eNpHR3.1 (SEQ ID NO: 6)

MVTQRELFEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPRAKLIAVSTILVPVVS
IASYTGLASGLTISVLEMPAGHFAEGSSVMLGGEEVDGVVVTMWGRYLTWALSTPMILLALG
LLAGSNATKLFATAITFDIAMCVTGLAAALTTSSHLMRWFYAI SCACFLVVLYILLVEWAQ
DAKAAGTADMFN TLKLLTVVMWLGYPVWALGVEGIAVLPVGVTSWGYSFLDIVAKYIFAF
LLNLYLTSNESVVS S I L D V P S A S G T P A D D A A A K S R I T S E G E Y I P L D Q I D I N V V S K G E E L F
T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T F G Y G L Q
C F A R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F
K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G
P V L L P D N H Y L S Y Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K F C Y E N E V

5

La secuencia de aminoácidos de BR (SEQ ID NO: 7)

M L E L L P T A V E G V S Q A Q I T G R P E W I W L A L G T A
L M G L G T L Y F L V K G M G V S D P D A K K F Y A I T T L V
P A I A F T M Y L S M L L G Y G L T M V P F G G E Q N P I Y W
A R Y A D W L F T T P L L L L D L A L L V D A D Q G T I L A L
V G A D G I M I G T G L V G A L T K V Y S Y R F V W W A I S T
A A M L Y I L Y V L F F G F T S K A E S M R P E V A S T F K V
L R N V T V V L W S A Y P V V W L I G S E G A G I V P L N I E
T L L F M V L D V S A K V G F G L I L L R S R A I F G E A E A
P E P S A G D G A A A T S D

10

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que codifica una proteína activada por la luz para su uso en un método de tratamiento del trastorno de estrés postraumático (PTSD) en un individuo, en donde dicho método comprende:
- 5 administrar el polinucleótido que codifica la proteína activada por la luz al campo CA1 dorsal del hipocampo, la corteza cingulada anterior del individuo o la amígdala basolateral del individuo en donde la proteína activada por la luz se expresa sobre la membrana celular de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo, la corteza cingulada anterior o la amígdala basolateral del individuo, y la
- 10 proteína es sensible a la luz y es capaz de hiperpolarización de las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, y
- activar la proteína mediante la luz para inhibir reversiblemente la formación o la recuperación de una memoria de miedo, tratando así el PTSD en el individuo.
- 15 2. El polinucleótido para su uso según la reivindicación 1, en el que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en más del 90 % a NpHR de SEQ ID NO: 3, idéntica en más del 90 % a BR de SEQ ID NO: 7 o idéntica en más del 90 % a GtR3 de SEQ ID NO: 1.
3. El polinucleótido para su uso según la reivindicación 2, en el que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95 % a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3.
- 20 4. El polinucleótido para su uso según la reivindicación 3, en el que la proteína comprende además una señal de exportación de retículo endoplásmico (RE) y/o una señal de tráfico de membrana.
5. El polinucleótido para su uso según la reivindicación 4, en el que la secuencia de aminoácidos está unida a la señal de exportación de RE mediante un conector.
- 25 6. El polinucleótido para su uso según la reivindicación 4, en el que la señal de exportación de RE comprende la secuencia de aminoácidos FCYENEV o en el que la señal de tráfico de membrana comprende
- 30 KSRITSEGEYIPLDQIDINV.
7. El polinucleótido para su uso según la reivindicación 6, en el que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.
- 35 8. El polinucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polinucleótido es un vector.
9. El polinucleótido para su uso según la reivindicación 8, en el que el vector es un vector viral seleccionado del grupo que consiste en un vector de AAV, un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector de VHS y un vector lentiviral.
- 40 10. El polinucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el individuo es un animal humano o no humano.
- 45 11. Un método de cribado de un agente farmacológico que afecta a la recuperación o la formación de una memoria de miedo, comprendiendo el método:
- a) poner en contacto con un agente farmacológico neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo, la corteza cingulada anterior o la amígdala basolateral durante la recuperación o la formación de
- 50 una memoria de miedo en un ratón, en donde dicho ratón comprende una proteína activada por la luz expresada sobre la membrana celular de neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal de su hipocampo, su corteza cingulada anterior o su amígdala basolateral, en donde la proteína es sensible a la luz y es capaz de hiperpolarizar las neuronas cuando las neuronas son iluminadas con la luz, en donde la iluminación de las neuronas inhibe la formación o la
- 55 recuperación de una memoria de miedo;
- b) inducir la hiperpolarización de las neuronas excitadoras en el campo CA1 dorsal del hipocampo durante la recuperación o la formación de memoria de una memoria de miedo, aplicando luz de una longitud de onda que activa la proteína activada por la luz; y
- c) determinar si el agente farmacológico afecta a la recuperación o la formación de una memoria de miedo en presencia o ausencia de la luz.
- 60 12. El método de la reivindicación 11, en el que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en más del 90 % a NpHR de SEQ ID NO: 3, idéntica en más del 90 % a BR de SEQ ID NO: 7 o idéntica en más del 90 % a GtR3 de SEQ ID NO: 1.
- 65

13. El método de la reivindicación 12, en el que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en el 95 % a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3, opcionalmente en el que la proteína comprende además una señal de exportación de retículo endoplásmico (RE) y/o una señal de tráfico de membrana, y opcionalmente en el que la secuencia de aminoácidos está unida a la señal de exportación de RE mediante un conector.

5

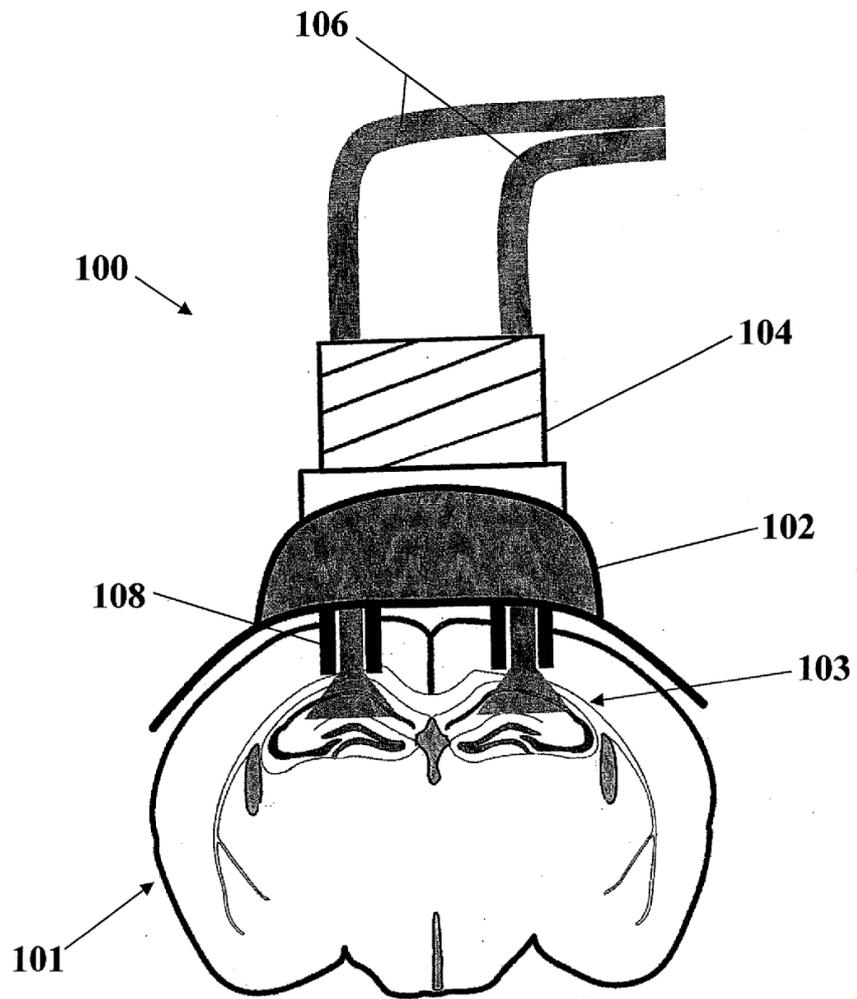


FIG. 1

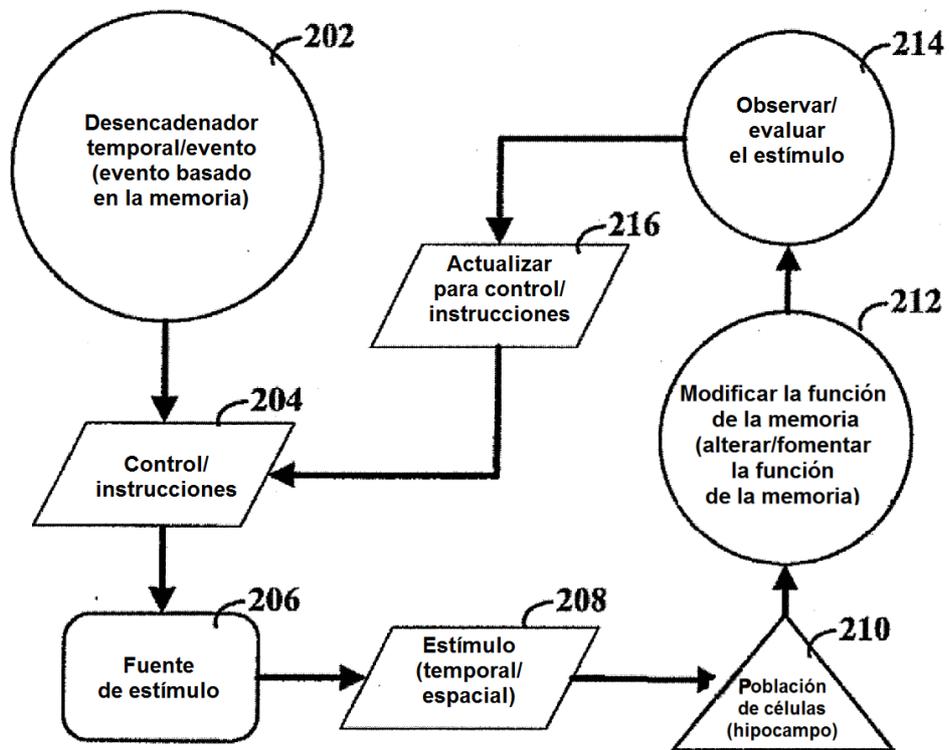


FIG. 2

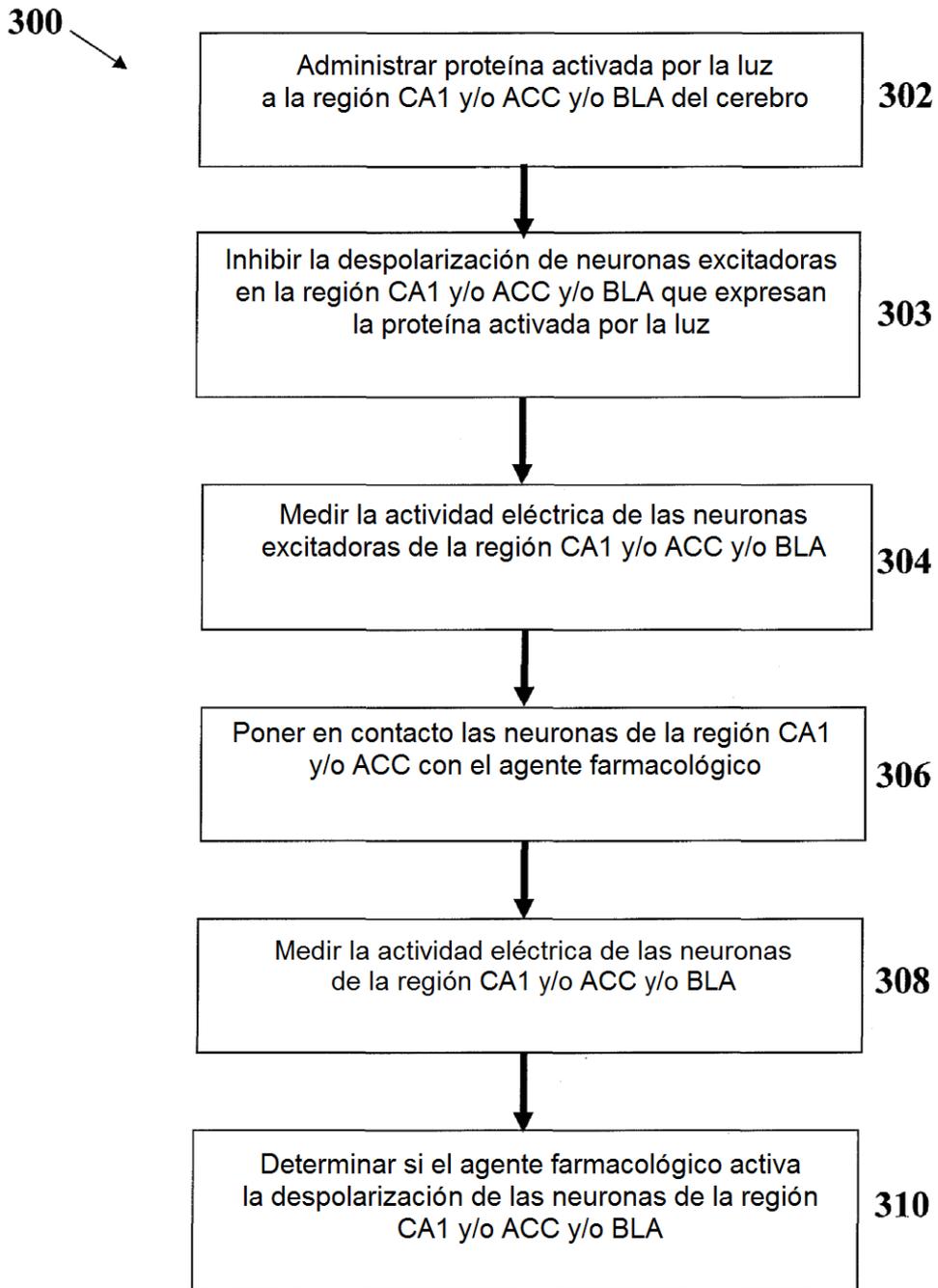


FIG. 3A

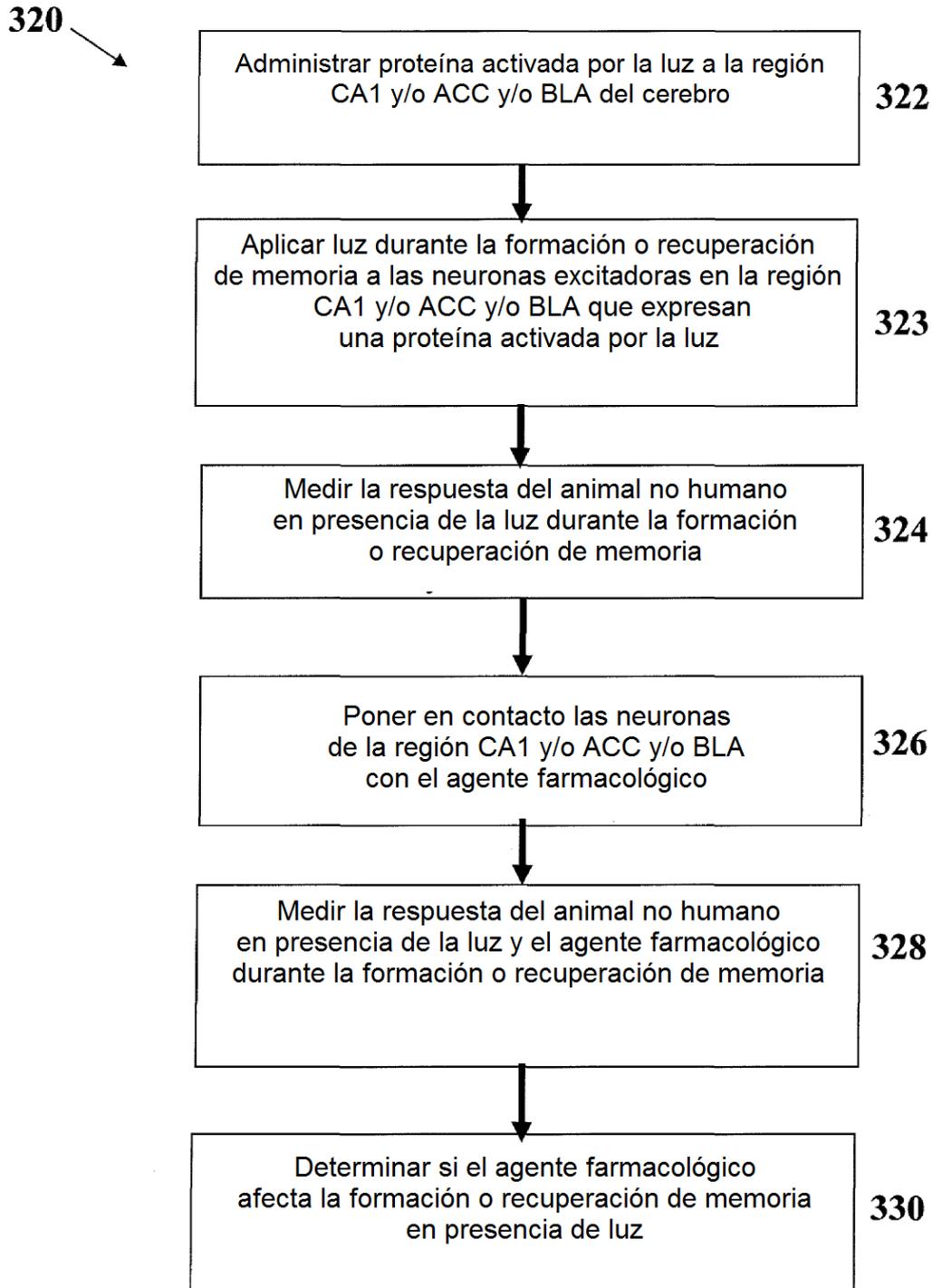


FIG. 3B

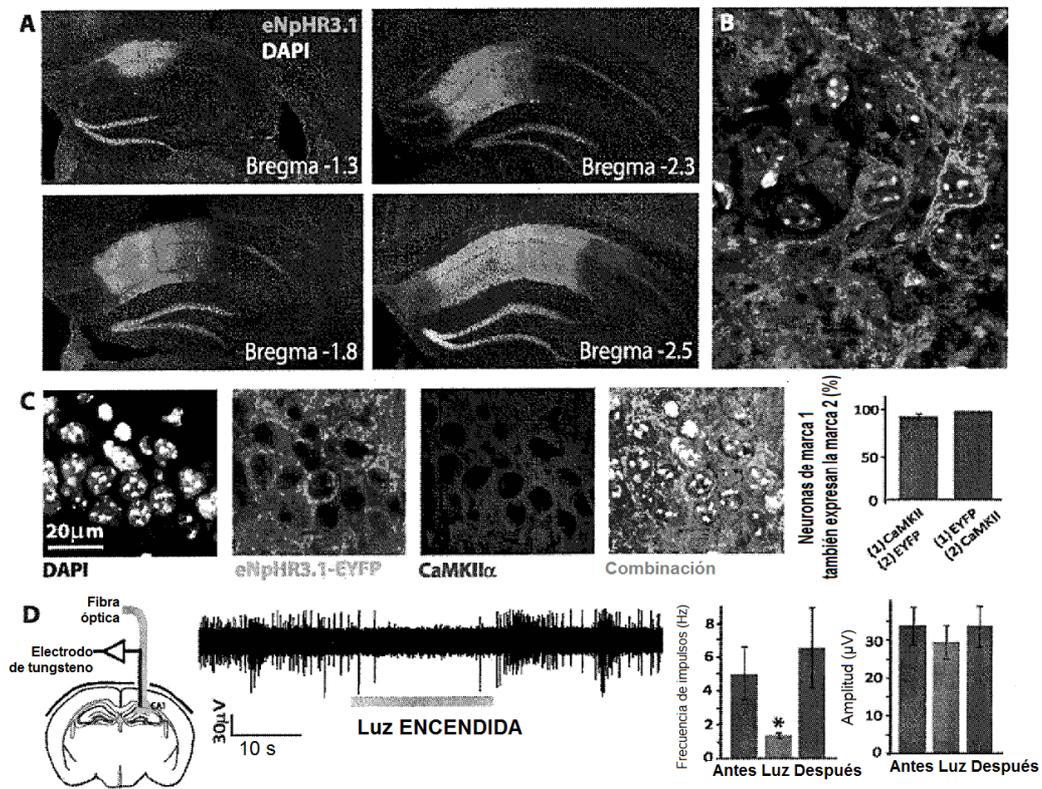


FIG. 4

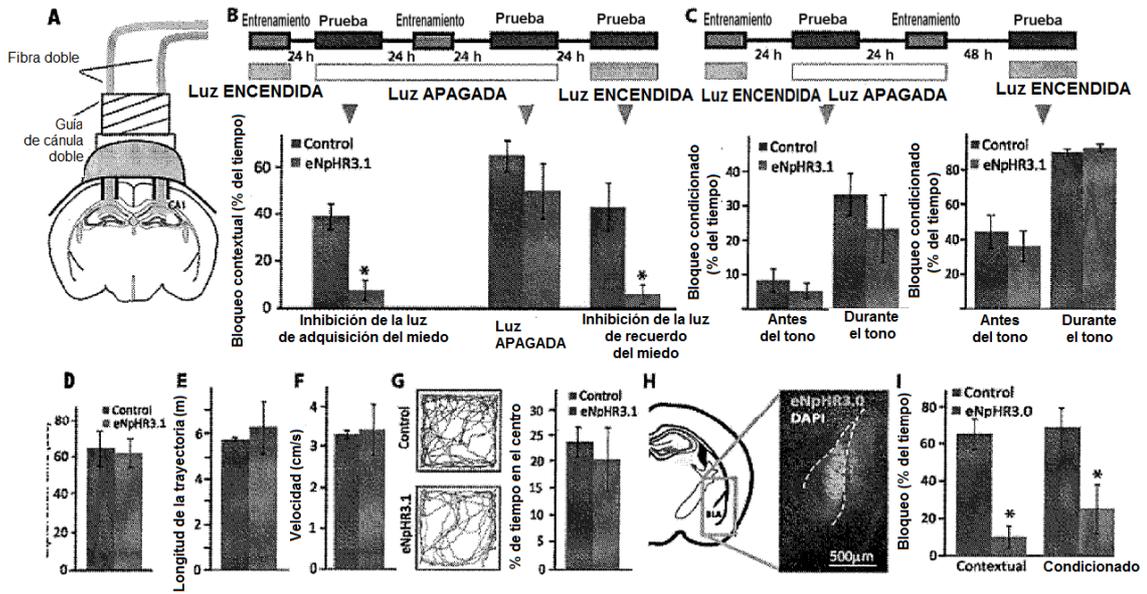


FIG. 5

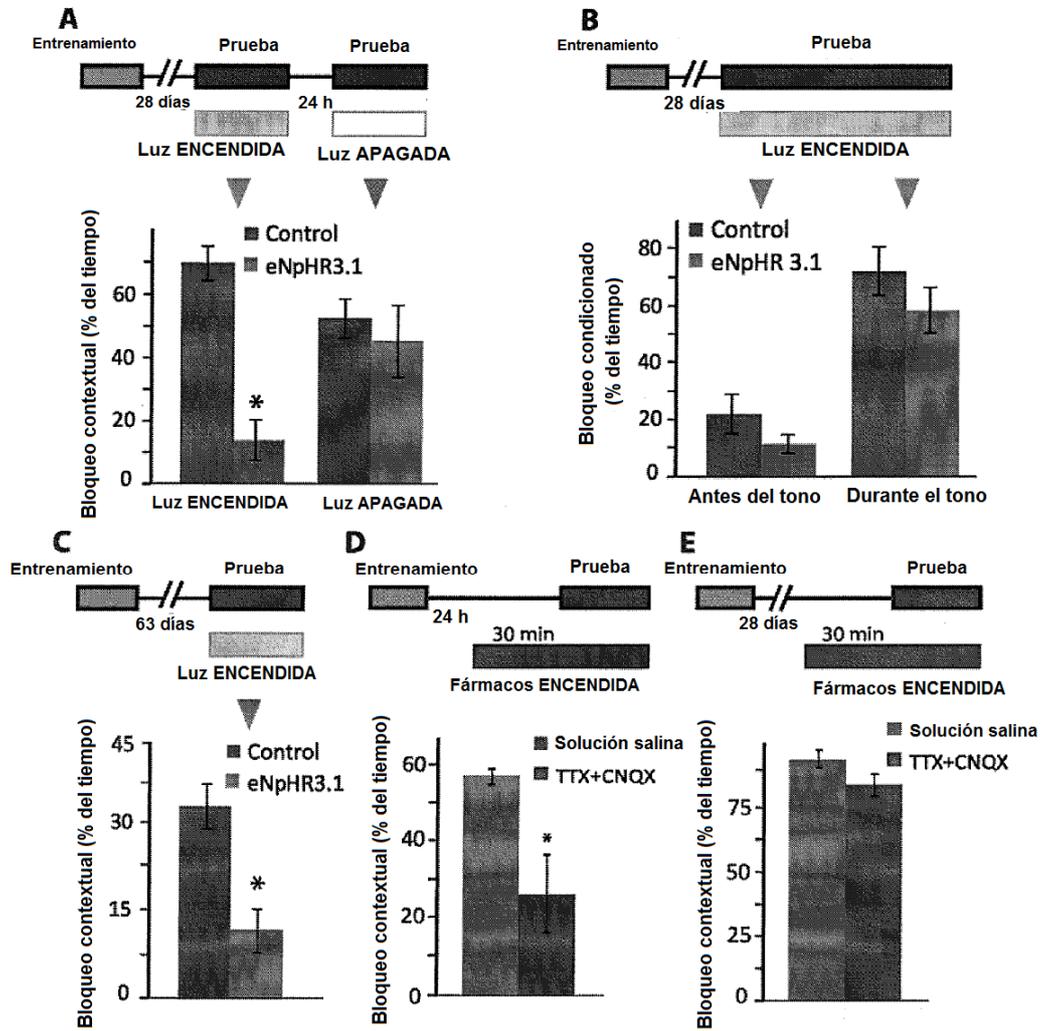


FIG. 6

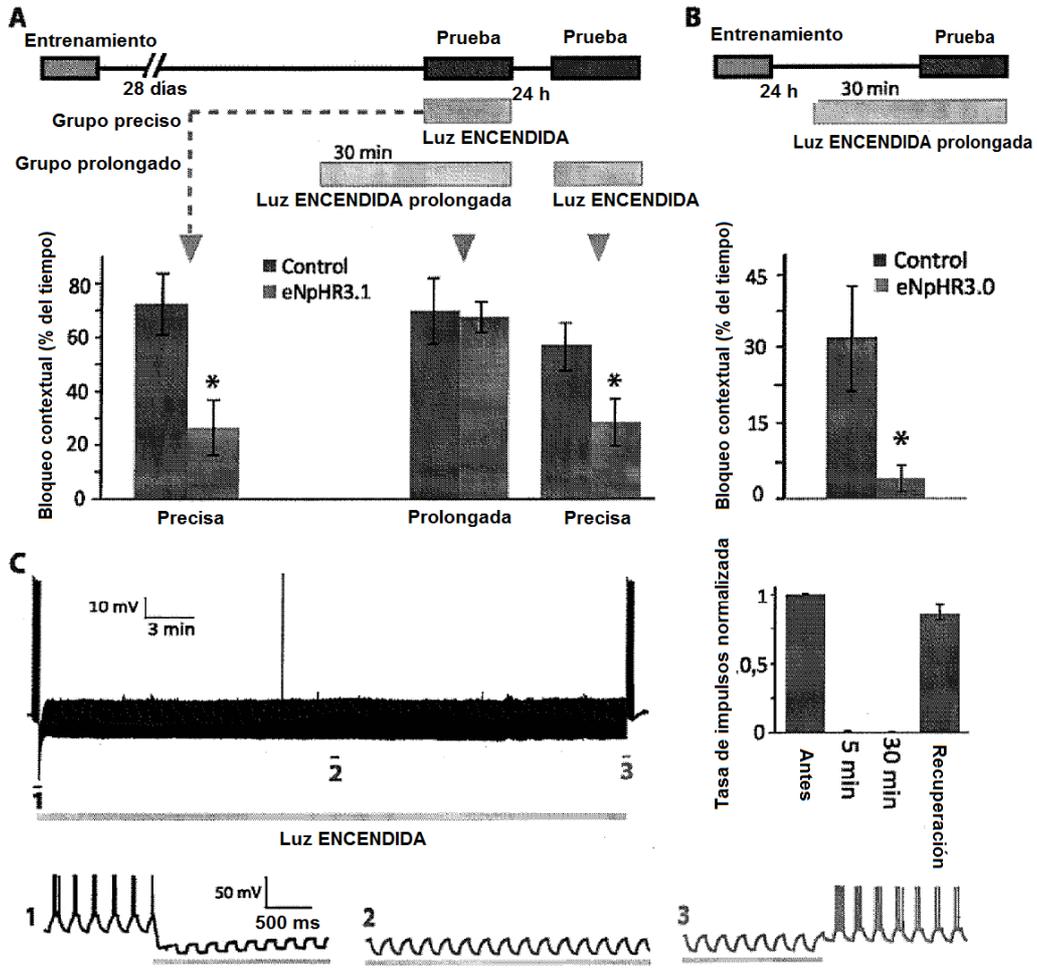


FIG. 7

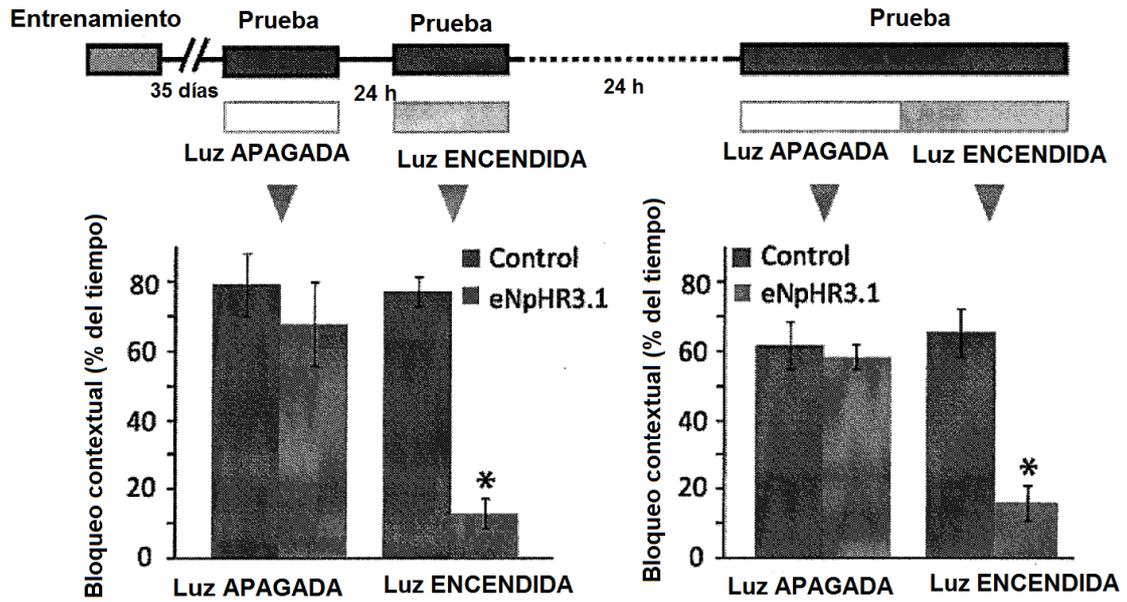


FIG. 8

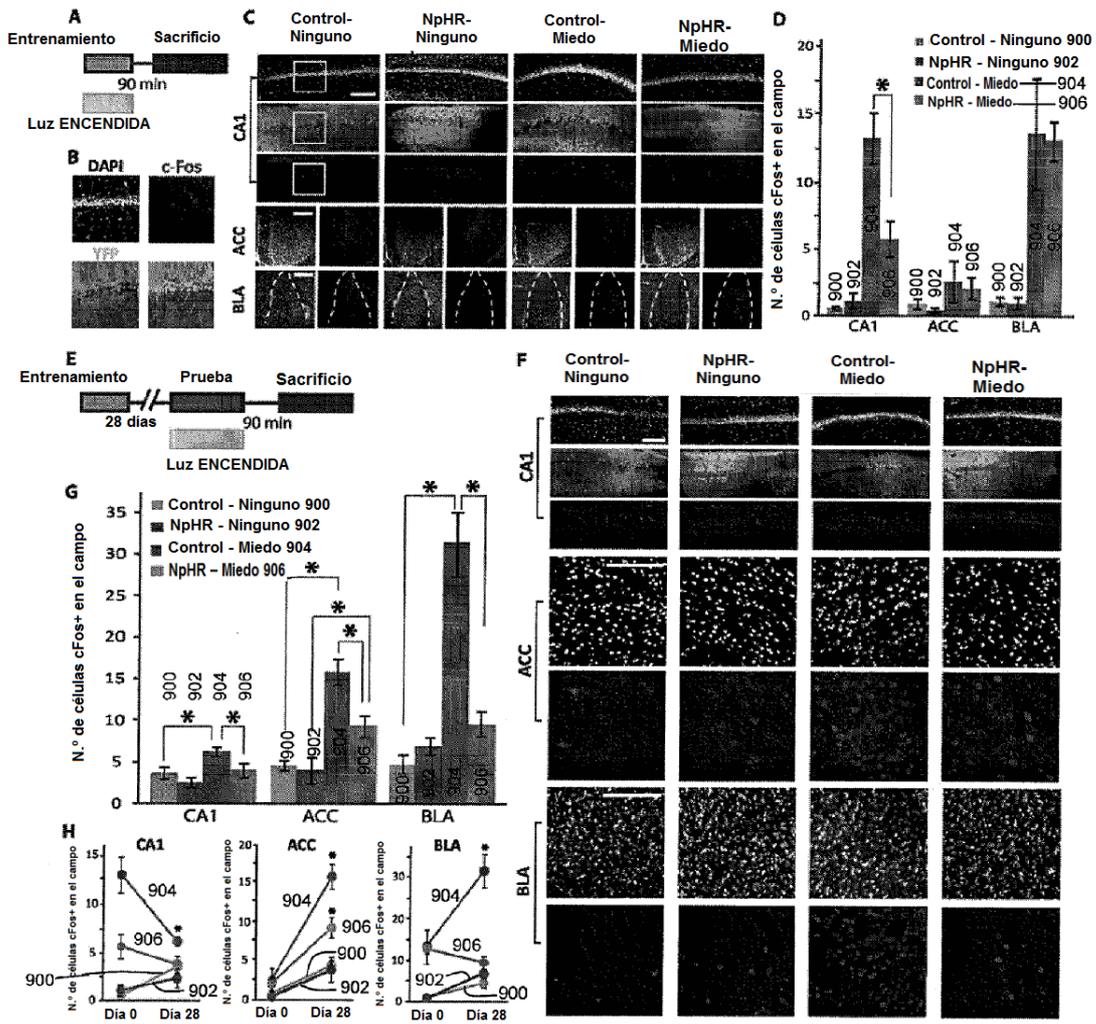


FIG. 9

