

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 962**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**A01K 67/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2011 PCT/US2011/059383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061741**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2011 E 11838895 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2635110**

54 Título: **Control y caracterización de estados psicóticos**

30 Prioridad:

**05.11.2010 US 410720 P**  
**05.11.2010 US 410725 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.09.2018**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)  
Office of the General Counsel Building 170, 3rd  
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386  
Stanford CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**DEISSEROTH, KARL;  
SOHAL, VIKAS y  
GUNAYDIN, LISA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 682 962 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 estados psicóticos

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere a métodos para inducir psicosis en animales no humanos utilizando proteínas opsina sensibles a la luz, expresadas en las membranas plasmáticas de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal y a métodos para identificar o cribar un compuesto que puede utilizarse para tratar psicosis.

**Antecedentes de la invención**

La esquizofrenia afecta a aproximadamente un 1 % de la población mundial y se encuentra entre las 10 primeras causas de discapacidad en los países desarrollados, sin embargo, las farmacoterapias actuales suelen ser ineficaces e inducen graves efectos secundarios que limitan el tratamiento. Está muy extendida la creencia de que tras una disfunción de la corteza prefrontal (CPF) subyacen muchos de los aspectos más debilitantes de la esquizofrenia (1, 2); sin embargo, no ha sido posible establecer la relación causal de aspectos específicos de la fisiología celular con la disfunción prefrontal en la esquizofrenia. Para investigar un posible fundamento en las células de la conducta psicótica y la cognición deteriorada observada en la esquizofrenia y las afecciones relacionadas, los autores de la invención han tratado de identificar patrones de comportamiento celular que (1) tienen lugar en neuronas pertinentes para las conductas psicóticas, (2) derivan de múltiples manipulaciones farmacológicas o genéticas relacionadas con la esquizofrenia y (3) retienen la validez aparente como endofenotipos celulares para psicosis.

Se cree que muchos aspectos debilitantes de la esquizofrenia son el resultado de una disfunción de la corteza prefrontal, aunque la fisiología de dicha disfunción sigue siendo un misterio, ya que los patrones de actividad patogénicos específicos en las neuronas prefrontales siguen siendo desconocidos. Identificar y comprender las rutas neuronales relacionadas con los patrones de actividad relacionados con la psicosis dentro de la región de la PFC puede ayudar a descubrir terapias farmacológicas para tratar a pacientes con esquizofrenia. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de un sistema de modelo animal útil para la esquizofrenia que permita identificar estas intrincadas rutas patogénicas neuronales. Dicho sistema de modelo animal permitiría el cribado y la identificación de terapias farmacológicas para mejorar los patrones patogénicos de actividad neuronal que contribuyen a los síntomas de la esquizofrenia.

Arenkiel et al., Neuron 54, 205-218, 19 de abril de 2007, describe la activación inducida por luz *in vivo* en un circuito neuronal en ratones transgénicos que expresan canal rodopsina-2. Wang et al., Proc Natl. Acad. Sci EE. UU. 104, 8143-8148, 2007 describe un mapeo de alta velocidad de conectividad sináptica utilizando fotoestimulación en ratones transgénicos con canalrodopsina-2. Miella et al., Psychopharmacology (2010) 211:355-366, describe los papeles contrarios de dopamina y orexina en consumo excesivo de alcohol inducido por quinpirol en un modelo de rata con polidipsia psicótica. La patente estadounidense 2009/0088680 se refiere a un método de interfaz de tejido óptico y un aparato para estimular células. La patente estadounidense 2008/0060088 se refiere a ratones en los que se ha desactivado fosfolipasa C beta como sistema de modelo para analizar fármacos de esquizofrenia. La patente internacional 2010/056970 describe la estimulación óptica de células diana utilizando luz, p.ej., *in vivo* o *in vitro*. Yizhar et al., Nature 477, 171-178, 2011 describe el equilibrio excitación/inhibición neocortical en el procesamiento de información y disfunción social. La patente internacional WO 2012/061744 describe opsinas de función escalonada y métodos para su uso.

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un método para inducir psicosis en un mamífero no humano que comprende una opsina sensible a la luz expresada en la membrana celular de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal, en el que la opsina sensible a la luz es *Chlamydomonas reinhardtii* ChR2 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicho método la activación de la opsina sensible a la luz con luz, en el que la activación con luz de la opsina induce la despolarización de la membrana celular, en virtud de lo cual se induce un estado psicótico en el mamífero.

La invención proporciona asimismo un método de cribado de un compuesto que puede ser útil para el tratamiento de psicosis, comprendiendo dicho método: medir un estado psicótico de un mamífero no humano antes y después de administrar el compuesto en la corteza prefrontal del mamífero, en el que el mamífero no humano comprende una opsina sensible a la luz expresada en la membrana celular de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal, en el que la opsina sensible a la luz es *Chlamydomonas reinhardtii* ChR2 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, y en el que el estado psicótico está inducido por activación de luz de la opsina sensible a la luz, en el que la activación de luz de la opsina induce la despolarización de la membrana; en el que una mejora en una o más mediciones del estado

psicótico tras la administración del compuesto indica que el compuesto puede ser útil para el tratamiento de psicosis.

La invención proporciona asimismo un método de cribado de un compuesto que puede ser útil para el tratamiento de psicosis, que comprende: medir la respuesta celular en un corte de tejido de corteza prefrontal, obtenido de un mamífero no humano que comprende una opsina sensible a la luz expresada en la membrana celular de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal antes y después de incubar el corte de tejido con el compuesto, en el que la opsina sensible a la luz es *Chlamydomonas reinhardtii* ChR2 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, en el que la respuesta celular está inducida por la despolarización de la membrana de las neuronas inducidas por la activación de la opsina sensible a la luz; en el que una mejora en las lecturas de la respuesta celular tras la incubación con el compuesto indica que el compuesto puede ser útil para el tratamiento de psicosis.

La presente divulgación establece también ("proporciona") una serie de productos y métodos, tal como se explica en el presente documento a continuación, que pueden facilitar la comprensión de la presente invención, que se define en las reivindicaciones.

En algunos aspectos, se proporcionan en el presente documento animales no humanos que comprenden una opsina sensible a la luz expresada en la membrana celular de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal, en los que la activación con luz de la opsina induce la despolarización de la membrana, y en los que la iluminación del opsina con la luz induce la psicosis del animal. En algunas realizaciones, el subconjunto de neuronas piramidales de la capa V tiene una única dendrita apical grande. En algunas realizaciones, la opsina se selecciona del grupo que consiste en ChR2, VChR1 y DChR. En otra realización, la opsina se selecciona del grupo que consiste en SFO, SSFO, C1V1, C1V1-E122T, C1V1-E162T y C1V1-E122T / E162T.

En otros aspectos, se proporcionan en el presente documento métodos para inducir psicosis en un animal no humano que comprenden expresar una opsina sensible a la luz en la membrana celular de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal del animal, en los que la opsina induce la despolarización de la membrana con luz, y en los que la iluminación de la opsina con la luz induce la psicosis del animal. En otros aspectos, se proporcionan en el presente documento métodos para inducir psicosis en un animal no humano, que comprenden activar una opsina sensible a la luz con luz, en los que la opsina sensible a la luz se expresa en la membrana celular de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal del animal, y en los que la activación con luz de la opsina induce la despolarización de la membrana celular e induce psicosis en el animal. En algunas realizaciones, el subconjunto de neuronas piramidales de la capa V tiene una única dendrita apical grande. En algunas realizaciones, la opsina se selecciona del grupo que consiste en ChR2, VChR1 y DChR. En otra realización, la opsina se selecciona del grupo que consiste en SFO, SSFO, C1V1, C1V1-E122T, C1V1-E162T y C1V1-E122T/E162T.

En otros aspectos, se proporcionan en el presente documento cortes de tejido de corteza prefrontal que comprenden un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V, en los que una opsina sensible a la luz se expresa en la membrana celular de las dendritas apicales en las neuronas piramidales de la capa V y la activación con luz de la opsina sensible a la luz induce la despolarización de la membrana. En algunas realizaciones, el subconjunto de neuronas piramidales de la capa V tiene una única dendrita apical grande. En algunas realizaciones, la opsina se selecciona del grupo que consiste en ChR2, VChR1 y DChR. En otra realización, la opsina se selecciona del grupo que consiste en SFO, SSFO, C1V1, C1V1-E122T, C1V1-E162T y C1V1-E122T / E162T.

En otros aspectos más, se proporcionan en el presente documento métodos de selección de un compuesto que puede ser útil para tratar la psicosis, que comprende medir el estado psicótico de un animal no humano antes y después de administrar el compuesto a la corteza prefrontal del animal, en el que el estado psicótico es inducido por la activación con luz de una opsina sensible a la luz expresada en la membrana celular en las neuronas piramidales de la capa V de un sujeto animal, y la activación de la opsina induce la despolarización de la membrana; en el que una mejora en una o más de las mediciones del estado psicótico después de la administración del compuesto indica que el compuesto puede ser útil para tratar la psicosis. En algunas realizaciones, la medición del estado psicótico es una medición de la conducta. En algunas realizaciones, la medición del estado psicótico es una medición celular. En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de administración de un agonista de D2 al animal antes de la administración del compuesto.

En algunos aspectos, se proporcionan en el presente documento métodos de selección de un compuesto que puede ser útil para tratar la psicosis, que comprende: medir un estado psicótico de un corte de tejido de corteza prefrontal antes y después de incubar el corte de tejido con el compuesto, en los que el corte de tejido de corteza prefrontal comprende neuronas piramidales de la capa V del sujeto y se expresa una opsina sensible a la luz en la membrana celular de las neuronas piramidales de la capa V del sujeto, en los que el estado psicótico es inducido por la despolarización de la membrana de las neuronas inducida por la activación de la opsina sensible a la luz; en los que una mejora en una o más de las lecturas del estado psicótico tras la incubación con el compuesto indica que el compuesto puede ser útil para tratar psicosis. En algunas realizaciones, la medición del estado psicótico es una medición celular. En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de incubación de un agonista de D2 con el corte de tejido de la corteza prefrontal antes de la incubación con el compuesto.

La presente divulgación se refiere a la identificación de poblaciones de células neuronales relacionadas con diversos trastornos psiquiátricos, tal como se describe en el presente documento. Si bien la presente divulgación no se limita necesariamente a dichos contextos, es posible apreciar diversos aspectos de la invención a través de la explicación de ejemplos en los que se aplican éstos y otros contextos.

5 Los aspectos de la presente divulgación están dirigidos a un método para identificar poblaciones de células neuronales relacionadas con diversos trastornos psiquiátricos. El método incluye proporcionar estimulación óptica a una población de neuronas diana que expresa una opsina sensible a la luz. Se mide un primer patrón eléctrico de una población de células neuronales diana como respuesta a la estimulación óptica. A continuación, se introduce un fármaco, conocido por inducir un trastorno de interés, en la población de células neuronales diana. Se vuelve a proporcionar estimulación óptica a la población de neuronas diana. Se mide un subsiguiente patrón eléctrico de la población de células neuronales diana, como respuesta a la estimulación óptica. Se comparan el primer patrón eléctrico y el subsiguiente patrón eléctrico. La comparación de los patrones eléctricos puede servir para determinar, por ejemplo, qué neuronas participan en la creación de un estado de tipo patológico. Una vez identificada una población específica de neuronas, pueden focalizarse los posibles tratamientos posteriores en la población específica de neuronas. Alternativamente, se pueden realizar otros estudios de la población específica de neuronas para determinar los mecanismos que se esconden tras la conducta aberrante, por ejemplo.

20 Los aspectos de la presente divulgación están dirigidos a comparar la actividad eléctrica de una población de neuronas diana de interés antes y después de introducir un fármaco conocido por inducir un trastorno de interés. Se proporciona un estímulo antes y después de introducir el fármaco y se comparan los patrones de respuesta eléctrica con el fármaco. El estímulo puede ser, por ejemplo, un estímulo óptico, un estímulo eléctrico o un estímulo magnético.

25 En ciertas realizaciones específicas, se selecciona un área de interés dentro del cerebro. Dicha selección puede realizarse sobre la base del conocimiento previo en lo que respecta a la función del cerebro y los mecanismos por los cuales funcionan los fármacos focalizados en los trastornos psiquiátricos. Por ejemplo, anteriormente, se han relacionado las neuronas piramidales de la capa V con ciertas formas de psicosis. Los aspectos de la presente divulgación permitieron identificar un subconjunto de neuronas piramidales relacionadas con la conducta psicótica examinando las neuronas piramidales de la capa V aplicando una combinación de estimulación óptica e inducción de la conducta aberrante en un sujeto mediante la introducción de sustancias que, según se ha observado previamente inducen la conducta aberrante.

35 Dicha identificación de una población de neuronas relacionada con la conducta psicótica permite el examen eficiente de posibles tratamientos para diversas conductas psicóticas. Una vez conocida la reacción de una neurona en particular durante la psicosis y que se ha comparado con la reacción cuando no se ha introducido la psicosis, es posible examinar diversos tratamientos basados en la capacidad del tratamiento para devolver la reacción neuronal a su estado basal.

40 Ciertos aspectos de la presente divulgación también están dirigidos también a obtener una mejor comprensión de los mecanismos dentro del cerebro y una población de neuronas en particular que causa psicosis. Una vez identificada una neurona de interés en particular, pueden estudiarse con mayor detalle los canales dentro de la neurona, así como las rutas que conectan la neurona con otras neuronas. Esto puede conducir a una nueva introspección en lo que respecta a la causa de diversas formas de psicosis.

45 La presente divulgación se refiere además a poblaciones de células neuronales específicas relacionadas con diversos trastornos psiquiátricos, incluyendo psicosis (y/o síntomas de psicosis), tal como se describe en el presente documento. Si bien la presente divulgación no está necesariamente limitada en estos contextos, es posible apreciar diversos aspectos de la invención a través de la explicación de ejemplos en los que se utilizan éstos y otros contextos.

50 Aspectos de la presente divulgación están dirigidos a un método para implicar una población de células neuronales específica relacionada con diversos trastornos psiquiátricos, incluyendo psicosis (y/o los síntomas de psicosis). Dicho método incluye proporcionar estimulación óptica a una población de neuronas diana que expresa una opsina sensible a la luz. Se mide un primer patrón eléctrico de una población de células neuronales diana como respuesta a la estimulación óptica. A continuación, se introduce un fármaco, conocido por inducir los síntomas de la psicosis, en la población de células neuronales diana. Se vuelve a proporcionar estimulación óptica a la población de neuronas diana. Se mide un subsiguiente patrón eléctrico de la población de células neuronales diana, como respuesta a la estimulación óptica. Se comparan el primer patrón eléctrico y el subsiguiente patrón eléctrico. La comparación de los patrones eléctricos puede emplearse para determinar, por ejemplo, qué neuronas participan para crear un estado de tipo patológico. Una vez identificada una población de neuronas específica, los posibles tratamientos posteriores pueden dirigirse a la población de neuronas específica. Alternativamente, se pueden realizar otros estudios de la población de neuronas específica para determinar los mecanismos que se esconden tras la conducta aberrante, por ejemplo. En ciertas realizaciones, los estudios adicionales pueden realizarse utilizando diversos estímulos que incluyen estímulos ópticos, estímulos eléctricos y/o estímulos magnéticos.

Aspectos de la presente divulgación están dirigidos a inducir una patología controlando las propiedades de una población de neuronas diana conocida por su relación con la psicosis. Las neuronas de la población de neuronas diana tienen una única dendrita apical grande. La población de neuronas diana se modifica con una molécula sensible a la luz. Se proporciona luz a la población de neuronas diana, activando así la molécula sensible a la luz. Se introduce un fármaco en la población de neuronas diana, lo que provoca que el potencial de membrana de las neuronas permanezca elevado después de la eliminación de la luz. El potencial de membrana elevado tiene como resultado una respuesta celular modificada al estímulo, así como la activación de la neurona cuando no está presente el estímulo. Los resultados experimentales muestran que un sujeto, que tiene esta actividad neuronal inducida en ciertas poblaciones de neuronas que tienen una única dendrita apical grande presenta conductas que se corresponden con la psicosis.

En realizaciones más específicas, dicha actividad neuronal modificada se emplea para ayudar a determinar posibles tratamientos para la psicosis. Es posible inducir la patología antes de examinar diversos posibles tratamientos. Las pruebas pueden incluir introducir el tratamiento en las neuronas, estimular las neuronas y comparar la respuesta en presencia del tratamiento con la respuesta en ausencia de tratamiento.

Las personas especializadas en la materia podrán apreciar diversas realizaciones relacionadas y/o en las que se aplique esta metodología y estos aparatos, particularmente a la vista de las figuras y/o la siguiente explicación. La descripción general expuesta no pretende describir todas las realizaciones ilustradas ni todas las implementaciones de la presente divulgación. Para mayor información sobre los detalles de otras realizaciones, experimentos y aplicaciones que pueden combinarse en diversos grados con las directrices del presente documento, se remite a las directrices y referencias que subyacen en ellas proporcionadas en los ejemplos que forman parte del presente documento de patente.

## Breve descripción de los dibujos

Las distintas realizaciones ilustrativas podrán comprenderse más exhaustivamente considerando la siguiente descripción detallada en conexión con los dibujos adjuntos, en los que:

La **FIG. 1** demuestra conductas de tipo psicótico inducidas por estimulación óptica de neuronas piramidales de la capa V infralímbica en ratones transgénicos Thy1::ChR2. **A)** Representación esquemática de la colocación de fibra óptica unilateral sobre la corteza infralímbica. **B)** Imágenes confocales de cortes coronales de corteza prefrontal en ratones Thy1::ChR2-EYFP, que muestran la colocación de fibra óptica sobre la corteza infralímbica de la capa V (panel izquierdo) y la expresión de ChR2-EYFP en neuronas de capa V (panel derecho). **C)** La estimulación óptica de baja frecuencia de neuronas de capa V con 473 nm de luz azul (10 Hz, duración de pulso 5 ms) disminuyó significativamente la exploración social de crías jóvenes en 6 de 6 animales Thy1::ChR2-EYFP examinados ( $p = 0,03$ ; intercalando períodos de luz encendida / luz apagada). **D)** Compendio de los datos de los efectos de la estimulación de 10 Hz en la exploración social, tal como se muestra en **(A)**. **E)** Compendio de los datos de campo abierto que no presentan ningún efecto de la estimulación óptica de 10 Hz sobre la velocidad total (izquierda) o la longitud del rastro (derecha) de los animales Thy1::ChR2. **F)** La estimulación óptica de banda gamma de las neuronas de capa V con 473 nm de luz azul (40 Hz, duración de pulso 5 ms) eliminó con más potencia aún la exploración social de una cría joven en 6 de 6 animales examinados ( $p < 0,01$ ; intercalando períodos luz encendida / sin luz épocas). **G)** Compendio de los datos de los efectos de la estimulación de 40 Hz en la exploración social tal como se muestra en **(F)**. **H)** La estimulación óptica de 40 Hz aumentó significativamente el tiempo pasado en una postura rígida catatónica en 3 de 6 ratones examinados ( $p < 0,05$ ), y se observó una tendencia a aumentar el tiempo dedicado a movimientos repetitivos de la cabeza de un lado a otro en 2 de 6 ratones examinados ( $p = 0,13$ ).

La **FIG. 2** muestra que el agonista de D2 quinpirol modula las respuestas de las redes prefrontales *in vitro* a la estimulación de ChR2 en ratones transgénicos Thy1::ChR2. **A)** Respuestas de una neurona piramidal de capa V a una sucesión de destellos de luz (470 nm, 1 ms) en condiciones de control (superior, rastro negro) y con quinpirol (20  $\mu$ M, rastro inferior morado). Después de aplicar quinpirol, algunos destellos de luz que anteriormente suscitaban potenciales de acción dejan de hacerlo (flechas), aparecen algunos potenciales de acción nuevos no relacionados con los destellos de luz ("+") y se observan potenciales estables ("p"). **B)** Después de aplicar quinpirol (20  $\mu$ M, rastro central morado), esta neurona piramidal de la capa V presenta una despolarización prolongada que dura más que el período de estimulación con luz y produce potenciales de acción. Tras la eliminación por lavado del quinpirol y la aplicación haloperidol (1  $\mu$ M, rastro inferior verde) se elimina la despolarización prolongada. **C)** La información que aporta la tasa de potenciales de acción transmite el índice de destellos de luz en las neuronas piramidales de la capa V en la que el quinpirol provoca una despolarización dependiente de actividad ( $n = 8$  células en control y 20  $\mu$ M quinpirol;  $n = 4$  células en haloperidol 0.2- 2  $\mu$ M o sulpirida 5  $\mu$ M). **D)** La tasa de potenciales de acción en función del índice de destellos de luz, para las neuronas piramidales de la capa V en las que el quinpirol provoca una despolarización dependiente de la actividad (tal como se ilustra en **B)** ( $n = 4$  células en cada condición, haloperidol 0.2-2  $\mu$ M; sulpirida 5  $\mu$ M). El control (rastro superior que termina en la porción derecha de **(D)**), el rastro de quinpirol (rastro central que termina en la porción derecha de **(D)**) y haloperidol / sulpirida (rastro inferior que termina en la porción derecha de **(D)**) se muestran en **(D)**. **E)** El número de potenciales de acción en función del intervalo entre disparos para las mismas células representadas en **C)**. El control (rastro superior que comienza desde la porción izquierda de

(E)), quinpirol (rastros central que comienza desde la porción izquierda de (E)), y el rastro de haloperidol / sulpirida (el rastro inferior que comienza en la porción derecha de (E)) se muestra en (E). F) respuestas de una neurona piramidal de la capa V (en la que quinpirol provoca una despolarización dependiente de la actividad) a una combinación de ChR2 y actividad activada por red después de un solo destello de luz de 1 ms en condiciones de control (rastros negro; rastro superior que termina en la porción derecha de (F)), quinpirol (20  $\mu$ M, rastro morado, rastro inferior que termina en la porción derecha de (F)) y quinpirol + sulpirida (5  $\mu$ M; rastro verde; rastro central que termina en la porción derecha de (F)) Las flechas indican el pico AHP.

La FIG. 3 demuestra que la activación del receptor D2 provoca una despolarización dependiente de la actividad mediada por canales de  $Ca^{2+}$  de tipo L. A, C, G) Respuestas de las neuronas piramidales de la capa V a los pulsos de corriente hiperpolarizantes y/o despolarizantes en diversas condiciones farmacológicas. B) Morfología de las neuronas piramidales de la capa V que presentan (izquierda) y no presentan (derecha) despolarización dependiente de actividad y la postdespolarización durante las respuestas a los pulsos de corriente despolarizante en quinpirol (respuestas a pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes debajo de cada célula). D) Arriba: constantes de tiempo para la desintegración del potencial de membrana en un 63 % o 90 % hacia el valor basal después de un pulso de corriente despolarizante de 250 pA en condiciones de control (negro, barra izquierda) o quinpirol (morado, barra derecha). Debe advertirse que se han excluido 3 células que se vuelven biestables en quinpirol (es decir, el potencial de la membrana no vuelve al valor basal durante > 1 segundo). Abajo: el potencial de membrana (relativo a el valor basal) 10 ms después del final de un pulso de corriente despolarizante de 250 pA en condiciones de control (negro) o quinpirol (morado). E) Fracción de neuronas piramidales de la capa V con un combamiento prominente y postdespolarización de rebote que presentó una postdespolarización (ADP) después de la inyección de corriente despolarizante, bloqueo de despolarización de los pulsos de acción (bloqueo de despol.), biestabilidad o disparo persistente que duró más que el período de inyección de corriente despolarizante, tras la aplicación de 20  $\mu$ M de quinpirol. F) Espectro de potencia de la actividad persistente observada en quinpirol después de un pulso de corriente despolarizante (calculado a partir del rastro en el panel A).

La FIG. 4 muestra que la fenciclidina (PCP) también provoca una despolarización dependiente de actividad a través de canales de  $Ca^{2+}$  de tipo L. A) Respuestas de una neurona piramidal de capa V a los pulsos de corriente despolarizantes. Después de aplicar PCP (5  $\mu$ M, dos rastros centrales), la neurona presenta una postdespolarización y disparo persistente que duran más que el período de inyección de corriente. Estos no son revertidos por el del antagonista D2 sulpirida (5  $\mu$ M; rastro verde), sino que son bloqueados por el antagonista del canal de  $Ca^{2+}$  del tipo L nifedipina (10  $\mu$ M; rastro gris). B) Fracción de las neuronas piramidales de la capa V con un combamiento prominente y postdespolarización de rebote que presentó postdespolarización (ADP) después de la inyección de corriente despolarizante, bloqueo de despolarización de potenciales de acción (bloqueo de despol), biestabilidad o disparo persistente que duró más que el período de inyección de la corriente despolarizante tras la aplicación de 5  $\mu$ M de PCP. C) Arriba: nifedipina deteriora la exploración social de una manera dependiente de la dosis (n = 8 ratones en cada grupo). Abajo: PCP deteriora la exploración social, pero la nifedipina mejora dicho déficit en ratones tratados con PCP de una manera dependiente de la dosis (n = 8 ratones en cada grupo). D) Respuestas de neuronas piramidales de la capa V a los pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante en un ratón de tipo silvestre, y en el ratón en el que se ha activado TS2neo diseñado como una ganancia CACNA1C función génica (20). \* = p <0,05, \*\* = p <0,01. El efecto estuvo presente en 4/4 de las células mutantes y 0/5 de las células de tipo silvestre con un gran combamiento y despolarización de rebote como respuesta a la inyección de corriente hiperpolarizante (p <0,01 por la prueba exacta de Fisher).

La FIG. 5 muestra un modelo, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación.

La FIG. 6 muestra un método de identificación de una célula de interés, de acuerdo con una realización ilustrativa.

La FIG. 7 muestra un modelo para caracterizar trastornos neuronales, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación.

La FIG. 8 muestra un método para determinar la eficacia de un tratamiento, de acuerdo con una realización ilustrativa.

Si bien la divulgación es susceptible de varias modificaciones y formas alternativas, en los dibujos se muestran y se describirán con detalle elementos específicos de la misma a modo de ejemplos. Sin embargo, deberá entenderse que no se pretende limitar la divulgación a las realizaciones particulares descritas. Por el contrario, se pretende cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que entren dentro del alcance de la divulgación, incluyendo los aspectos definidos en las reivindicaciones.

### Descripción detallada de la invención

En el presente documento, se describen animales no humanos con psicosis inducida por activación de una opsina sensible a la luz expresada en la membrana plasmática de neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal de un sujeto, en los que la activación de la opsina sensible a la luz induce la despolarización de la membrana. Se proporcionan también los cortes de tejido de la corteza prefrontal de los animales no humanos. La divulgación proporciona asimismo métodos de inducción de psicosis en animales no humanos y métodos para identificar o seleccionar un compuesto que puede utilizarse para tratar psicosis utilizando animales no humanos y los cortes de tejido descritos en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "animal" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitarse a ellos, seres humanos, animales de granja, animales de competición, mascotas (p.ej., perros y gatos), primates, ratones, ratas y otros roedores.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluye las referencias en plural a no ser que se indique lo contrario.

**Técnicas generales**

- 10 La puesta en práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos, inmunología, fisiología, urología y la fisiopatología de la adicción a las drogas y conductas relacionados con la recompensa, muy conocidos entre las personas especializadas en la materia. Dichas técnicas están explicadas exhaustivamente en la bibliografía, como por ejemplo *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook et al., 1989) y *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001) (a las que se hace referencia de forma conjunta en el presente documento como "Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., Eds., 1987, incluyendo los suplementos hasta 2001); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis et al., Eds., 1994); Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York; Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (a las que se hace referencia de forma conjunta en el presente documento como "Harlow and Lane"), Beaucage et al. eds., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000), *Handbook of Experimental Immunology*, 4ª edición (D.M. Weir & CC Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); y *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987). Otras referencias útiles incluyen *Principles of Internal Medicine* de Harrison (McGraw Hill; J. Isseleacher et al., Eds.) y *Addiction Research Methods*, (Miller et al., Eds., 2010, Wiley-Blackwell, Reino Unido).

Proteínas opsina sensibles a la luz

- 30 En el presente documento se proporcionan composiciones de tipo optogénico y métodos para despolarizar selectivamente neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal de un sujeto en los que la despolarización de dichas neuronas induce la psicosis del animal. En algunas realizaciones, se induce esquizofrenia. Optogénica se refiere a la combinación de métodos genéticos y ópticos empleados para controlar eventos específicos en células diana de tejido vivo, incluso dentro de mamíferos que se mueven libremente y otros animales, con la precisión temporal (milisegundo-escala de tiempo) necesaria para seguir el ritmo del funcionamiento de sistemas biológicos intactos. La optogénica requiere la introducción de un canal sensible a la luz rápido o el bombeo de proteínas en las membranas plasmáticas de las células neuronales diana que permitan la manipulación temporalmente precisa del potencial de la membrana neuronal al mismo tiempo que se mantiene la resolución del tipo de célula a través del uso de mecanismos de direccionamiento específicos.

- 40 Las opsinas sensibles a la luz que pueden utilizarse en la presente invención incluyen opsinas que inducen la despolarización de la membrana celular de las neuronas con la luz. En la Tabla 1 a continuación, se muestran Ejemplos de dichas opsinas.

La Tabla 1 muestra las opsinas identificadas por excitación y modulación a través del espectro visible:

45

Tipo de Opsina	Origen biológico	Longitud de onda Sensibilidad	Acción definida
VChRI	<i>Volvox carteri</i>	589 nm utilidad 535 nm máx.	Excitación (Despolarización)
DChR	<i>Dunaliella salina</i>	500 nm máx.	Excitación (despolarización)
ChR2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	470 nm máx. 380-405nm utilidad	Excitación (despolarización)
ChETA	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	470 nm máx. 380-405nm utilidad	excitación (despolarización)
SFO	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	470 nm máx. 530 nm máx.	Excitación (despolarización) Inactivación
SSFO	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	445 nm máx. 590 nm; 390-400 nm	Activación de tipo escalonado(despolarización) Inactivación

C1V1	<i>Volvox carteri</i> y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	542 nm máx.	Excitación (despolarización)
C1V1 E122	<i>Volvox carteri</i> y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	546 nm máx.	Excitación (despolarización)
C1V1 E162	<i>Volvox carteri</i> y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	542 nm máx.	Excitación (despolarización)
C1V1 E122/E162	<i>Volvox carteri</i> y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	546 nm máx.	Excitación (despolarización)

Tal como se utiliza en el presente documento, una opsina sensible a la luz (como ChR2, VChR1, DChR y ChETA) incluye proteínas naturales y variantes funcionales, fragmentos, proteínas de fusión que comprenden los fragmentos o la proteína de longitud completa. En algunas realizaciones, el péptido señal puede eliminarse. Una variante puede tener una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de la proteína natural. Una variante funcional puede tener la misma función de despolarización o una similar a la de la proteína natural.

#### Motivos de aminoácidos de transporte intracelular potenciados

La presente divulgación proporciona la modificación de proteínas opsina sensibles a la luz, expresadas en una célula mediante la adición de uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que potencian el transporte a las membranas plasmáticas de células de mamífero. Las proteínas opsina sensibles a la luz que tienen componentes derivados de organismos evolutivamente más simples pueden no ser expresadas o toleradas por células de mamífero o pueden presentar un emplazamiento sub-celular alterado cuando se expresan a altos niveles en células de mamífero. En consecuencia, en algunas realizaciones, las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en una célula pueden fusionarse con uno o más motivos de secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en un péptido señal, una señal de exportación de retículo endoplásmico (ER), una señal de tráfico de membrana y/o una señal de exportación de golgi N-terminal. El uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que potencian el transporte de proteína opsina sensible a la luz a las membranas plasmáticas de células de mamífero se pueden fusionar con los extremos N-terminal, C-terminal o tanto el extremo N-terminal como al extremo C-terminal de la proteína opsina sensible a la luz. Opcionalmente, la proteína opsina sensible a la luz y el uno o más motivos de secuencia de aminoácidos se pueden separar mediante un engarce. En algunas realizaciones, la proteína opsina sensible a la luz puede modificarse mediante la adición de una señal de tráfico (ts) que potencia el transporte de la proteína a la membrana plasmática de la célula. En algunas realizaciones, la señal de tráfico puede derivarse de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador hacia adentro humano Kir 2.1. En otras realizaciones, la señal de tráfico puede comprender la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV.

Otros motivos de proteína adicionales que pueden potenciar el transporte de proteína opsina sensible a la luz a la membrana plasmática de una célula se describen en la solicitud de patente estadounidense N° 12 / 041.628. En algunas realizaciones, la secuencia de péptido señal en la proteína se puede suprimir o sustituir con una secuencia de péptido señal de una proteína diferente.

#### Proteínas del canal sensibles a la luz

En algunos aspectos, la proteína opsina sensible a la luz es una proteína canal sensible a la luz. En algunos aspectos de los métodos proporcionados en el presente documento, se expresan en las membranas plasmáticas del subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal uno o más miembros de la familia *Canalrodopsina* de canales iónicos sensibles a la luz.

En algunos aspectos, la proteína del canal de cationes sensible a la luz puede derivarse de *Chlamydomonas reinhardtii*, en los que la proteína del canal catiónico puede ser capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando se ilumina la célula con luz. En otra realización, la proteína del canal catiónico sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. La luz utilizada para activar la proteína del canal catiónico sensible a la luz derivada de *Chlamydomonas reinhardtii* puede tener una longitud de onda entre aproximadamente 460 y aproximadamente 495 nm o puede tener una longitud de onda de aproximadamente 470 nm. Asimismo, la luz puede tener una intensidad de al menos aproximadamente 100 Hz. En algunas realizaciones, la activación del canal catiónico sensible a la luz derivado de *Chlamydomonas reinhardtii* con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede causar el empobrecimiento sináptico inducido por despolarización de

las neuronas que expresan el canal catiónico sensible a la luz. La proteína del canal catiónico sensible a la luz puede comprender adicionalmente sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos nativa para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a longitudes de onda de luz en particular y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína del canal de cationes sensible a la luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. Asimismo, la proteína del canal de cationes sensible a la luz puede contener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras. La proteína del canal catiónico sensible a la luz que comprende sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos nativa retiene convenientemente la capacidad de despolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal como respuesta a la luz.

En otras realizaciones, la proteína del canal catiónico sensible a la luz puede ser una proteína opsina con función escalonada (SFO) o una proteína opsina estabilizada con función escalonada (SSFO) que puede tener sustituciones de aminoácidos específicas en posiciones clave en todo el bolsillo de unión retinal de la proteína. En algunas realizaciones, la proteína SFO puede tener una mutación en el resto aminoácido C128 de SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la proteína SFO tiene una mutación C128A en la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la proteína SFO tiene una mutación C128S en SEQ ID NO: 1. En otra realización, la proteína SFO tiene una mutación C128T en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína SSFO puede tener una mutación en los restos aminoácido C128 y D156 de SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la proteína SSFO tiene una mutación C128S y una mutación D156A en la SEC ID N: 1. En algunas realizaciones, la proteína SFO puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia presentada en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:3.

En otras realizaciones, la proteína del canal catiónico sensible a la luz puede ser una proteína quimérica C1V1 derivada de la proteína VChR1 de *Volvox carteri* y la proteína ChR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*, en la que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de VChR1 que tiene al menos la primera y la segunda hélice transmembrana reemplazadas por la primera y la segunda hélice transmembrana de ChR1; es sensible a la luz; y es capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando se ilumina la célula con luz. Por otra parte, en algunas realizaciones, se describen en el presente documento polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos sustituidas o mutadas, en las que el polipéptido mutante retiene la naturaleza sensible a la luz característica del polipéptido quimérico C1V1 precursor, pero también puede poseer propiedades alteradas en algunos aspectos específicos. Por ejemplo, las proteínas quiméricas C1V1 sensibles a la luz mutantes descritas en el presente documento pueden presentar un mayor nivel de expresión tanto dentro de una célula animal como en la membrana plasmática de la célula animal; una alteración de la capacidad de respuesta cuando se expone a diferentes longitudes de onda de luz, particularmente luz roja; y/o una combinación de rasgos en virtud de los cuales el polipéptido C1V1 quimérico posee las propiedades de baja desensibilización, desactivación rápida, activación con escasa iluminación violeta para una mínima activación cruzada con otros canales catiónicos sensibles a la luz y/o fuerte expresión en células animales. En algunas realizaciones, la proteína C1V1 puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100% idéntica a la secuencia que se presenta en las SEQ ID NO: 4, 5, 6 o 7.

En la publicación de solicitud de patente estadounidense N° 2007/0054319 y en las publicaciones de solicitud de patente internacional No. WO 2009/131837 y WO 2007/024391 se pueden encontrar otras divulgaciones relacionadas con proteínas del canal catiónico sensibles a la luz. Otras divulgaciones relacionadas con las proteínas SFO o SSFO se pueden encontrar en la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 2010/056970 y en las solicitudes de patente provisional estadounidense N° 61/410.704 y 61/511.905. Otras divulgaciones relacionadas con los canales de cationes quiméricos C1V1 así como variantes mutantes de los mismos se pueden encontrar en las solicitudes de patente provisional estadounidenses N° 61/410,736, 61/410,744 y 61/511,912.

#### **Polinucleótidos que codifican proteínas opsina sensibles a la luz**

La divulgación proporciona también polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende un casete de expresión. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un vector que comprende el ácido nucleico descrito. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica una proteína opsina sensible a la luz de la divulgación está unido operativamente a un promotor. Los promotores son muy conocidos en la técnica. Puede utilizarse cualquier promotor que funcione en una interneurona colinérgica para la expresión de las proteínas sensibles a la luz y/o cualquier variante de las mismas de la presente divulgación. Las regiones o los promotores de control de iniciación que son útiles para conducir la expresión de las proteínas opsina sensibles a la luz, o variantes de las mismas, en una célula animal específica, son numerosas y conocidas entre las personas especializadas en la técnica. Prácticamente puede usarse cualquier promotor capaz de conducir estos ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el promotor utilizado para conducir la expresión de la proteína sensible a la luz puede ser el promotor 1 del antígeno del timo (Thy1), que es capaz de conducir una robusta expresión de transgenes en neuronas piramidales de la corteza prefrontal (Véase, p.ej., Arenkiel et.al., *Neuron* 54, 205 (19 de abril de 2007)).

Asimismo, se proporcionan en el presente documento vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que

codifica una proteína opsina sensible a la luz o cualquier variante de la misma descrita en el presente documento. Los vectores que pueden administrarse de acuerdo con la presente divulgación también incluyen vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN (p.ej. ANRm) que, cuando se transcribe desde los polinucleótidos del vector tendrá como resultado la acumulación de proteínas sensibles a la luz en las membranas plasmáticas de las células animales diana. Los vectores que se pueden usar incluyen, sin limitación, vectores lentivirales, HSV, adenovirales y adenoasociados (AAV). Los lentivirus incluyen, pero sin limitarse a ellos VIH-1, VIH-2, SIV, FTV y EIAV. Los lentivirus pueden pseudo-tipificarse con las proteínas de la envoltura de otros virus, entre los que se incluyen, pero sin limitarse a ellos, VSV, rabia, Mo-MLV, baculovirus y Ébola. Dichos vectores pueden prepararse aplicando los métodos convencionales en la técnica.

En algunas realizaciones, el vector es un vector de AAV recombinante. Los vectores AAV son virus de ADN de tamaño relativamente pequeños que pueden integrarse de una manera estable y específica del sitio en el genoma de las células que infectan. Pueden infectar un amplio espectro de células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento celular, la morfología o la diferenciación, y no parecen estar relacionadas con patologías humanas. El genoma de AAV ha sido clonado, secuenciado y caracterizado. Abarca aproximadamente 4700 bases y contiene una región de repetición terminal invertida (ITR) de aproximadamente 145 bases en cada extremo, que sirve como un origen de replicación para el virus. El resto del genoma se divide en dos regiones esenciales que llevan a cabo las funciones de encapsidación: la parte izquierda del genoma, que contiene el gen *rep* relacionado con 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.

Los vectores de AAV pueden prepararse aplicando métodos convencionales en la técnica. Son adecuados los virus adeno-asociados de cualquier serotipo (véase, p.ej., Blacklow, págs. 165-174 de "*Parvovirus and Human Disease*" J.R. Pattison, ed. (1988); Rose, *Comprehensive Virology* 3: 1, 1974; P. Tattersall "The Evolution of Parvovirus Taxonomy" en *Parvoviruses* (JR Kerr, SF Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) pág. 5-14, Hudder Arnold, Londres, RU (2006) y DE Bowles, JE Rabinowitz, RJ Samulski "*The Genus Dependovirus*" (JR Kerr, SF Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) pág. 5-23, Hudder Arnold, Londres, RU (2006). Los métodos de purificación de vectores pueden encontrarse, por ejemplo, en las patentes estadounidenses No. 6.566.118, 6.989.264 y 6.995.006 y WO / 1999/011764 titulada "Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombination AAV Vectors". La preparación de vectores híbridos se describe por ejemplo en la solicitud PCT N° PCT / US2005 / 027091. Se ha descrito el uso de vectores derivados de los AAV para transferir genes *in vitro* e *in vivo* (véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional N°: 91/18088 y WO 93/09239; Patentes estadounidenses N°: 4.797.368, 6.596.535 y 5.139.941 y la patente europea N°: 0488528. Dichas publicaciones describen diversas construcciones derivadas de AAV en las que los genes *rep* y/o *cap* se eliminan y reemplazan por un gen de interés, así como 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 defectivos de replicación de acuerdo con 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 transporta los genes de encapsidación de AAV (genes *rep* y *cap*), hacia una línea celular que está infectada con un virus ayudador humano (por ejemplo, un adenovirus). Los recombinantes de AAV que se producen se purifican después a través de técnicas convencionales.

En algunas realizaciones, el/los vector(es) para su uso en los métodos descritos en el presente documento se encapsidan en una partícula de virus (p.ej., partículas de virus AAV entre las que se incluyen, pero sin limitarse a ellas, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 y AAV16). Por consiguiente, la divulgación incluye una partícula de virus recombinante (recombinante porque contiene un polinucleótido recombinante) que comprende cualquiera de los vectores descritos en el presente documento. Los métodos para producir dichas partículas son conocidos en la técnica y se describen en la patente estadounidense N° 6.596.535.

#### Entrega de proteínas opsina sensibles a la luz

En algunos aspectos, los polinucleótidos que codifican las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en el presente documento (por ejemplo, un vector AAV) pueden entregarse directamente a las neuronas piramidales de la corteza prefrontal de un animal mediante el empleo de una aguja, un catéter o un dispositivo relacionado, aplicando técnicas neuroquirúrgicas conocidas en la técnica, como, por ejemplo, por inyección estereotáctica (véase, p.ej., Stein et al., *J. Virol*, 73: 34243429, 1999; Davidson et al., *PNAS*, 97: 3428-3432, 2000; Davidson et al., *Nat. Genet.* 3: 219 - 223, 1993; y Alisky & Davidson, *Hum. Gene Ther.* 11: 2315-2329, 2000) o fluoroscopia.

En algunos aspectos, las proteínas opsina sensibles a la luz pueden expresarse en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal de un animal transgénico. Por ejemplo, se puede emplear una línea de ratón transgénico usando Cre-recombinasa bajo el control del promotor 1 del antígeno de células del timo (Thy1). Puede inyectarse entonces un vector de virus adeno-asociado (AAV) inducible por Cre que transporta el gen de opsina sensible a la luz estereotácticamente en la corteza prefrontal.

En otros aspectos, cualquiera de las proteínas opsina sensibles a la luz puede expresarse en las neuronas

piramidales de la corteza prefrontal de un animal transgénico. Por ejemplo, se puede emplear una línea de ratón transgénico usando ChR2 bajo el control del promotor 1 del antígeno de células del timo (Thy1). Los ratones transgénicos se pueden generar aplicando técnicas de inyección pronuclear convencionales (véase, p. ej., Arenkiel et al., *Neuron* 54, 205 (19 de abril de 2007)).

5 También pueden emplearse otros métodos para entregar las proteínas sensibles a la luz a neuronas piramidales, como, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, transfección con polímeros o lípidos iónicos, electroporación, transfección óptica, empalefacción o mediante pistola génica.

10 En algunos aspectos, la divulgación proporciona animales no humanos generados a través de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los animales no humanos comprenden una proteína opsina sensible a la luz expresada en la membrana celular de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal del animal, en la que la opsina induce la despolarización de la membrana con la luz, y en la que la iluminación de la opsina con la luz induce la psicosis del animal. En algunos aspectos, 15 la divulgación proporciona un corte de tejido de corteza prefrontal que comprende un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal de un animal no humano, en el que se expresa una opsina sensible a la luz en la membrana celular del subconjunto de neuronas piramidales de la capa V, y la activación de la opsina con la luz induce despolarización de la membrana.

## 20 Fuentes de luz

Puede utilizarse cualquier dispositivo que sea capaz de aplicar luz que tenga una longitud de onda para activar las proteínas sensibles a la luz expresadas en una neurona para despolarizar la neurona. Por ejemplo, se puede utilizar un dispositivo de suministro de luz para activar una proteína opsina sensible a la luz que afecte el voltaje de la 25 membrana de una o más neuronas. Puede configurarse un dispositivo de suministro de luz para que proporcione un estímulo óptico a una región diana del cerebro. El dispositivo de suministro de luz puede comprender una base, una guía de cánula, que se fija en la base, y uno o más conductos ópticos fijados en la base a través de la guía de la cánula. La base puede comprender uno o más puertos de suministro de luz que están situados para suministrar luz desde los conductos ópticos a las regiones de tejido diana, como, por ejemplo, las neuronas piramidales en la 30 corteza prefrontal. Los conductos ópticos pueden ser fibras ópticas, en las que el extremo proximal de la fibra está fijado a una fuente de luz óptica y el extremo distal está en comunicación con los puertos de suministro de luz. La fuente de luz óptica puede ser capaz de proporcionar luz continua y/o pulsada y puede programarse para proporcionar luz en secuencias de impulsos predeterminadas. El dispositivo de suministro de luz puede tener cualquier cantidad de conductos ópticos que pueda ser deseable, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, etc. Los 35 conductos ópticos pueden transportar cada uno luz de la misma o diferente longitud de onda. La luz suministrada puede tener una longitud de onda entre 450 nm y 600 nm, como por ejemplo luz amarilla o verde o azul. El dispositivo de suministro de luz puede tener cualquier cantidad de puertos de suministro de luz como sea deseable, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, etc. En algunas variaciones, puede haber el mismo número de puertos de suministro de luz que de conductos ópticos, mientras que en otras variaciones, puede haber un número diferente de 40 conductos ópticos y puertos de suministro de luz. Por ejemplo, puede haber un único conducto óptico que transmita luz a dos o más puertos de suministro de luz. Alternativa o adicionalmente, puede conectarse un único conducto óptico a un único puerto de suministro de luz. Puede configurarse la guía de la cánula para ayudar a asegurar y alinear los conductos ópticos con los puertos de suministro de luz. En algunas realizaciones, el dispositivo de suministro de luz está configurado para suministrar luz al subconjunto de neuronas piramidales de la capa V de la 45 corteza prefrontal para inducir la despolarización de las proteínas opsina expresadas en la membrana celular del subconjunto de neuronas piramidales de la capa V. Los dispositivos de suministro de luz pueden comprender también uno o más electrodos de medición que pueden configurarse para medir la actividad neuronal. 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 50 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.

En otros aspectos, el dispositivo de suministro de luz puede ser una fuente de luz implantable que no requiera 55 anclarse físicamente a una fuente de alimentación externa. La fuente de luz implantable puede comprender un cuerpo interno, teniendo el cuerpo interior al menos un medio para generar luz que está configurado para una fuente de alimentación. En algunas realizaciones, la fuente de alimentación puede ser una batería interna para alimentar los medios de generación de luz. En otra realización, la fuente de luz implantable puede comprender una antena externa para recibir energía electromagnética por transmisión inalámbrica desde una fuente externa para alimentar 60 los medios de generación de luz. La energía electromagnética transmitida de forma inalámbrica puede ser una onda de radio, una microonda o cualquier otra fuente de energía electromagnética que pueda transmitirse desde una fuente externa para alimentar los medios de generación de luz de la fuente de luz implantable. En una realización, los medios de generación de luz se controlan mediante un circuito integrado producido utilizando semiconductores u otros procedimientos conocidos en la técnica.

65 En algunos aspectos, los medios de luz pueden ser un diodo emisor de luz (LED). En algunas realizaciones, el LED

5 puede generar luz azul y/o verde. En otras realizaciones, el LED puede generar luz ámbar, amarilla y/o azul. En algunas realizaciones, se embeben varios micro LED en el cuerpo interior de la fuente de luz implantable. En otras realizaciones, el medio generador de luz es un diodo láser de estado sólido o cualquier otro medio capaz de generar luz. Los medios generadores de luz pueden generar luz que tiene una intensidad suficiente para activar las proteínas sensibles a la luz expresadas en la membrana plasmática de los nervios próximos a la fuente de luz (como un manguito de luz). En algunas realizaciones, la intensidad de la luz que alcanza las interneuronas colinérgicas del NAc o cuerpo estriado producida por los medios de generación de luz tiene una intensidad de cualquiera entre aproximadamente 0,05 mW/mm<sup>2</sup>, 0,1 mW/mm<sup>2</sup>, 0,2 mW/mm<sup>2</sup>, 0,3 mW/mm<sup>2</sup>, 0,4 mW/mm<sup>2</sup>, 0,5 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 0,6 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 0,7 mW/mm<sup>2</sup>, Aproximadamente 0,8 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 0,9 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 1,0 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 1,1 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 1,2 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 1,3 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 1,4 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 1,5 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 1,6 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 1,7 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 1,8 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 1,9 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 2,0 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 2,1 mW/mm<sup>2</sup> mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 2,2 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 2,3 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 2,4 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 2,5 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 3 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 3,5 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 4 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 4,5 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 5 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 5,5 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 6 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 7 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 8 mW/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 9 mW/mm<sup>2</sup> o aproximadamente 10 mW/mm<sup>2</sup>, inclusive, incluyendo los valores de entre estos números.

10

15

20 En algunos aspectos, los medios de generación de luz pueden activarse externamente mediante un controlador externo. El controlador externo puede comprender un generador de potencia que se puede montar en una bobina de transmisión. En algunas realizaciones del controlador externo, puede conectarse una batería al generador de potencia para proporcionarle energía. Se puede conectar un interruptor al generador de potencia, lo que permite que una persona active o desactive manualmente el generador de potencia. En algunas realizaciones, tras la activación del interruptor, el generador de potencia puede proporcionar potencia a los medios de generación de luz en la fuente de luz a través del acoplamiento electromagnético entre la bobina de transmisión en el controlador externo y la antena externa de la fuente de luz implantable. La bobina de transmisión puede establecer un acoplamiento electromagnético con la antena externa de la fuente de luz implantable cuando está próxima a ella, para suministrar potencia a los medios de generación de luz y para transmitir una o más señales de control a la fuente de luz implantable. En algunas realizaciones, el acoplamiento electromagnético entre la bobina de transmisión del controlador externo y la antena externa de la fuente de luz implantable puede ser un acoplamiento de inductancia magnética de radiofrecuencia. Cuando se usa acoplamiento de inductancia magnética de radiofrecuencia, la frecuencia operativa de la onda de radio puede oscilar entre 1 y 20 MHz, inclusive, incluyendo los valores entre estos números (por ejemplo, aproximadamente 1 MHz, aproximadamente 2 MHz, aproximadamente 3 MHz), aproximadamente 4 MHz, aproximadamente 5 MHz, aproximadamente 6 MHz, aproximadamente 7 MHz, aproximadamente 8 MHz, aproximadamente 9 MHz, aproximadamente 10 MHz, aproximadamente 11 MHz, aproximadamente 12 MHz, aproximadamente 13 MHz, aproximadamente 14 MHz, aproximadamente 15 MHz, aproximadamente 16 MHz, aproximadamente 17 MHz, aproximadamente 18 MHz, aproximadamente 19 MHz, o aproximadamente 20 MHz). Sin embargo, es posible utilizar otras técnicas de acoplamiento, como un receptor óptico, infrarrojo o un sistema de telemetría biomédica (véase, por ejemplo, Kiourti, "Biomedical Telemetry: Communication between Implanted Devices and the External World, *Opticon 1826*, (8): Spring, 2010).

25

30

35

40

Se pueden encontrar ejemplos de dispositivos de estimulación de luz, que incluyen fuentes de luz, en las solicitudes de patente internacional No: PCT/US08 / 50628 y PCT/US09/49936 y en Llewellyn et al., 2010, Nat. Med., 16 (10): 161 – 165.

45

Métodos para inducir psicosis y cribar compuestos que afectan estados psicóticos

La invención proporciona métodos para inducir psicosis en un animal no humano que comprenden: administrar un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz al animal no humano, en el que la proteína opsina sensible a la luz se expresa en la membrana celular de un subconjunto neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal del animal no humano, y la proteína es sensible a la luz y es capaz de inducir la despolarización de la membrana de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V cuando se ilumina con la luz el subconjunto de neuronas piramidales de la capa V, en virtud de lo cual la activación de la proteína con la luz induce la psicosis en el animal no humano. En algunas realizaciones, se induce esquizofrenia. En algunas realizaciones, se induce una perturbación de la exploración social.

50

55

La invención proporciona también métodos para inducir la despolarización de la membrana de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en un corte de tejido de la corteza prefrontal que comprende: activar una proteína opsina sensible a la luz expresada en la membrana celular del subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en el corte de tejido de la corteza prefrontal, en el que la proteína opsina sensible a la luz es capaz de inducir la despolarización de la membrana de las neuronas con luz.

60

En algunos aspectos, es posible utilizar los animales no humanos y los cortes de tejido de corteza prefrontal descritos en el presente documento para identificar, cribar o examinar la eficacia de un compuesto que es útil para tratar la psicosis (por ejemplo, esquizofrenia). Por ejemplo, la divulgación proporciona métodos de cribado de un

65

- compuesto que puede ser útil para tratar la psicosis, que comprenden medir el estado psicótico de un animal no humano antes y después de administrar el compuesto a la corteza prefrontal del animal, en los que se induce el estado psicótico por activación con luz de una opsina sensible a la luz expresada en la membrana celular de neuronas piramidales de la capa V de un sujeto animal, y la activación de la opsina induce la despolarización de la membrana; en los que una mejora en una o más de las mediciones del estado psicótico tras la administración del compuesto indica que el compuesto puede ser útil para tratar psicosis. En algunas realizaciones, la medición del estado psicótico es una medición de la conducta (como la exploración social). En algunas realizaciones, la medición del estado psicótico es una medición celular (como la medición electrofisiológica de los patrones de despolarización que presenta un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V). En otra realización, el método comprende además una etapa de administración de un agonista D2 (como quinpirol) al animal antes de la administración del compuesto. En algunas realizaciones, el compuesto puede ser un antagonista de D2 como, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, sulpirida y haloperidol. En algunas realizaciones, el compuesto puede ser un antagonista del canal de  $Ca^{2+}$  de tipo L, como, por ejemplo, pero sin limitarse a ella, nifedipina.
- 15 La divulgación proporciona también métodos de cribado de un compuesto que puede ser útil para tratar la psicosis, que comprenden: medir un estado psicótico de un corte de tejido de corteza prefrontal antes y después de incubar el corte de tejido con el compuesto, en los que el corte de tejido de corteza prefrontal comprende neuronas piramidales de la capa V de un sujeto y se expresa una opsina sensible a la luz en la membrana celular de las neuronas piramidales de la capa V del sujeto, en el que se induce el estado psicótico por la despolarización de membrana de las neuronas inducida por la activación de la opsina sensible a la luz; en el que una mejora en una o más de las lecturas del estado psicótico después de la incubación con el compuesto indica que el compuesto puede ser útil para tratar la psicosis. En algunas realizaciones, la medición del estado psicótico es una medición celular. En otra realización, comprende además una etapa de administración de un agonista D2 (como quinpirol) con el corte de tejido de la corteza prefrontal antes de la incubación con el compuesto. En algunas realizaciones, el compuesto puede ser un antagonista de D2 como, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, sulpirida y haloperidol. En algunas realizaciones, el compuesto puede ser un antagonista del canal de  $Ca^{2+}$  de tipo L como, por ejemplo, pero sin limitarse a ella, nifedipina.

### **Realizaciones ilustrativas**

- Se cree que la presente divulgación es útil para identificar poblaciones de células neuronales relacionadas con diversos trastornos psiquiátricos. Las aplicaciones específicas de la presente invención facilitan la evaluación de modelos de enfermedad relacionados con poblaciones de células neuronales relacionadas con diversos trastornos psiquiátricos. Dado que muchos aspectos de las realizaciones ilustrativas divulgadas en el presente documento se relacionan y se basan significativamente en desarrollos previos en este campo, la siguiente explicación compendia dichos desarrollos previos a fin de proporcionar una sólida comprensión de los fundamentos y las directrices que subyacen en ellas, a partir de las cuales se pueden extraer detalles y modificaciones de implementación incluyendo los que se incluyen en los ejemplos. En este contexto, se proporciona la siguiente explicación. Si bien la presente invención no está limitada necesariamente a dichas aplicaciones, se podrán apreciar varios aspectos de la invención a lo largo de la explicación de los distintos ejemplos, dentro de este contexto.

- Las realizaciones y aplicaciones específicas explicadas en el presente documento (incluyendo los Ejemplos) pueden implementarse en conexión con uno o más de los aspectos, realizaciones e implementaciones descritos, así como con los que se muestran en las figuras y se describen a continuación. Se puede hacer referencia a los siguientes Ejemplos. Para más detalles sobre las moléculas y opsinas sensibles a la luz, incluyendo metodología, dispositivos y sustancias, puede hacerse referencia también a la siguiente publicación de antecedentes: publicación de patente estadounidense N° 2010/0190229, titulada "System for Optical Stimulation of Target Cells" para Zhang et al.; La publicación de patente estadounidense N° 2010/0145418, también titulada "System for Optical Stimulation of Target Cells" para Zhang et al.; y la publicación de patente estadounidense No. 2007/0261127, titulada " System for Optical Stimulation of Target Cells" para Boyden et al. De acuerdo con estas publicaciones, es posible utilizar numerosas opsinas en células de mamífero *in vivo* e *in vitro* para proporcionar estimulación óptica y control de células diana. Por ejemplo, cuando se introduce ChR2 en una célula, la activación de la luz de ChR2 canalrodopsina tiene como resultado la excitación y el disparo de la célula. En los casos en los que se introduce NpHR en una célula, la activación con luz de la opsina de NpHR tiene como resultado la inhibición de la célula. Estos y otros aspectos de las divulgaciones de las solicitudes de patente a las que se ha hecho referencia pueden ser útiles para implementar diversos aspectos de la presente divulgación.

- En algunos aspectos, se proporcionan en el presente documento métodos de identificación de poblaciones neuronales relacionadas con trastornos psiquiátricos que comprenden: proporcionar estimulación óptica a una población de neuronas diana que expresa una opsina sensible a la luz, medir un primer patrón eléctrico de la población de neuronas diana como respuesta a la estimulación óptica, introducir un fármaco, conocido por inducir psicosis a la población de neuronas diana, proporcionar estimulación óptica a la población de neuronas diana, medir un patrón eléctrico posterior de la población de neuronas diana como respuesta a la estimulación óptica, y comparar el primer patrón eléctrico con el patrón eléctrico posterior. En otra realización más, identificar un subconjunto de neuronas asociadas con psicosis. En algunas realizaciones, el subconjunto de neuronas es un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V. En algunas realizaciones, la población de células neuronales diana está en un

paciente. En algunas realizaciones, el fármaco puede ser un agonista de D2 como, por ejemplo, pero sin limitarse a él, quinpirol. En algunas realizaciones, el fármaco puede ser un inhibidor del receptor NMDA como, por ejemplo, pero sin limitarse a ella, fenciclidina.

5 Volviendo a la FIG. 5, se representa un modelo para identificar células de interés con arreglo a una realización de la presente divulgación. Se especifica un área de interés dentro del cerebro (500). El área de interés puede seleccionarse sobre la base de las características previamente identificadas de una enfermedad de interés o las funciones conocidas del área, por ejemplo. Se modifican con opsina uno o más tipos de células dentro del área de interés (510). Cada uno de los diferentes tipos de células puede modificarse con una opsina diferente que responde a una longitud de onda de luz diferente. En ciertas realizaciones alternativas, se modifican los diferentes tipos de células con la misma opsina, pero en diferentes muestras o pacientes. Se estimulan los diferentes tipos de células en el área de interés (520) con luz visible en un intervalo que se determina sobre la base de la opsina utilizada para modificar el tipo de célula particular que se está estimulando. Se observa la respuesta de cada tipo de célula (580). Se introduce un fármaco conocido por inducir un estado en particular en un paciente cuando se lo observa a nivel macro (en lugar de a nivel celular) en el área de interés (530). Se observa la respuesta de cada tipo de célula en presencia del fármaco (590). Se comparan las respuestas de cada tipo de célula en presencia del fármaco conocido por inducir el estado en particular (540) con la respuesta del mismo tipo de célula a la estimulación cuando las células están en un estado "normal" o "natural" (es decir, sin que esté presente el fármaco). Sobre la base de dicha comparación, se puede determinar si participan o no uno o más de los tipos de células en la creación del estado desencadenado por el fármaco (550). Si una o más de las respuestas en presencia del fármaco difieren de las respuestas del valor inicial, puede seguir investigándose el tipo de célula con la respuesta que ha cambiado para determinar si el tipo de célula participa o no en causar la inducción del estado en particular.

En diversas realizaciones alternativas y complementarias, se puede estudiar un área de interés *in vivo* (560), *in vitro* (570) o ambos. En realizaciones que estudian un área de interés *in vitro*, se pueden utilizar cortes del área de interés que mantienen intactos los circuitos neuronales. Se utilizan varios conjuntos de cortes, con un tipo de célula diferente dentro del área de interés que se modifica en cada conjunto. Alternativamente, se puede estudiar una sola célula de cada tipo de célula en el área de interés. El método alternativo *in vitro* permite observar la respuesta de la célula en aislamiento, así como su efecto sobre las células circundantes. El uso de varios conjuntos de cortes o células individuales permite utilizar un solo tipo de opsina para modificar todos los tipos de células diferentes sin provocar que todas las células se disparen a la vez.

En realizaciones que estudian un área de interés *in vivo*, es posible utilizar varios sujetos modificando un tipo de célula diferente en cada sujeto. Alternativamente, se pueden utilizar diferentes opsinas excitatorias, sensibles a diferentes longitudes de onda de luz para modificar los diferentes tipos de células en el área de interés.

En ciertas realizaciones más específicas, el área de interés es la capa V de la corteza prefrontal. Se modifican las neuronas piramidales de la capa V. Se cree que la corteza prefrontal está relacionada con estados psicóticos como la esquizofrenia. Se introduce un fármaco como quinpirol o PCP en las neuronas piramidales de la capa V. Al comparar la respuesta de las células antes de introducir el fármaco con la respuesta después de introducir el fármaco, se ha observado experimentalmente que un subconjunto de las neuronas piramidales de la capa V tiene una respuesta diferente. Este subconjunto de neuronas piramidales de la capa V puede utilizarse para estudiar la eficacia de diversos tratamientos para la esquizofrenia u otras psicosis.

45 Volviendo a la FIG. 6, se divulga un método para determinar un tipo de célula de interés. Se selecciona un tipo de célula diana (600). La selección de la célula diana puede realizarse basándose en resultados experimentales previos. Se estimulan las células diana y se observa la respuesta a la estimulación (610). En ciertas realizaciones más específicas, la estimulación de las células diana se consigue activando una molécula sensible a la luz introducida en las células diana. Se induce psicosis (620). Esto se puede conseguir introduciendo un fármaco conocido por inducir psicosis en un sujeto. Se vuelve a estimular las células diana y se observa la respuesta (630). Se compara la respuesta de las células diana antes de inducir la psicosis y después de inducir la psicosis (640). La comparación puede utilizarse para determinar si las células diana participan o no en causar la psicosis en el sujeto basándose en si las células reaccionan de forma diferente o no en presencia del fármaco conocido por inducir la psicosis.

55 En ciertas realizaciones de la presente divulgación, tanto un agonista D2, como quinpirol, como un fármaco psicotomimético, como fenciclidina ("PCP"), producen conductas similares a la esquizofrenia en seres humanos y animales. Si bien estos y otros fármacos actúan a través de diferentes receptores de neuronas, ambos fármacos inducen un fenotipo de despolarización dependiente de actividad en un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal ("PFC"). La despolarización dependiente de actividad en estas neuronas interrumpe el flujo de información a través de las neuronas y tiene una relación causal con conductas sociales de tipo síntomas negativos.

65 Diversos aspectos de la presente divulgación se refieren a las características de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal. Las características del subconjunto incluyen la despolarización dependiente de actividad que provoca biestabilidad e interrumpe el flujo de información a través de estas

neuronas. La biestabilidad disruptiva depende de un subtipo de canal  $\text{Ca}^{2+}$  (el canal de tipo L). Anteriormente, se ha relacionado dicho canal con la esquizofrenia. Asimismo, al mismo tiempo que la despolarización de las neuronas subconjunto crean un fenotipo no social, el bloqueo de los canales de tipo L corrige la disfunción social inducida por psicotomiméticos.

5 Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a la identificación de posibles fundamentos celulares de la conducta psicótica y la cognición deteriorada tal como se observa en la esquizofrenia y otras afecciones relacionadas. Las herramientas optogenéticas sirven para activar las células sin introducir una fuente eléctrica externa. Esto permite observar una respuesta a la activación de una población de células diana que ha sido infectada con una opsina, por ejemplo, sin que se activen otras células en el área también y alteren los resultados. En ciertas realizaciones, la respuesta de una célula se observa en el estado "natural" de las células, es decir, sin la presencia de un estímulo adicional conocido por causar cambios de conducta a un macro nivel. A continuación, se compara dicha respuesta con la respuesta de la célula de interés después de haber introducido un estímulo.

15 Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a la búsqueda de neuronas específicas relacionadas con la disfunción prefrontal en la esquizofrenia u otras psicosis. Se puede seleccionar un área del cerebro o tipo de célula neuronal en particular para un posterior examen, como puedan ser las neuronas piramidales de la capa V dentro de la PFC. Las neuronas piramidales de la capa V son de interés por lo que respecta a la esquizofrenia y otras formas de psicosis, ya que los receptores D2 en la PFC están concentrados las neuronas piramidales de la capa V y los receptores D2 son conocidos por desempeñar un papel en la esquizofrenia. Asimismo, las neuronas piramidales de la capa V son neuronas de respuesta de la neocorteza y son responsables de señales incluyendo la descarga del corolario.

25 Varios aspectos de la presente divulgación sirven para verificar la conexión que existe entre los trastornos psiquiátricos y neuronas concretas. Se modifican las neuronas de interés para expresar canalrodopsina-2 (ChR2) *in vivo*. Se estimula ChR2 en las neuronas modificadas. Se cuantifica el deterioro cognitivo y otros síntomas negativos como resultado de la estimulación. En los modelos en los que se emplean ratones transgénicos Thy1::Chr18, la expresión de ChR2 está localizada en las neuronas piramidales de la capa V en la PFC. Una estimulación óptica moderada (por ejemplo, 470 nm, 0,4 mW, 5 ms a 10 Hz) es suficiente para alterar la exploración social de los ratones sin afectar la locomoción normal. Aumentar la frecuencia de estimulación (por ejemplo, 470 nm, 0,4 mW, 2,5 ms a 40 Hz) anula prácticamente por completo la conducta social y provoca diversas conductas de tipo catatónico. La evaluación de estos resultados lleva a concluir que las células que expresan ChR2 contribuyen a conductas de tipo psicótico. En ciertas realizaciones, un hallazgo como éste sirve como base para investigar nivel de circuito las células que expresan la opsina.

35 Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a la combinación de la activación de opsina con manipulaciones farmacológicas de células diana de interés. El agonista de D2 quinpirol provoca conductas de tipo esquizofrenia en animales. Quinpirol se puede administrar *in vivo*, o se puede aplicar en cortes del área de interés. Cuando se utilizan cortes, se estudia la actividad de red suscitada con luz. Tal como se explica en los Ejemplos, incluyendo la FIG. 2A, la aplicación de quinpirol cambia las respuestas de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V. El cambio en la respuesta de la célula incluye algunos destellos de luz que dejan de suscitar potenciales de acción, nuevos potenciales de acción no relacionados con destellos de luz y potenciales de niveles estables. Los períodos de potenciales de acción de alta frecuencia van seguidos una despolarización prolongada que dura decenas o cientos de milisegundos más que la estimulación directa. En ciertos casos, esta despolarización prolongada provoca un aumento de los potenciales de acción. En otros casos, la despolarización produce una despolarización de tipo nivel estable por encima del potencial de acción umbral.

40 La inducción de una respuesta anormal utilizando un fármaco conocido por inducir psicosis permite examinar la eficacia de fármacos antipsicóticos, así como confirmar los mecanismos de los antipsicóticos conocidos. Por ejemplo, la aplicación del fármaco antipsicótico haloperidol invierte el efecto del quinpirol en las células diana. De forma similar, el antagonista de D2 específico sulpirida también invierte los efectos de quinpirol en las células diana cuando se utiliza en las dosis correctas. Véase los ejemplos para una mayor explicación sobre el efecto de quinpirol, haloperidol y sulpirida en los receptores D2, la tasa de potencial de acción y otras características de la célula diana.

55 Tal como se ha explicado brevemente, se observó que un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V presentaba despolarización dependiente de actividad cuando estaba presente quinpirol. Es posible identificar el subconjunto de células con esta reacción por un combamiento prominente y un rebote después de la despolarización como respuesta a un pulso de corriente hiperpolarizante cuando no está presente quinpirol. Las neuronas piramidales de la capa V sin el combamiento prominente ni rebote no presentan despolarización dependiente de actividad en presencia de quinpirol. Las dos subpoblaciones de neuronas piramidales no difieren en su resistencia al estímulo o en las constantes de tiempo de la membrana. Sin embargo, las células que presentan la despolarización dependiente de la actividad tienden a estar ligeramente más despolarizadas en reposo.

65 En ciertas realizaciones más específicas, todas las neuronas de ratones transgénicos Thy1: ChR2 en los que el quinpirol provoca la despolarización dependiente de actividad expresan ChR2 intensamente, mientras que, en

cambio, la mayoría de las neuronas que expresan ChR2 intensamente presentan despolarización dependiente de actividad. Por lo tanto, la subpoblación de neuronas piramidales de la capa V que presenta la despolarización dependiente de actividad fue sustancialmente similar a la población activada por ChR2 que tuvo como resultado anomalías sociales y otras anomalías conductuales en ratones transgénicos Thy1::ChR2. En ratones transgénicos, la despolarización dependiente de actividad puede ser provocada por inyección de corriente solamente y no requirió estimulación optogenética.

Las células que presentan la despolarización dependiente de actividad son morfológicamente diferenciadas. El subconjunto de neuronas piramidales de la capa V posee una única dendrita apical grande que no se bifurca hasta que alcanza las capas superficiales 2/3. Las células también tienen muchas proyecciones dentro de la capa V. Por el contrario, las células sin la despolarización dependiente de actividad tienen morfologías más heterogéneas, incluyendo dendritas apicales que se ramifican en las capas 4 o 5. Véase los ejemplos para una explicación más profunda de las diferencias entre los subconjuntos de neuronas piramidales de la capa 5.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, se estudian los patrones electrofisiológicos al nivel de una sola célula. La despolarización dependiente de actividad parece provocar un abanico de comportamientos celulares destacados, que incluyen una marcada despolarización que bloquea aún más el potencial de acción, biestabilidad prolongada, un incremento del potencial de acción provocado por la inyección de corriente y una postdespolarización que dura más que el período de estimulación directa y puede provocar potenciales de acción adicionales. La biestabilidad se asocia normalmente con la actividad rítmica en la banda beta/gamma. En ciertas realizaciones, los picos de biestabilidad en los espectros de potencia oscilan entre 20 y 40 Hz.

En ciertas realizaciones, el efecto neto de quinpirol sobre la excitabilidad neuronal (p.ej., aumento de los potenciales de acción frente al bloqueo de despolarización y fenómenos asociados) dependió de la dosis y la duración de la aplicación de quinpirol, así como de la intensidad del estímulo. En particular, puede producirse un aumento de los potenciales de acción durante la aplicación temprana de quinpirol o como respuesta a un estímulo de despolarización débil, que se transforma en una despolarización prolongada o biestabilidad tras una aplicación más prolongada de quinpirol o como respuesta a un estímulo de despolarización más intenso. La despolarización dependiente de actividad puede estar presente en condiciones de control (antes de aplicar quinpirol). Se observó que este fenómeno puede ser provocado en algunas circunstancias por niveles inusualmente elevados de activación del receptor D2 en un corte.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a la fijación de voltaje de célula completa. Esto permite identificar corrientes de canales iónicos que llevan a efecto la despolarización dependiente de actividad. En el subconjunto de neuronas piramidales de la capa V identificado (explicado anteriormente), las corrientes de  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje contribuyen a la despolarización dependiente de actividad. Un influjo de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de tipo L durante un potencial de acción activa las corrientes de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  que desempeñan un papel principal en la repolarización del potencial de acción. La fuerte activación de D2 potencia también el influjo de  $Ca^{2+}$  a través de canales de tipo L. Por otra parte, es de esperar que la fuerte activación de D2 potencie la AHP de potencial de acción y suprima selectivamente el potencial de acción a intervalos cortos entre disparos. Es de esperar que el bloqueo de D2 suprima el reclutamiento de corrientes de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , con el resultado de una repolarización del potencial de acción comprometida, potenciales de acción más amplios, una mayor inactivación del canal de  $Na^+$ , un umbral de potencial de acción más alto y menores potenciales de acción a intervalos cortos entre disparos.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, se comparan los efectos de quinpirol en una población de células diana con los efectos de otro psicotomimético, como fenciclidina (PCP). PCP produce un síndrome muy semejante a la esquizofrenia en seres humanos y lleva utilizándose mucho tiempo para establecer modelos de esquizofrenia en animales. Los efectos psicotomiméticos de PCP se han atribuido durante mucho tiempo al bloqueo del receptor NMDA. Sorprendentemente, se ha observado que a una dosis similar a la que bloquea los receptores NMDA prefrontales, PCP produjo una despolarización dependiente de actividad y una postdespolarización que duró más que el período de estimulación directa que eran prácticamente idénticas a las provocadas por quinpirol. A diferencia del quinpirol, los efectos no están bloqueados por sulpirida, pero sí están bloqueados por nifedipina. Esto indica que, si bien PCP no activa receptores D2, sí que produce una despolarización dependiente de actividad a través de los canales de  $Ca^{2+}$  de tipo L. PCP produce un abanico de efectos similar a través de la despolarización dependiente de actividad al de quinpirol, incluyendo una postdespolarización que dura más que el período de estimulación directa, una marcada despolarización que bloqueó el potencial de acción, biestabilidad y disparo persistente que dura más que el período de estimulación directa. La despolarización dependiente de actividad se limita a la subpoblación de neuronas piramidales de la capa V que presentaron un combamiento prominente y postdespolarización de rebote como respuesta a la inyección de corriente hiperpolarizante. Cabe destacar que, en algunos casos se observó que PCP provocaba amplios potenciales de acción que fueron bloqueados por nifedipina y que pueden representar potenciales de acción de  $Ca^{2+}$  dendrítico. Durante las respuestas a una sucesión de pulsos de luz en cortes corticales de Thy1::ChR2, PCP (al igual que quinpirol) suprimió los potenciales de acción a intervalos cortos entre disparos, lo cual indica que los efectos de PCP sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$  del tipo L (como los del quinpirol) potencian el reclutamiento de corrientes de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  durante los potenciales de acción.

- Quinpirol, psicotomimético estructural y funcionalmente diferenciado, y PCP convergen hacia un estado neuronal aberrante dependiente del canal de  $Ca^{2+}$  causalmente importante común. Por consiguiente, PCP, aunque no se haya relacionado anteriormente a este tipo de ruta, parece ejercer parte de su acción psicotomimética a través del reclutamiento de canales de  $Ca^{2+}$  de tipo L. En presencia de PCP, el antagonista del canal de calcio de tipo L
- 5 nifedipina mejora los déficits sociales inducidos por PCP en ratones. La nifedipina también reduce la incidencia de conductas de tipo catatónico provocadas por PCP solamente. Las dosis apropiadas de nifedipina reducen niveles excesivos de activación del canal de calcio, evitando así potenciales de acción prolongados o biestabilidad, y restablecen la respuesta prefrontal normal y otros comportamientos mediados por la corteza prefrontal.
- 10 Al aplicar las respuestas observadas del subconjunto de neuronas piramidales de la capa V a los síntomas observados en pacientes con esquizofrenia y/u otras formas de enfermedad mental, la despolarización dependiente de actividad representa un fenómeno celular único que podría dar cuenta del comportamiento perseverante y tangencial en redes prefrontales. Por consiguiente, además de para inducir despolarización dependiente de actividad, se pueden utilizar las neuronas como modelo de enfermedad para estudiar nuevos posibles tratamientos
- 15 para enfermedades como la esquizofrenia.
- Se cree que la presente divulgación es útil para focalizar poblaciones de células neuronales específicas relacionadas con diversos trastornos psiquiátricos y, más específicamente, a psicosis y/o síntomas de psicosis. Las aplicaciones específicas de la presente invención facilitan la evaluación, el tratamiento y la caracterización de la psicosis y/o los
- 20 síntomas de la psicosis al focalizarse en poblaciones de células neuronales específicas relacionadas con ellos. Dado que muchos aspectos de las realizaciones ilustrativas divulgadas en el presente documento se refieren y están construidas sobre desarrollos anteriores en este campo, la explicación que se expone a continuación compendia dichos desarrollos previos para proporcionar una sólida comprensión de los fundamentos y directrices que subyacen en ellos de los que se pueden extraer detalles y modificaciones de su implementación incluyendo los incluidos en los
- 25 Ejemplos. Si bien la presente invención no está necesariamente limitada a dichas aplicaciones, se pueden apreciar diversos aspectos de la invención a través de una explicación de diversos ejemplos en los que se aplica dicho contexto.
- Las realizaciones de la presente divulgación se refieren a focalización de células que son un subconjunto de
- 30 neuronas piramidales de la capa V. La focalización de estas células puede ser particularmente útil para generar, estudiar, tratar o caracterizar de otro modo estados psicóticos.
- Volviendo a la FIG. 7, se representa un modelo para el control y la caracterización de trastornos neuronales con arreglo a una realización de la presente divulgación. Se elige un tipo de célula identificado por su participación en un
- 35 trastorno neuronal de interés. Dependiendo de las características y la función conocida del tipo de célula, se selecciona un opsina (700) para infectar el tipo de célula identificado. Por ejemplo, en ciertas realizaciones más específicas, se elige una opsina excitatoria, como ChR2, para infectar el tipo de célula identificada. Se selecciona ChR2 cuando se desea la excitación del tipo de célula identificado. El tipo de célula identificado puede modificarse para que presente una conducta aberrante utilizando una segunda opsina o introduciendo un fármaco conocido por
- 40 inducir la conducta aberrante de la enfermedad cuyo modelo se está estableciendo. La conducta puede presentarse a nivel macro y puede incluir los signos externos de la enfermedad cuyo modelo se está estableciendo. En otras realizaciones la conducta de la que se hace un seguimiento es a nivel celular y puede incluir la respuesta de la célula a un estímulo.
- 45 En diversas realizaciones, tal como se representa en la FIG. 7, el tipo de célula identificado puede localizarse y estimularse (705), *in vivo* (730) o *in vitro* (725). Es posible estimular el tipo de célula identificado como una sola célula (750) o como parte de un corte de un animal (745), por ejemplo. Para el establecimiento de modelos *in vivo* (730), el tipo de célula identificado puede estar en un animal transgénico (735) o un ser humano (740), por ejemplo.
- 50 Una vez entregada la opsina seleccionada al tipo de célula de interés, se estimula el tipo de célula identificado (705) y se observa la respuesta (720). La respuesta del tipo de célula identificado puede observarse cuando la célula se encuentra en su estado "normal" o cuando se ha inducido una patología, o en ambos casos. Tras las observaciones iniciales, se selecciona el fármaco de interés. Puede seleccionarse el fármaco basándose en el tipo de célula
- 55 identificado, la enfermedad cuyo modelo se está estableciendo, observaciones previas de otros fármacos, una combinación de estos factores, u otros factores que sirven de guía para determinar posibles fármacos para tratar una enfermedad concreta. Se introduce una dosis inicial del fármaco en la célula identificada (710) y se observa la respuesta de la célula al estímulo en presencia del fármaco (715). A continuación, se compara la respuesta con la respuesta de la célula cuando no está presente el fármaco (755).
- 60 En otras realizaciones, se compara la respuesta de la célula en presencia del fármaco de interés con la respuesta de la célula en presencia de un fármaco conocido por inducir una conducta aberrante. Es posible también introducir el fármaco de interés en el tipo de célula identificado además del fármaco conocido por inducir una conducta aberrante.
- 65 En ciertas realizaciones, se modifica la dosis del fármaco de interés y se vuelve a estimular el tipo de célula identificado sobre la base de la evaluación. La respuesta a la dosis modificada puede compararse entonces con la respuesta en ausencia del fármaco de interés, así como con la respuesta a la dosificación previa del fármaco de

interés. Es posible también comparar las respuestas con otros fármacos o tratamientos para la enfermedad cuyo modelo se está estableciendo. Esto permite determinar la dosis y el fármaco óptimos para una enfermedad concreta. Dado que la respuesta observada puede ser una respuesta de conducta o una respuesta celular, se puede determinar una dosis y/o fármaco eficaz a partir de un conjunto de posibles fármacos.

5 En ciertas realizaciones más específicas, un tipo de célula identificado es un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V. Se introduce un fármaco como PCP o quinpirol en el tipo de célula identificado para inducir una conducta aberrante en correspondencia con una patología cuyo modelo se va a establecer. El tipo de célula identificada se estimula entonces utilizando luz visible que activa la opsina introducida en la célula y se observa la respuesta a la estimulación. A continuación se introduce un segundo fármaco, el fármaco de interés, en el tipo de célula identificado. Se observa la respuesta al estímulo en presencia del fármaco de interés y se compara con la respuesta de la célula en la patología. Esta comparación puede servir para determinar la eficacia del fármaco de interés. Puede servir asimismo para determinar si se debería introducir o no una modificación en la dosis u otros aspectos de la administración del fármaco.

15 Volviendo a la FIG. 8, se representa un método para determinar la eficacia de un tratamiento propuesto con arreglo a una realización de la presente divulgación. Se puede producir una conducta aberrante a nivel celular cuando se investiga un tratamiento *in vitro*. Cuando se investiga un tratamiento *in vitro*, la conducta aberrante puede ser a nivel celular y/o a nivel macro, incluyendo la conducta observable del paciente. Puede inducirse la conducta aberrante (800) mediante la administración de un fármaco conocido por causar la conducta aberrante que se va a tratar. Se administra un tratamiento propuesto (810), ya sea al paciente (*in vivo*) o a una célula (o células) (*in vitro*). Se observa la respuesta de la célula o del paciente al estímulo en presencia del tratamiento (820). A continuación, las observaciones sirven para evaluar la eficacia del tratamiento (830).

25 En diversas realizaciones con arreglo a la FIG. 8, el tratamiento puede ser un fármaco, un estímulo eléctrico o un tratamiento conductual, por ejemplo. La respuesta puede ser a un estímulo de luz, por ejemplo. El estímulo de la luz puede excitar o inhibir las células sobre la base de una molécula sensible a la luz seleccionada introducida en una población celular de interés.

30 Las distintas realizaciones descritas y presentadas en las figuras pueden implementarse en combinación y/o de otras maneras. Uno o más de los artículos representados en los dibujos/figuras también pueden implementarse por separado o de manera integrada en mayor medida, o eliminarse y/o hacerse no operativos en ciertos casos, según sea útil de acuerdo con las aplicaciones en particular. Por ejemplo, las realizaciones que implican el establecimiento de modelos de la enfermedad, tal como se ha explicado, pueden implementarse empleando diversas opsinas y estímulos. Asimismo, pueden establecerse modelos *in vivo* o *in vitro*. A la vista de la descripción del presente documento, las personas especializadas en la técnica reconocerán que es posible introducir muchos cambios en ella.

### Ejemplos

40 A continuación, se demuestra que el agonista de D2 quinpirol y el psicotomimético fenciclidina, que producen conductas de tipo esquizofrenia en seres humanos y animales, pero que actúan a través de diferentes receptores, convergen en un nuevo fenotipo de despolarización dependiente de actividad en un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la PFC. Se demuestra que esta despolarización dependiente de actividad provoca biestabilidad e interrumpe el flujo de información a través de estas neuronas y que dicha inestabilidad disruptiva depende de un subtipo de canal de  $Ca^{2+}$  (el canal de tipo L) que ha sido relacionado con la esquizofrenia. Por último, se demuestra que el endofenotipo celular de estas neuronas tiene una relación causal con las conductas sociales del tipo de síntomas negativos; la despolarización selectiva de estas neuronas optogenéticamente crea un fenotipo no social, mientras que el bloqueo de los canales de tipo L corrige la disfunción social inducida por psicotomiméticos. En conjunto, estos datos definen un nuevo mecanismo celular de disfunción prefrontal reclutado por mecanismos pertinentes para la esquizofrenia y trastornos relacionados.

#### **Ejemplo 1: conductas de tipo psicótico inducidas en ratones por estimulación óptica de las neuronas piramidales de la capa V infralímbica que expresan ChR2.**

55 Se optó por realizar la presente investigación en neuronas piramidales de la capa V dentro de la PFC por dos razones. En primer lugar, los receptores D2 en la PFC están concentrados en las neuronas piramidales de la capa V (3, 4) y los receptores D2 desempeñan un crucial papel en la esquizofrenia y otras formas de psicosis (5) ya que todos los antipsicóticos conocidos bloquean el receptor D2, mientras que los fármacos que aumentan los niveles de dopamina (p. ej., L-Dopa, estimulantes) y los agonistas del receptor de dopamina pueden causar psicosis en individuos normales o exacerbar los síntomas en pacientes con esquizofrenia. De hecho, la unión a receptores D2 corticales puede explicar específicamente la eficacia superior de ciertos antipsicóticos, particularmente para los síntomas cognitivos y negativos de la esquizofrenia (6). En segundo lugar, las neuronas piramidales de la capa V son neuronas de respuesta claves de la neocorteza, responsables de las señales que incluyen la descarga del corolario que, cuando es deficiente, podría contribuir a fallos de autocontrol que producen síntomas psicóticos como alucinaciones auditivas (7).

Para verificar que estas neuronas contribuyen a la conducta psicótica en ratones, se estimuló canalrodopsina-2 (ChR2) en las neuronas piramidales de la capa V dentro de la PFC (**FIG. 1A-B**) utilizando ratones transgénicos Thy1::ChR18 perfectamente establecidos, en los que la expresión neocortical de ChR2 está localizada principalmente en las neuronas piramidales de la capa V (8). Para cuantificar el deterioro cognitivo y los síntomas negativos característicos de la esquizofrenia, se midió la exploración social en estos ratones y, para evaluar los síntomas de tipo positivo, se midió la conducta desorganizada o catatónica, incluyendo los movimientos estereotipados y la rigidez.

### **Materiales y métodos**

Se consiguió la estimulación óptica de neuronas piramidales de la capa V infralímbica que expresan ChR2-EYFP en ratones transgénicos Thy1::ChR2 mediante la colocación de fibra óptica unilateral por encima de la corteza prefrontal infralímbica (**FIG. 1A-B**). La estimulación óptica de banda gamma de baja frecuencia y alta frecuencia de neuronas de capa V se consiguió con luz azul de 473 nm (10 Hz, duración de pulso 5 ms) y luz azul de 473 nm (40 Hz, duración de pulso 5 ms), respectivamente. Para cuantificar el deterioro cognitivo y los síntomas negativos característicos de la esquizofrenia, se midió la exploración social en estos ratones y, para la evaluación de los síntomas de tipo positivo, se midieron las conductas desorganizadas o catatónicas, incluyendo los movimientos estereotipados y la rigidez.

### **Resultados**

Se observó que una estimulación óptica relativamente moderada (470 nm, 0,4 mW, 5 ms a 10 Hz) fue suficiente para perturbar notablemente la exploración social sin afectar la locomoción normal (**FIG. 1C-E**). Específicamente, la estimulación óptica de baja frecuencia disminuyó la exploración social de cría joven en 6 de los 6 animales Thy1::ChR2-EYFP examinados ( $p = 0,03$ ; se intercalan periodos de luz encendida/luz apagada) (**FIG. 1C-D**). Los datos de campo abierto demostraron que no hubo diferencia en la velocidad total (izquierda) o longitud del rastro (derecha) de animales Thy1::ChR2 tras la estimulación óptica de baja frecuencia, lo cual indica que la locomoción normal no se vio afectada con una estimulación moderada (**FIG. 1E**). El aumento de la frecuencia de estimulación (470 nm, 0,4 mW, 2,5 ms a 40 Hz) eliminó prácticamente por completo la conducta social y provocó una serie de conductas de tipo catatónico (**FIG. F-H**). Específicamente, el aumento de la frecuencia de estimulación óptica de neuronas piramidales de la capa V eliminó prácticamente por completo la exploración social de cría joven en 6 de los 6 animales examinados ( $p < 0,01$ ; intercalando periodos de luz encendida/luz apagada) (**FIG. F-G**). Por otra parte, la estimulación óptica de alta frecuencia de 40 Hz aumentó significativamente el tiempo empleado en una postura rígida de tipo catatónico en 3 de los 6 ratones examinados (izquierda;  $p < 0,05$ ) y se observó una tendencia a pasar más tiempo enganchados en movimientos de la cabeza de un lado a otro repetitivos en 2 de los 6 ratones examinados (a la derecha,  $p = 0,13$ ) (**FIG. 1H**). Estos resultados validan aún más la idea de que la actividad aberrante en neuronas piramidales de la capa V en la PFC puede contribuir a las conductas de tipo esquizofrénico (9) y servir como base para la investigación a nivel de circuito. Asimismo, estos resultados demuestran que la estimulación óptica de neuronas piramidales de la capa V que expresan ChR2 en una línea de ratones Thy1::ChR2-EYFP da cabida al empleo de estos ratones como modelo animal para la esquizofrenia.

### **Ejemplo 2: un agonista de D2 provoca una despolarización dependiente de actividad mediada por canales de $Ca^{2+}$ de tipo L en un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V que es reversible mediante el tratamiento con antagonistas de D2**

La estimulación óptica de neuronas piramidales de la capa que expresa ChR2 induce una conducta de tipo esquizofrénico en ratones transgénicos Thy1::ChR2-EYFP. Por lo tanto, se procedió a explorar los procesos a través de los cuales las manipulaciones farmacológicas pertinentes para la esquizofrenia podrían afectar a estas neuronas piramidales de la capa V en la PFC. Tal como se ha explicado, los receptores D2 desempeñan un papel clave en la esquizofrenia y el agonista de D2 quinpirol provoca conductas de tipo esquizofrenia en los animales (10, 11). Para explorar los procesos a través de los cuales las manipulaciones farmacológicas pertinentes para la esquizofrenia podrían afectar a estas neuronas piramidales de la capa V en la PFC, se emplearon cortes prefrontales de ratones Thy1::ChR2 para estudiar la actividad de red suscitada con luz en presencia o ausencia de quinpirol seguido de tratamiento con antagonistas de D2 (**FIG. 2 y 3**).

### **Materiales y métodos**

Se utilizaron cortes prefrontales de ratones Thy1::ChR2 para estudiar la actividad de red suscitada con luz. Se sometieron a estimulación con luz cortes de cerebro aislados de ratones transgénicos Thy1::ChR2 *in vitro* y se llevó un seguimiento de las neuronas piramidales de la capa V mediante registros electrofisiológicos para respuestas celulares una sucesión de destellos de luz (470 nm, 1 ms) en ausencia de un agonista de D2 (control) o presencia de un agonista de D2 (20  $\mu$ M quinpirol). A continuación, se lavó el corte de cerebro para eliminar el quinpirol y se trató con 0,2-2  $\mu$ M de haloperidol o 5  $\mu$ M de sulpirida, ambos conocidos antagonistas de D2. Se cuantificó la tasa de potencial de acción de las neuronas piramidales de la capa V y la cantidad de información transmitida por la tasa de potencial de acción, así como el número de potenciales de acción en función del intervalo de disparo.

A continuación, se trataron las neuronas piramidales de la capa V con pulsos de corriente hiperpolarizantes y/o despolarizantes en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de quinpirol solamente o en combinación con un antagonista de D2, haloperidol (2  $\mu\text{M}$ ) o sulpirida (5  $\mu\text{M}$ ), o con un antagonista del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ). Los registros electrofisiológicos sirvieron para llevar un seguimiento de las respuestas celulares de las neuronas piramidales de la capa V a la estimulación con luz *in vitro* cuando se encontraban en las condiciones o los tratamientos farmacológicos.

## Resultados

Tal como se ilustra en la **FIG. 2A**, la aplicación de quinpirol (20  $\mu\text{M}$ , rastro morado, panel inferior) produjo un marcado cambio en las respuestas de una fracción sustancial de neuronas piramidales de la capa V, de modo que algunos destellos de luz que antes suscitaban potenciales de acción dejaron de hacerlo (flechas), al mismo tiempo que aparecieron nuevos potenciales de acción, no relacionados con los destellos de luz ("+" y potenciales de nivel estable ("p"). En un subconjunto de células piramidales de la capa V, se observó que los períodos de los potenciales de acción de alta frecuencia fueron seguidos por una despolarización prolongada, que duro decenas o cientos de milisegundos más que la estimulación directa (**FIG. 2B**, panel central, rastro morado, observado en 16/26 de neuronas piramidales de la capa V). Esta despolarización dependiente de actividad podría provocar otros potenciales de acción o producir una despolarización de tipo nivel estable por encima del umbral de potencial de acción (**FIG. 2B**). El lavado de quinpirol y la aplicación simultánea del fármaco antipsicótico haloperidol invirtieron rápidamente este efecto (**FIG. 2B**, panel inferior, rastro verde, reversión con 0,2-10  $\mu\text{M}$  de haloperidol en 9/9 células), al igual que la aplicación simultánea de quinpirol y el antagonista de D2 específico sulpirida (reversión con 5  $\mu\text{M}$  de sulpirida, observado en 2/2 células).

Cabe destacar que se observó una curva con forma de U invertida para los efectos de la activación del receptor D2 sobre la cantidad de información que transmitió la tasa de potencial de acción de estas neuronas sobre la tasa de destellos de luz; la cantidad de información fue máxima en condiciones de control, intermedia cuando los receptores D2 fueron activados por quinpirol (20  $\mu\text{M}$ ) y mínima cuando los receptores D2 fueron bloqueados con haloperidol (0,2-2  $\mu\text{M}$ ) o sulpirida (5  $\mu\text{M}$ ) (**FIG. 2C**;  $p < 0,05$ , control frente a quinpirol,  $p < 0,01$ , control frente a haloperidol/sulpirida, ANOVA de 2 vías). Se identificó un mecanismo para esta relación, ya que también había una curva en forma de U para los efectos de la activación del receptor D2 en los potenciales de acción como respuesta a la estimulación ChR2: las neuronas presentaron el mayor potencial de acción en condiciones de control y el mínimo cuando los receptores D2 fueron bloqueados con haloperidol (0,2-2  $\mu\text{M}$ ) o sulpirida (5  $\mu\text{M}$ ) (**FIG. 2D**;  $p < 0,01$ , control frente a quinpirol;  $p < 0,001$ , control frente a haloperidol/sulpirida; ANOVA de 2 vías). Las tasas de potencial de acción más bajas cuando los receptores D2 fueron activados por quinpirol o bloqueados con haloperidol o sulpirida se relacionaron específicamente con la pérdida de potenciales de acción a intervalos cortos de disparo (**FIG. 2E**;  $n = 4$  células por grupo) y, de hecho, los efectos de los agonistas y antagonistas de D2 reflejaron aparentemente los efectos sobre los potenciales de acción repetitivos (**FIG. 2F**). La activación de D2 con quinpirol (rastro morado) mejoró la posthiperpolarización de potencial de acción (AHP, flechas en la **FIG. 2F**), lo que concuerda con hacer que los impulsos posteriores por debajo del umbral provocaran un segundo potencial de acción en condiciones de control. En cambio, el bloqueo de D2 con sulpirida amplió los potenciales de acción, lo que concuerda con la prevención de los potenciales de acción a intervalos cortos entre disparos a través de un mecanismo como la inactivación del canal de  $\text{Na}^+$ .

Los autores de la invención caracterizaron mejor la despolarización dependiente de la actividad. En primer lugar, buscaron determinar si estaría presente en una subpoblación específica de neuronas piramidales de la capa V definidas según cualquiera de las propiedades electrofisiológicas identificadoras en particular, una matriz de expresión génica o morfología. Se observó que prácticamente todas las células piramidales de la capa V con un combamiento prominente y postdespolarización de rebote ("\*" en la **FIG. 3A**, panel superior) como respuesta a un pulso de corriente hiperpolarizante presentaron despolarización dependiente de actividad tras la aplicación de 20  $\mu\text{M}$  de quinpirol (16/17 células), en cambio 0/9 neuronas piramidales de la capa V sin estas propiedades presentaron la despolarización dependiente de actividad tras la aplicación de quinpirol. Estas dos subpoblaciones de neuronas piramidales no difirieron en su resistencia al estímulo ni en las constantes de tiempo de membrana, aunque las células que presentaron la despolarización dependiente de la actividad estaban ligeramente más despolarizadas en reposo. Cabe destacar que todas las neuronas de los ratones transgénicos Thy1::ChR2 en los que quinpirol provocó la despolarización dependiente de actividad expresaron ChR2 intensamente (14/14 células); en cambio, la mayoría de las neuronas que expresaron intensamente ChR2 presentaron despolarización dependiente de actividad (14/18 células). Por tanto, la subpoblación de neuronas piramidales de la capa V que presentó despolarización dependiente de actividad fue sustancialmente similar a la población activada por ChR2 que tuvo como resultado anomalías sociales y otras anomalías de conducta en ratones transgénicos Thy1::ChR2 (**FIG. 1**). Cabe destacar que la despolarización dependiente de la actividad pudo ser provocada por inyección de corriente solamente ("1" en la **FIG. 3A**, panel central, rastro morado) y no requirió estimulación optogenética ni que se manifestara el tipo de actividad de red que se presenta en la **FIG. 2**, tal como se describe a continuación. Se identificaron asimismo las características morfológicas relacionadas con la presencia de la despolarización dependiente de la actividad que puede estar relacionada con las subredes morfológicas en la capa V de PFC medial descritas (12): las células con despolarización dependiente de actividad poseían invariablemente una única dendrita apical grande sin bifurcación hasta alcanzar las capas superficiales 2/3, en combinación con muchos procesos que se proyectaron dentro de la

capa V (FIG. 3B; panel izquierdo; n = 5), mientras que, en cambio, las células sin despolarización dependiente de actividad tuvieron morfologías más heterogéneas, que incluyeron frecuentemente dendritas apicales que se ramificaban en capas 4 y 0 5 (panel derecho)

5 Para comprender las consecuencias celulares de este efecto, se exploraron los patrones electrofisiológicos asociados identificados a nivel de célula individual. La despolarización dependiente de actividad provocó aparentemente un abanico de comportamientos celulares destacados que incluyeron una marcada despolarización que bloqueó un mayor potencial de acción ("2" en la FIG. 3A), biestabilidad prolongada ("3" en la FIG. 3A), un aumento del potencial de acción provocado por la inyección de corriente ("4" en la FIG. 3C) y una postdespolarización que duró más que el período de estimulación directa y pudo provocar potenciales de acción adicionales ("5" en la FIG. 3C). Se cuantificó la postdespolarización observada más habitualmente tal como se muestra en la FIG. 3D y en la FIG. 3E se compendian un abanico más amplio de efectos provocados por quinpirol como fracción de las neuronas piramidales de la capa V con un combamiento prominente y postdespolarización de rebote que presentó una postdespolarización (ADP) después de la inyección de corriente despolarizante, bloqueo de despolarización de potencial de acción (bloqueo de depol), biestabilidad o disparo persistente que duró más que el período de inyección de corriente despolarizante. Cabe destacar que la biestabilidad se asoció normalmente con la actividad rítmica en la banda beta/gamma (FIG. 3F; 4/6 células con biestabilidad tenían picos en sus espectros de potencia entre 20 y 40 Hz).

20 A continuación, se trató de confirmar que la despolarización dependiente de actividad estaba mediada por receptores D2. De hecho, se observó que podía bloquearse utilizando el antipsicótico haloperidol (0,2 - 10  $\mu$ M; FIG. 3A, panel inferior, rastro verde; 9/9 células), o el antagonista de D2 más específico sulpirida (5  $\mu$ M; FIG. 3C, panel inferior, rastro verde, 2/2 células). La despolarización dependiente de actividad también pudo ser provocada con dosis más bajas de quinpirol; en 8/10 células con un combamiento prominente, durante, y postdespolarización rebote después de un pulso de corriente hiperpolarizante, 5  $\mu$ M (-) Quinpirol o 10  $\mu$ M de quinpirol provocó despolarización dependiente de la actividad y los fenómenos relacionados (p. ej., una postdespolarización y/o biestabilidad prolongadas). También encontramos que el efecto neto de quinpirol en la excitabilidad neuronal (p. ej., un aumento del potencial de acción frente al bloqueo despolarización y fenómenos asociados) dependió de la dosis y la duración de la aplicación de quinpirol, así como de la potencia del estímulo. En particular, a menudo se observó un aumento de los potenciales de acción durante la aplicación temprana de quinpirol o como respuesta a un estímulo despolarizante débil, que se transformó en una despolarización o biestabilidad prolongada después de una aplicación más prolongada de quinpirol o como respuesta a un estímulo de despolarización más fuerte. En casos aislados, la despolarización dependiente de la actividad estaba presente en condiciones de control (antes de aplicar quinpirol), lo que indica que este fenómeno podría ser provocado en algunas circunstancias por niveles inusualmente elevados de activación del receptor D2 en el corte; de hecho, en tales casos (n = 3), dosis moderadas de haloperidol (0.2 - 2  $\mu$ M) pudieron convertir la biestabilidad en una postdespolarización más moderada o bloquear la despolarización dependiente de la actividad completamente.

40 A continuación, se trató de identificar las posibles corrientes de los canales iónicos que median la despolarización dependiente de actividad en fijación de voltaje de células completas. Después de una serie de etapas de 1 ms a 0 mV para simular potenciales de acción, el quinpirol (20  $\mu$ M) provocó una corriente de despolarización de activación lenta a -30 mV, y aumentó una corriente de cola de inactivación rápida a -60 mV; ambos efectos fueron bloqueados por sulpirida (5  $\mu$ M). Estas observaciones indican que las corrientes de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje contribuyen a la despolarización dependiente de actividad y, de hecho, la aplicación de antagonistas del canal de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje bloquearon la despolarización dependiente de actividad en 5/5 células (5 mM  $Ni^{2+}$  o 100  $\mu$ M nifedipina, n = 2; nifedipina 10  $\mu$ M, n = 3, FIG. 3G, panel inferior, rastro gris). Este papel para los canales de  $Ca^{2+}$  del tipo L en la despolarización dependiente de actividad puede informar la curva en forma de U sobre los efectos de la activación del receptor D2 en el potencial de acción (FIG. 2C-F), cuando el influjo de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de tipo L durante un potencial de acción activa las corrientes  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  que desempeñan un papel principal en la repolarización de potencial de acción (13). Sería de esperar que la intensa activación de D2 mejorara el influjo de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de tipo L (13), aumentara el AHP de potencial de acción y suprimiera selectivamente los potenciales de acción a intervalos entre disparos cortos; en cambio sería de esperar que el bloqueo de D2 suprimiera el reclutamiento de corrientes de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , lo que resulta en una repolarización de potencial de acción comprometida, potenciales de acción más amplios, una mayor inactivación del canal de  $Na^+$ , un umbral de canal de acción más alto y, en última instancia, menores potenciales de acción a intervalos cortos entre disparos.

### **Ejemplo 3: la fenciclidina (PCP) también provoca una despolarización dependiente de actividad a través de canales de $Ca^{2+}$ del tipo L que es reversible por tratamiento**

60 Una vez estudiados los efectos del quinpirol en las neuronas que median la respuesta prefrontal y que se ha identificado un mecanismo que interrumpe su capacidad para transmitir información, se compararon a continuación los efectos de quinpirol con los de otro psicotomimético, fenciclidina (PCP). PCP produce un síndrome que se parece mucho a la esquizofrenia en seres humanos (14) y lleva utilizándose mucho tiempo para establecer un modelo de esquizofrenia en animales.

### **Materiales y métodos**

Se sometieron a estimulación de corriente directa cortes de cerebro aislados de ratones transgénicos Thy1::ChR2 y se llevó el seguimiento de una neurona piramidal de la capa V con registros electrofisiológicos de respuestas celulares a pulsos de corriente despolarizantes en ausencia o presencia de 5  $\mu\text{M}$  de PCP. A continuación, se trató el corte del cerebro con 5  $\mu\text{M}$  de sulpirida o 10  $\mu\text{M}$  de nifedipina y el registro electrofisiológico sirvió para llevar un seguimiento de la respuesta celular al tratamiento. Para cuantificar el deterioro cognitivo y los síntomas negativos característicos de la esquizofrenia, se midió la exploración social en ratones tratados con 4-15 mg/kg de nifedipina solamente o en combinación con 5 mg / kg de PCP.

La fracción de las neuronas piramidales de la capa V con un combamiento prominente y postdespolarización de rebote presentó postdespolarización (ADP) después de la inyección de corriente despolarizante, bloqueo de despolarización de potenciales de acción (bloqueo despol.), biestabilidad o disparo persistente que duró más que el período de inyección de corriente despolarizante, tras la aplicación de 5  $\mu\text{M}$  de PCP (**FIG. 4B**). Arriba: nifedipina deteriora la exploración social de una manera dependiente de la dosis (n = 8 ratones en cada grupo). Abajo: PCP deteriora la exploración social, pero nifedipina mejora dicho déficit en ratones tratados con PCP de una manera dependiente de la dosis (n = 8 ratones en cada grupo) (**FIG 4C**). Respuestas de las neuronas piramidales de la capa V a pulsos de corriente despolarizantes y hiperpolarizantes en un ratón de tipo silvestre, y en el ratón en el que se ha introducido genéticamente TS2neo diseñado como un gen de ganancia de función CACNA1C (**FIG. 4D**) (20). \* = p <0,05, \*\* = p <0,01. El efecto estuvo presente en 4/4 células mutantes y 0/5 células de tipo silvestre con un gran combamiento y despolarización rebote como respuesta a la inyección de corriente hiperpolarizante (p <0,01 según la prueba exacta de Fisher).

### **Resultados**

Los efectos psicotomiméticos de PCP se han atribuido durante mucho tiempo al bloqueo del receptor NMDA; sorprendentemente, los autores de la invención han observado que a una dosis similar a la que bloquea los receptores NMDA prefrontal (5  $\mu\text{M}$ ) (15), PCP produjo una despolarización dependiente de actividad y una postdespolarización que duró más que el período de estimulación directa virtualmente idénticas a las provocadas con quinpirol (**FIG. 4A**, observada en 6/12 neuronas piramidales de la capa V). Estos efectos no fueron bloqueados por el antagonista de D2 sulpirida (5  $\mu\text{M}$ , n = 2 células), pero fueron bloqueados por el antagonista del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L nifedipina (10  $\mu\text{M}$ , n = 2 células), lo cual indica que mientras PCP no activa receptores de D2, como quinpirol, produce una despolarización dependiente de actividad a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L. De manera llamativa, PCP produjo un abanico similar de efectos a través de la despolarización dependiente de actividad que quinpirol, incluyendo una postdespolarización que duró más que el período de estimulación directa, una marcada despolarización que bloqueó el potencial activo, biestabilidad y disparo persistente que duró más que el período de estimulación directa (**FIG. 4B**). La despolarización dependiente de actividad se limitó una vez más a la subpoblación de neuronas piramidales de la capa V que presentaron un combamiento prominente y postdespolarización de rebote como respuesta a la inyección de corriente hiperpolarizante (se observó despolarización dependiente de actividad en 6/9 de estas neuronas y en 0/3 neuronas piramidales de la capa V sin estas propiedades). Cabe mencionar que, en algunos casos, se observó que PCP provocó amplios potenciales de acción que fueron bloqueados con nifedipina y pueden representar potenciales de acción de  $\text{Ca}^{2+}$  dendríticos (**FIG. 4A**). Por último, durante las respuestas a una sucesión de pulsos de luz en Thy1:: cortes corticales de ChR2, PCP (al igual que quinpirol) suprimió los potenciales de acción a intervalos cortos entre disparos, lo cual indica que los efectos de PCP sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (al igual que los de quinpirol) potencian el reclutamiento de corrientes de  $\text{K}^{+}$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  durante los potenciales de acción.

Si los psicotomiméticos estructural y funcionalmente diferenciados quinpirol y PCP convergen realmente ante un estado neuronal aberrante dependiente del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  causalmente importante común, es posible predecir que PCP (no relacionada previamente con este tipo de ruta) podría ejercer parte de su acción psicotomimética al reclutar canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L. Para probar esta nueva hipótesis, se midieron los efectos de PCP (5 mg / kg) y del antagonista del canal de calcio de tipo L nifedipina (4, 15 mg / kg) en la conducta social en ratones. De acuerdo con la hipotética curva de efectos en forma de U, se observó que la nifedipina solamente deterioró la sociabilidad de una manera dependiente de la dosis (**FIG. 4C**, parte superior; p <0,05, n = 8 ratones por grupo), en cambio, en marcado contraste, la nifedipina mejoró los déficits sociales inducidos por PCP con una dependencia de dosis similar (**FIG. 4C**, parte inferior; p <0,05; n = 8 ratones por grupo). Por otra parte, nifedipina (15 mg / kg, no se muestra) también redujo la incidencia de conductas de tipo catatónico, p.ej., recorridos en círculo y rigidez, provocadas por PCP solamente (16). Estos datos se ajustan a la hipótesis indicada; nifedipina en solitario reducirá la activación del canal del  $\text{Ca}^{2+}$  a niveles que alteran la repolarización de potenciales de acción y potenciales de acción repetitivos (en virtud de lo cual se deterioran las conductas mediadas prefrontales), pero en combinación con PCP, las dosis adecuadas de nifedipina reducirán los niveles excesivos de activación del canal de calcio (evitando potenciales de acción prolongados y biestabilidad) restaurando así la respuesta prefrontal normal y rescatando conductas mediadas por la corteza prefrontal.

### **Explicación**

Se ha identificado y caracterizado en el presente documento una nueva despolarización dependiente de actividad mediada por la activación del receptor D2; este fenómeno está presente en un subconjunto definido de neuronas piramidales de la capa V en la PFC que, cuando se activan, generan un conducta de tipo psicotomimético en ratones. También se ha determinado que dicha despolarización dependiente de la actividad genera biestabilidad, potencial de acción aberrante y otros comportamientos celulares que interrumpen el flujo de información a través de dichas neuronas y, por lo tanto, retiene la validez aparente como un mecanismo que podría contribuir a la disfunción prefrontal en la esquizofrenia y formas relacionadas de enfermedad mental. Los autores de la invención han observado que, sorprendentemente, una clase fundamentalmente diferenciada de psicotomiméticos (fenciclidina) también provoca una despolarización dependiente de actividad similar que fue independiente de la activación del receptor D2. Por último, se determinó que dicha despolarización dependiente de actividad compartida depende de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L y que el bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L mejora los efectos psicotomiméticos de PCP en la conducta de los ratones.

Estas neuronas de la capa V están preparadas perfectamente para afectar a los dominios cognitivos alterados en la esquizofrenia. Tal como se muestra según los efectos de quinpirol, dichas neuronas expresan receptores D2, y los receptores D2 prefrontales están relacionados con la memoria activa y tareas de cambio de situación (9, 17); por otra parte, en la PFC, los receptores D2 están localizados principalmente en las neuronas piramidales de la capa V (4), que envían respuestas desde la PFC a otras regiones cerebrales. Por lo tanto, a través de los efectos presentados en la **FIG. 1A-D**, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del tipo L en estas neuronas de la capa V podrían alterar profundamente la información que fluye fuera de la PFC a regiones del cerebro como el cuerpo estriado (18). Se observa que este hipotético papel para los receptores D2 en la estimulación de la respuesta prefrontal podría complementar la estabilización de la actividad del período de retraso con los receptores D1 (19-23) y la estimulación del estímulo prefrontal (24) por liberación fásica de dopamina (25), que preferentemente activaría los receptores D1 (26). También cabría especular que el abanico de efectos mediados por la despolarización dependiente de actividad notificada en el presente documento pudiera ayudar a explicar observaciones clínicas aparentemente paradójicas. Los pacientes con esquizofrenia u otras formas de enfermedad mental que son agudamente psicóticos a menudo presentan un pensamiento y un discurso muy tangencial y cambian rápidamente de un tema a otro con escasa conexión, si es que la tienen. Sin embargo, estos mismos pacientes, casi al mismo tiempo, también pueden ser notablemente perseverantes y ser incapaces de apartar su pensamiento o discurso de una sola idea o palabra. La despolarización dependiente de actividad representa un fenómeno de una sola célula que podría dar cuenta de la conducta tanto perseverante como tangencial en redes prefrontales. Si la activación de D2 afecta a un subconjunto de neuronas prefrontales que median señales de respuesta que desencadenan respuestas motoras o descargas de corolarios (7, 9, 18, 27) a través de la despolarización dependiente de actividad que potencia el potencial de acción de estas neuronas, los potenciales de acción aberrantes o prolongados resultantes (**FIG. 2A,B; FIG. 3C,E**) pueden dar lugar a señales de respuesta promiscuas o inapropiadas que se corresponden con la conducta tangencial en procesos mediados por redes corticales. Los niveles extremadamente altos de activación de D2 pueden a su vez producir biestabilidad (**FIG. 3A**) o bloqueo de despolarización del potencial de acción (**FIG. 3A,E**), evitando la señalización de respuesta y correspondiéndose a la conducta de red perseverante o catatónica. Este fenotipo celular puede informar también sobre los efectos secundarios de la terapia, ya que el bloqueo del receptor D2 con dosis altas de antipsicóticos suprimirá la transmisión de información prefrontal en esta población clave de neuronas de respuesta (**FIG. 2C, D, F, FIG. 3A, C**), contribuyendo posiblemente al retraso psicomotor y al Parkinsonismo, tal como se observó clínicamente. El hecho de que la activación excesiva y el bloqueo de los receptores D2 puedan producir fenotipos similares (menor potencial de acción) recuerda a otros fenómenos psiquiátricos, p.ej., la curva en forma de U de los efectos de la activación del receptor D1 (19) y un deterioro neurológico similar causado por sobre-expresión y sub-expresión de MeCP2 (28).

Se ha asociado los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L con la esquizofrenia en estudios de asociación de todo el genoma (29), aunque hasta ahora no ha habido ninguna hipótesis en cuanto a su papel. De hecho, con escasas excepciones (30), ha sido muy difícil relacionar los canales iónicos en neuronas específicas con los síntomas de enfermedad psiquiátrica. Asimismo, según estudios genéticos, se han relacionado los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L con el trastorno bipolar (31), que incluye déficits cognitivos y de tangencialidad similares a los observados en la esquizofrenia (32), y recientemente los autores de la invención han descubierto que una línea de ratón diseñada para generar una alta actividad del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (33, 34) prolongando las corrientes de tipo L (35) provoca una disfunción celular similar en las neuronas de la capa V (**FIG. 4D**). Los autores de la invención observaron asimismo que el antagonismo del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L deterioró la conducta social, al tiempo que la misma dosis rescata los déficits inducidos por PCP en esta conducta (**FIG. 4C**). Ocasionalmente, se ha demostrado que dosis moderadas de nifedipina y otros antagonistas del canal de calcio de tipo L pueden ser prometedoras para el tratamiento de la esquizofrenia (36-38), pero no hay estudios concluyentes. Los hallazgos notificados en el presente documento pueden dar información sobre el diseño cuidadoso y la selección de dosis de dichos estudios proporcionando un endofenotipo celular pertinente que relaciona un fenómeno específico accionado por un canal de iones en una subpoblación específica de neuronas prefrontales con la sintomatología que corresponde a la esquizofrenia y otras enfermedades mentales.

Aunque la invención expuesta ha sido descrita con cierto detalle de un modo ilustrativo y con ejemplos para mayor claridad para su comprensión, no se deberá interpretar que dichas descripciones y ejemplos limitan el alcance de la invención.

REFERENCIAS

1. PS Goldman-Rakic, LD Selemon, *Schizophr Bull* 23, 437 (1997).  
 2. DM Barch et al. , *Arch Gen Psychiatry* 58, 280 (marzo de 2001).  
 5 3. MS Lidow, F. Wang, Y. Cao, PS Goldman-Rakic, *Synapse* 28, 10 (enero de 1998).  
 4. N. Santana, G. Mengod, F. Artigas, *Cereb Cortex* 19, 849 (abril de 2009).  
 5. A. Bonci, FW Hopf, *Neuron* 47, 335 (4 de agosto de 2005).  
 6. RM Kessler et al. , *Neuropsychopharmacology* 31, 1991 (Sep, 2006).  
 7. C. Frith, *Lancet* 346, 615 (2 de septiembre de 1995).  
 10 8. BR Arendt et al. , *Neuron* 54, 205 (19 de abril de 2007).  
 9. M. Wang, S. Vijayraghavan, PS Goldman-Rakic, *Science* 303, 853 (6 de febrero de 2004).  
 10. RY Peng, RS Mansbach, DL Braff, MA Geyer, *Neuropsychopharmacology* 3, 211 (junio de 1990).  
 11. AF Arnsten, JX Cai, JC Steere, PS Goldman-Rakic, *J Neurosci* 15, 3429 (Mayo de 1995).  
 12. Y. Wang et al. , *Nat Neurosci* 9, 534 (abril de 2006).  
 15 13. BP Bean, *Nat Rev Neurosci* 8, 451 (Jim, 2007).  
 14. DC Javitt, SR Zukin, *Am J Psychiatry* 148, 1301 (octubre de 1991).  
 15. RY Wang, X. Liang, *Neuropsychopharmacology* 19, 74 (Jul, 1998).  
 16. GT Bolger, MF Rafferty, JN Crawley, SM Paul, P. Skolnick, *Pharmacol Biochem Behav* 25, 45 (Jul, 1986).  
 17. SB Floresco, O. Magyar, S. Ghods-Sharifi, C. Vexelman, MT Tse, *Neuropsychopharmacology* 31, 297  
 20 (febrero de 2006).  
 18. TW Robbins, *Schizophr Bull* 16, 391 (1990).  
 19. GV Williams, PS Goldman-Rakic, *Nature* 376, 572 (17 de agosto de 1995).  
 20. D. Durstewitz, JK Seamans, TJ Sejnowski, *J. Neurophysiol* 83, 1733 (marzo de 2000).  
 21. KY Tseng, P. O'Donnell, *Cereb Cortex* 15, 49 (enero de 2005).  
 25 22. G. Winterer, DR Weinberger, *Trends Neurosci* 27, 683 (noviembre de 2004).  
 23. K. Sidiropoulou et al. *Nat Neurosci* 12, 190 (febrero de 2009).  
 24. TS Braver, DM Batch, JD Cohen, *Biol Psychiatry* 46, 312 (1 de agosto de 1999).  
 25. W. Schultz, *Annu Rev Neurosci* 30, 259 (2007).  
 26. Y. Goto, AA Grace, *Nat Neurosci* 8, 805 (Jim, 2005).  
 30 27. Y. Wang, PS Goldman-Rakic, *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 5093 (6 de abril de 2004).  
 28. M. Chahrour, HY Zoghbi, *Neuron* 56, 422 (8 de noviembre de 2007).  
 29. M. Nyegaard et al. , *Mol Psychiatry* 15, 119 (febrero de 2010).  
 30. V. Krishnan et al., *Cell* 131, 391 (19 de octubre de 2007).  
 31. P. Sklar et al., *Mol Psychiatry* 13, 558 (junio de 2008).  
 35 32. MF Green, *J Clin Psychiatry* 67, e 12 (octubre de 2006).  
 33. I. Splawski et al., *Cell* 119, 19 (1 de octubre de 2004).  
 34. SR Wersinger, Bett, GC, Hess, RA, Baizer, Rasmusson, RL, documento presentado en la Society for  
 Neuroscience, 2008, Washington, DC, 2008.  
 35. CF Barrett, RW Tsien, *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 2157 (12 de febrero de 2008).  
 40 36. K. Yamada et al., *Psychiatry Clin Neurosci* 49, 237 (agosto de 1995).  
 37. K. Yamada et al., *J Clin Psychopharmacol* 16, 437 (diciembre de 1996).  
 38. BL Schwartz, M. Fay-McCarthy, K. Kendrick, RB Rosse, SI Deutsch, *Clin Neuropharmacol* 20, 364 (agosto de  
 1997).

45 SECUENCIAS

**La secuencia de aminoácidos de Chr2**

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMLFYAYQT  
 WKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRR  
 TMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCGLGCLYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRQRVVTGMAWLFFVS  
 WGMFPILFILGPEGFGVLSVYGSTVGHGTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEV  
 ETLVEDEAEAGAVP (SEQ ID NO:1)

50 **La secuencia de aminoácidos de SFO:**

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMLFYAYQT  
 WKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRVYAEWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYSRR  
 TMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFLGLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPGKRCRQVVTGMAWLFFVS  
 WGMFPILFILGPEGFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEV  
 ETLVEDEAEAGAVP (SEQ ID NO:2)

**La secuencia de aminoácidos de SSFO:**

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMLFYAYQT  
 WKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRVYAEWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYSRR  
 TMGLLVSAIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFLGLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPGKRCRQVVTGMAWLFFVS  
 WGMFPILFILGPEGFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEV  
 5 ETLVEDEAEAGAVP (SEQ ID NO:3)

**La secuencia de aminoácidos de C1V1:**

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLENNGSVICIPNNGQC  
 FCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWSTCGWEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAV  
 IYSSNGNKTIVWLRVYAEWLLTSPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLI  
 SLSYGMITYFHAAKVYIEAFHTVPGKICRELVRVMAWTFVAVWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILD  
 10 LIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVE TLVAEEED (SEQ ID NO:4)

**La secuencia de aminoácidos de C1V1 (E122T):**

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLENNGSVICIPNNGQC  
 CLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWSTCGWETIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVIY  
 SSNGNKTIVWLRVYAEWLLTSPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLS  
 YGMITYFHAAKVYIEAFHTVPGKICRELVRVMAWTFVAVWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILD  
 15 LIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVE TLVAEEED (SEQ ID NO:5)

**La secuencia de aminoácidos de C1V1 (E162T):**

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLENNGSVICIPNNGQC  
 FCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWSTCGWEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAV  
 IYSSNGNKTIVWLRVYAEWLLTSPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLI  
 SLSYGMITYFHAAKVYIEAFHTVPGKICRELVRVMAWTFVAVWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILD  
 20 LIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVE TLVAEEED (SEQ ID NO:6)

**La secuencia de aminoácidos de C1V1 (E122T / E162T):**

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLENNGSVICIPNNGQC  
 FCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWSTCGWETIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAV  
 IYSSNGNKTIVWLRVYAEWLLTSPVILIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLI  
 SLSYGMITYFHAAKVYIEAFHTVPGKICRELVRVMAWTFVAVWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILD  
 25 LIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVE TLVAEEED (SEQ ID NO:7)

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de inducción de psicosis en un mamífero no humano, que comprende una opsina sensible a la luz expresada en la membrana celular de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal, en donde la opsina sensible a la luz es *Chlamydomonas reinhardtii* ChR2 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:1, comprendiendo dicho método la activación con luz de la opsina sensible a la luz, en el que la activación con luz de la opsina induce despolarización de la membrana celular, en virtud de lo cual se induce un estado psicótico en el mamífero.
2. Un método de cribado de un compuesto que puede ser útil para tratar psicosis, comprendiendo el método:  
 medir un estado psicótico de un mamífero no humano antes y después de administrar el compuesto en la corteza prefrontal del mamífero,  
 en el que el mamífero no humano comprende una opsina sensible a la luz expresada en la membrana celular de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal, en donde la opsina sensible a la luz es *Chlamydomonas reinhardtii* ChR2 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:1, y en el que el estado psicótico es inducido por activación con luz de la opsina sensible a la luz, en donde la activación con luz de la opsina induce despolarización de la membrana;  
 en el que una mejora de una o más de las mediciones de estado psicótico tras la administración del compuesto indica que el compuesto puede ser útil para tratar psicosis.
3. El método de la reivindicación 2, que comprende además una etapa de administración de un agonista de D2 al mamífero antes de administrar el compuesto.
4. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la opsina sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 95 % a la proteína de canal de cationes sensible a la luz de la SEQ ID NO: 1 derivada de *Chlamydomonas reinhardtii* (ChR2).
5. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la opsina sensible a la luz es *Chlamydomonas reinhardtii* ChR2.
6. El método de las reivindicaciones 4 o 5, en el que la expresión de la opsina sensible a la luz se controla mediante un promotor Thy1.
7. El método de la reivindicación 2, en el que la medición del estado psicótico es una medición de la conducta.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la medición de la conducta es exploración social.
9. El método de la reivindicación 2, en el que la medición del estado psicótico es una medición celular.
10. Un método de cribado de un compuesto que puede ser útil para tratar psicosis, que comprende: medir una respuesta celular en un corte de tejido de corteza prefrontal, obtenido de un mamífero no humano que comprende una opsina sensible a la luz en la membrana celular de un subconjunto de neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal antes y después de incubar el corte de tejido con el compuesto, en el que la opsina sensible a la luz es *Chlamydomonas reinhardtii* ChR2 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, en donde la respuesta celular es inducida por la despolarización de la membrana de las neuronas inducida por la activación de la opsina sensible a la luz; en donde una mejora en las lecturas de respuesta celular tras la incubación con el compuesto indica que el compuesto puede ser útil para tratar psicosis.
11. El método de la reivindicación 10, en el que la respuesta celular es despolarización dependiente de actividad.

Figura 1

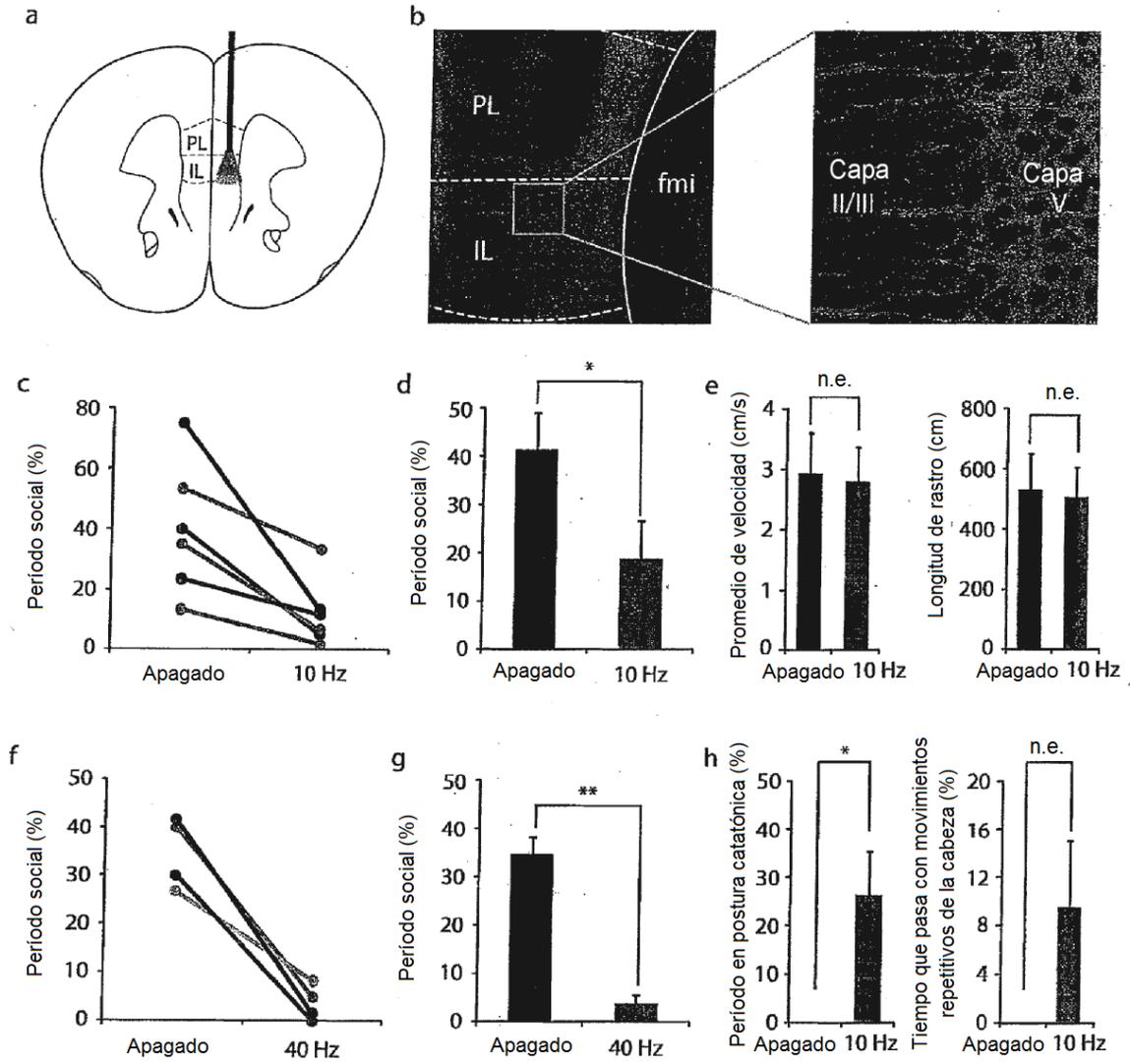


Figura 2

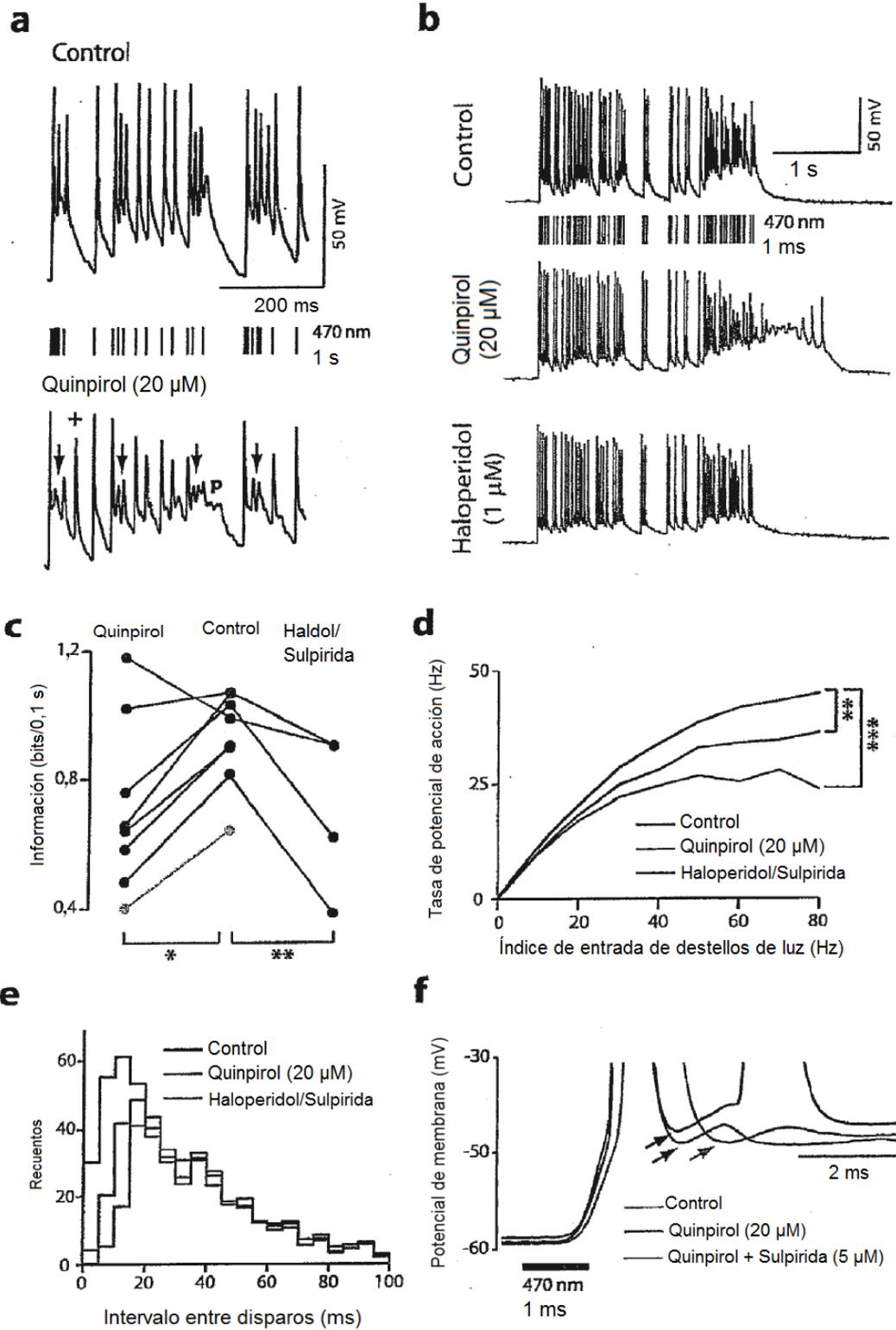


Figura 3

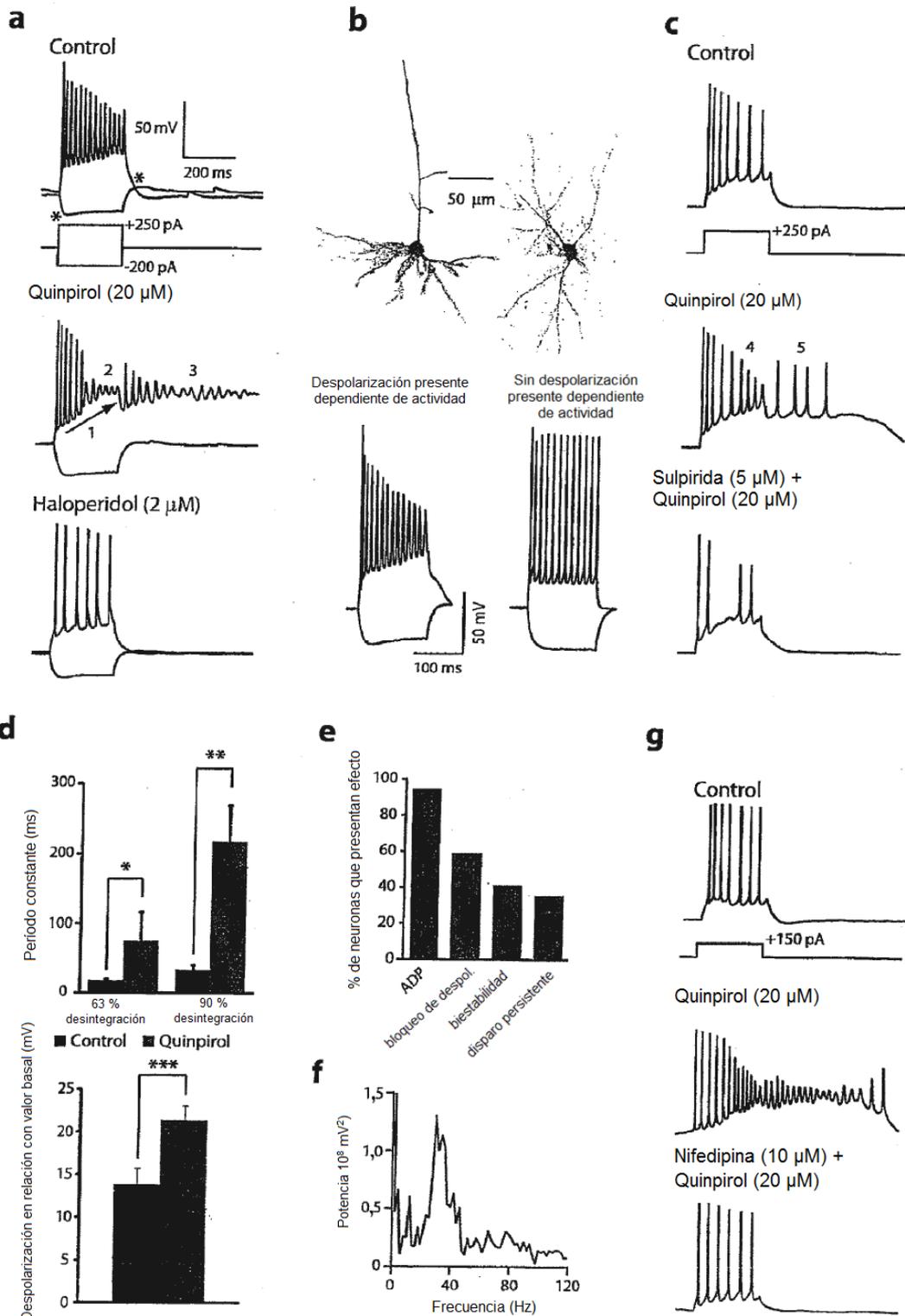


Figura 4

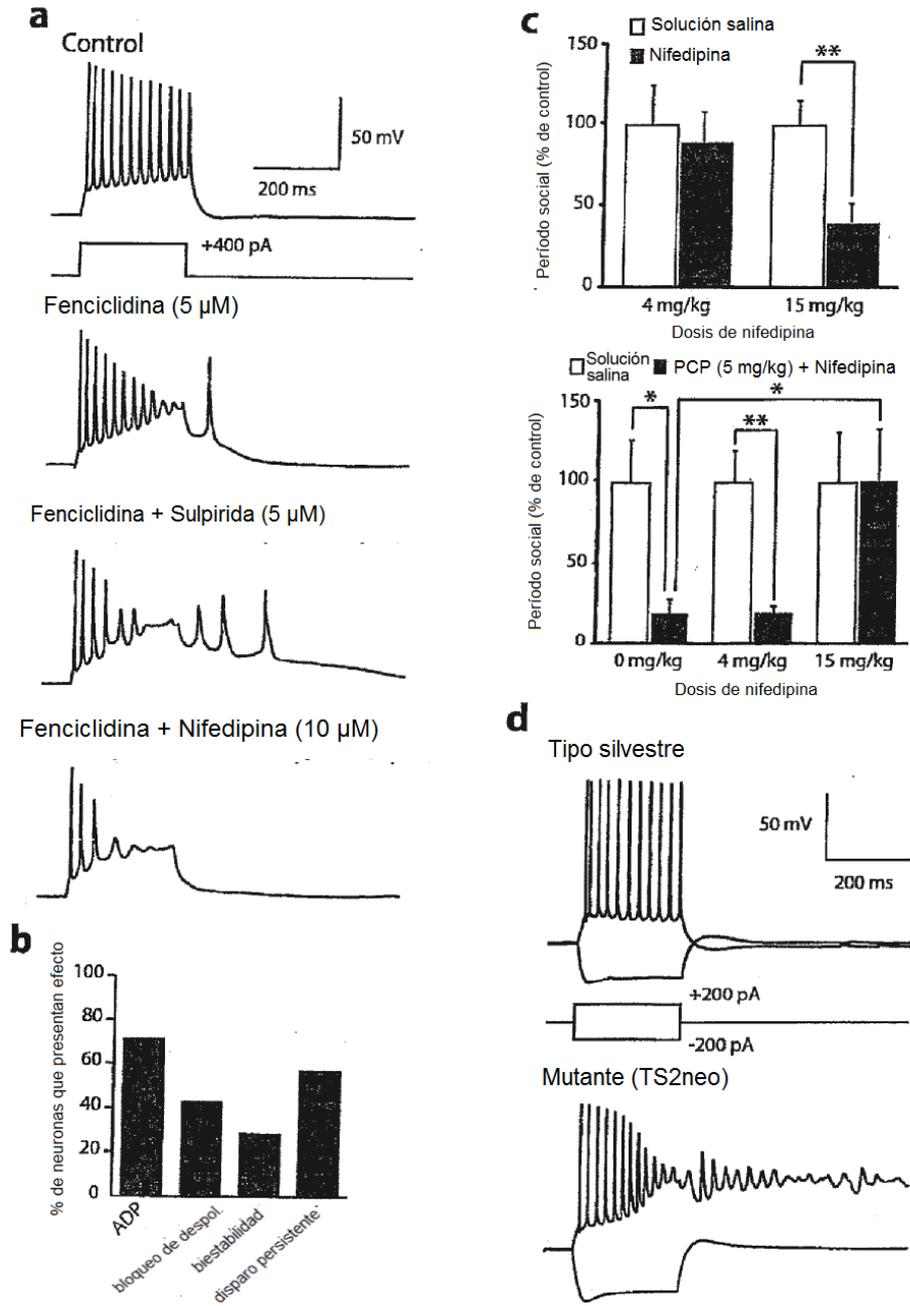


Figura 5

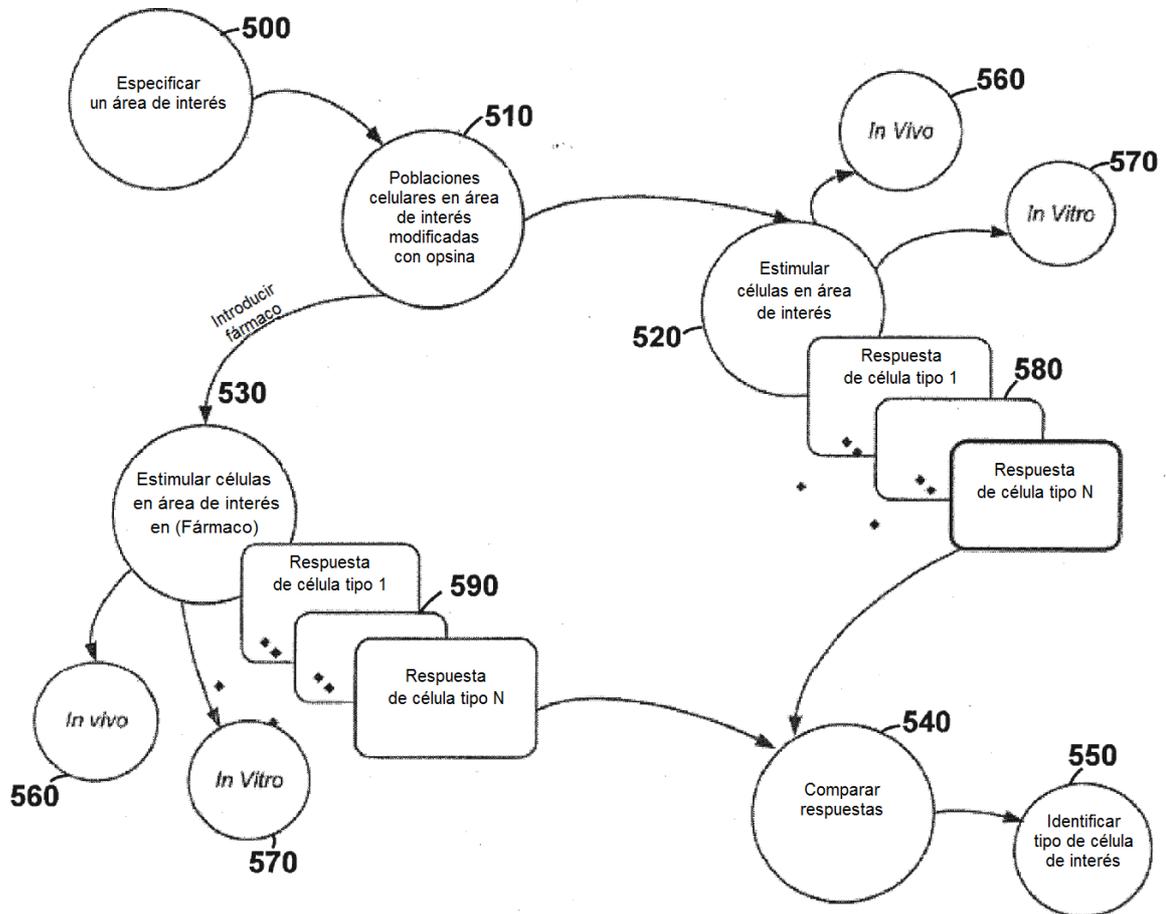


Figura 6

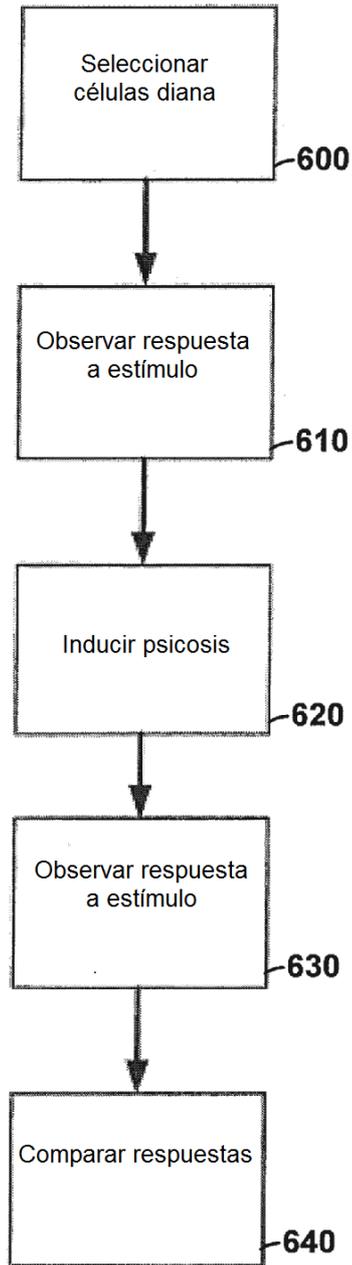


Figura 7

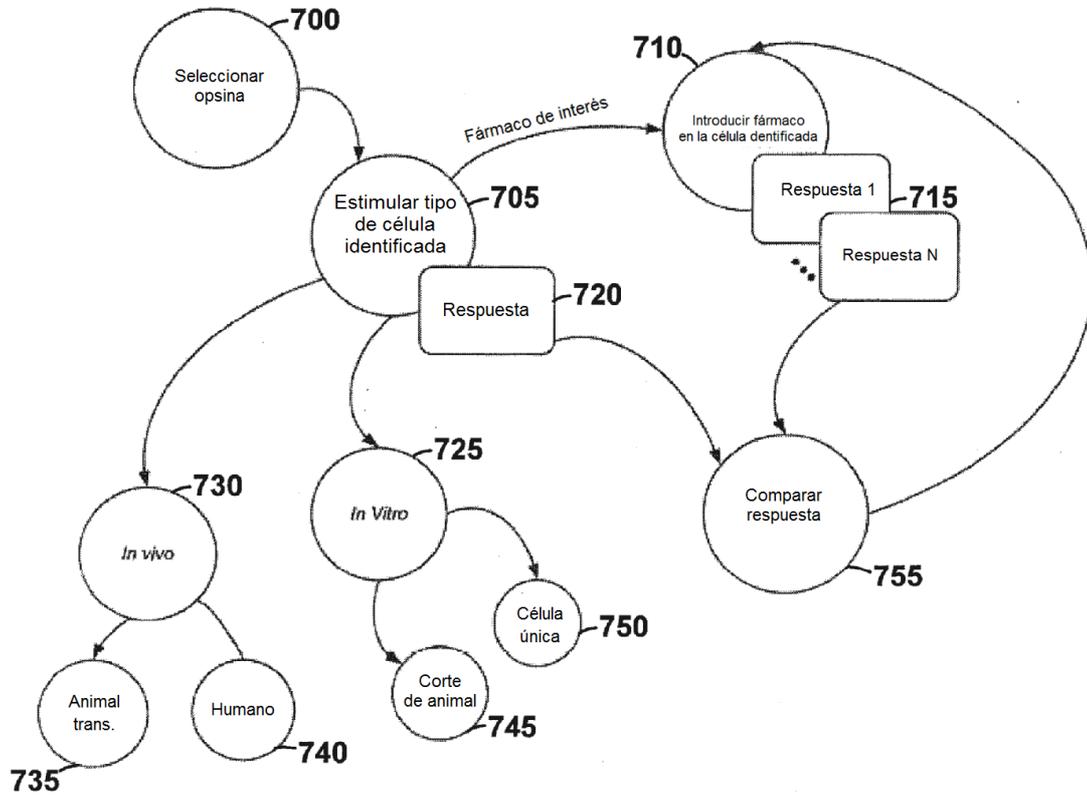


Figura 8

