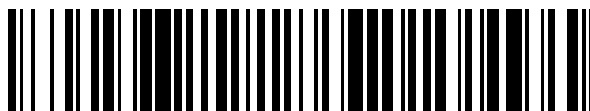


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 349**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009** E 16189132 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018** EP 3165534

54 Título: **Sistemas, métodos y composiciones para la estimulación óptica de células diana**

30 Prioridad:

23.04.2008 US 47219 P

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

21.02.2019

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:

**ZHANG, FENG;
DEISSEROTH, KARL y
GRADINARU, VIVIANA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 701 349 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

Sistemas, métodos y composiciones para la estimulación óptica de células diana

5 **Documentos relacionados**

El presente documento de patente reivindica el beneficio bajo el Título 35 del Código de los Estados Unidos (U.S.C.) § 119(e), de la Solicitud de patente Provisional de los Estados Unidos de N.º de serie 61/047.219 presentada el 23 de abril de 2008 y titulada "Systems, Methods and Compositions for Optical Stimulation of Target Cells."

10

Sinopsis

La estimulación de varias células del organismo se ha usado para producir una serie de efectos beneficiosos. Un método de estimulación implica el uso de electrodos para introducir una señal generada externamente en las células. Un problema que al que se enfrentan las técnicas de estimulación del cerebro basadas en electrodos es la naturaleza distribuida de las neuronas responsables de un determinado proceso mental. Por el contrario, diferentes tipos de neuronas residen cercanas entre sí de manera que solamente ciertas células de una región dada del cerebro se activan en el desempeño de una tarea específica. Dicho de forma alternativa, no solo los tractos nerviosos heterogéneos se mueven en paralelo a través de límites espaciales reducidos, sino que los propios cuerpos celulares pueden existir en configuraciones mixtas, escasamente embebidas. Esta forma distribuida de procesamiento parece desafiar los mejores intentos de comprender el orden canónico del interior del SNC, y hace de la neuromodulación un difícil esfuerzo terapéutico. Dicha arquitectura del cerebro plantea un problema para la estimulación basada en electrodos, porque los electrodos son relativamente indiscriminados con respecto a la fisiología subyacente de las neuronas que estimulan. En cambio, la proximidad física de los polos de los electrodos a la neurona suele ser el principal factor determinante en cuanto a qué neuronas serán estimuladas. Por consiguiente, en general, no es factible restringir absolutamente la estimulación a una sola clase de neuronas que usan electrodos.

25

Otro problema que surge con el uso de los electrodos para la estimulación es que, debido a que la colocación de los electrodos dicta qué neuronas se estimularán, con frecuencia, la estabilidad mecánica es insuficiente, y genera la migración del cable de los electrodos de la zona diana. Por otra parte, tras un período de tiempo dentro del organismo, los cables de los electrodos se suelen encapsular con las células gliales, aumentando la resistencia eléctrica eficaz de los electrodos y, por lo tanto, el suministro de energía eléctrica requerido para llegar a las células diana. Los aumentos compensatorios de tensión, frecuencia o ancho de pulso, sin embargo, pueden propagar la corriente eléctrica y aumentar la estimulación involuntaria de células adicionales.

35

Otro método de estímulo usa estructuras biomoleculares fotosensibles para estimular las células diana en respuesta a la luz. Por ejemplo, las proteínas o las moléculas activadas por la luz se pueden usar para controlar el flujo de iones a través de las membranas celulares. Al facilitar o inhibir el flujo de iones positivos o negativos a través de las membranas celulares, la célula puede despolarizarse brevemente, despolarizarse y mantenerse en ese estado, o hiperpolarizarse. Las neuronas son un ejemplo de un tipo de célula que usa las corrientes eléctricas creadas por la despolarización para generar señales de comunicación (es decir, impulsos nerviosos). Otras células eléctricamente excitables incluyen las células del músculo esquelético, las células del músculo cardíaco y las células endocrinas. Las neuronas usan la despolarización rápida para transmitir señales por todo el organismo y con diversos fines, tales como para el control motoro (por ejemplo, contracciones musculares), las respuestas sensoriales (por ejemplo, el tacto, el oído y otros sentidos) y las funciones de cálculo (por ejemplo, funciones cerebrales). Por lo tanto, el control de la despolarización de las células puede ser beneficioso para una serie de distintos fines, incluyendo (pero sin limitación) la terapia psicológica, el control muscular y las funciones sensoriales.

40

45

En el presente documento se describen estructuras biomoleculares fotosensibles y métodos relacionados. La presente invención se ejemplifica en una serie de implementaciones y solicitudes, algunas de las cuales se resumen a continuación.

50

En el presente documento, se describe una disposición implantable implementada que tiene un dispositivo de generación de luz para generar luz. La disposición también tiene una parte biológica que modifica las células diana para la estimulación en respuesta a la luz generada por el medio de generación de luz *in vivo*.

55

También se describen células diana que se estimulan usando una disposición implantable. La disposición incluye un medio de generación de luz eléctrica para generar luz y una parte biológica. La parte biológica tiene una disposición biomolecular fotosensible que responde a la luz generada por la estimulación de las células diana *in vivo*. La estimulación puede manifestarse bien como regulación positiva o como regulación negativa de la actividad en la diana.

60

También se describe un dispositivo implantable que suministra un vector de transferencia de genes, tal como un virus, que induce la expresión de proteínas de membrana biomoleculares fotosensibles. El dispositivo tiene un generador de luz, sensible a (por ejemplo, cargado por o accionado por) una señal externa, para generar luz y una disposición biológica que incluye la proteína biomolecular fotosensible que responde a la luz generada por la interacción con las células diana *in vivo*. De esta manera, las partes electrónicas del dispositivo se pueden usar para estimular

65

ópticamente células diana. La estimulación puede manifestarse bien como regulación positiva (por ejemplo, aumento de la actividad de disparo neuronal) o regulación negativa (por ejemplo, la hiperpolarización neuronal o, como alternativa, la despolarización crónica) de la actividad en la diana.

5 También se describe adicionalmente un método de estimulación de las células diana usando proteínas fotosensibles que se unen con las células diana. El método incluye una etapa de implantación de las proteínas fotosensibles y un dispositivo generador de luz cerca de las células diana. El dispositivo generador de luz se activa, y la proteína fotosensible estimula las células diana en respuesta a la luz generada.

10 Las aplicaciones incluyen aquellas asociadas con cualquier población de células eléctricamente excitables, incluyendo neuronas, células esqueléticas, células cardíacas, células musculares lisas y células beta-pancreáticas secretoras de insulina. Las enfermedades importantes con alteración del acoplamiento efector de la excitación incluyen insuficiencia cardíaca, distrofias musculares, diabetes, dolor, parálisis cerebral, parálisis, depresión y esquizofrenia. Por consiguiente, existe utilidad en el tratamiento de un amplio espectro de afecciones médicas, desde la enfermedad de Parkinson y las lesiones cerebrales a las arritmias cardíacas, la diabetes y el espasmo muscular.

15 De acuerdo con la descripción adicional hay métodos de generación de un flujo de corriente de neuronas de excitación, en una neurona, diseñando una proteína que responde a la luz mediante la producción de una corriente de excitación para estimular la despolarización de la neurona. En uno de tales métodos, la proteína se deriva de *Volvox carteri*.

20 La presente invención se refiere a un vector de expresión que codifica una proteína de VChR1 fotosensible de *Volvox carteri*, en donde dicha proteína tiene un máximo espectro de acción de aproximadamente 535 nm y en donde dicha proteína VChR1 comprende los restos de aminoácidos S181, S183 y A256, basándose en la numeración de la ChR2 (SEQ ID NO:2), para su uso en un método de tratamiento optogenético de un sujeto.

25 **Breve descripción de las figuras**

La invención puede entenderse de manera más completa en consideración a la descripción detallada de diversas realizaciones de la invención que figura a continuación en relación con las figuras adjuntas, en las que:

30 la FIG. 1A muestra un alga esferoidal *Volvox carteri*, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 La FIG. 1B muestra base de Schiff toda *trans* de la retina y secuencias de proteínas relacionadas, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 35 La FIG. 1C evoca fotocorrientes relativas a la intensidad de luz, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 la FIG. 1D muestra una relación de corriente-tensión de rectificación hacia el interior, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 la FIG. 1E muestra corrientes de membrana con respecto a iones específicos, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 40 la FIG. 1F muestra el porcentaje de activación con relación a la longitud de onda óptica, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 la FIG. 2A muestra las neuronas que expresan VChR1-EYFP y que presentan fluorescencia de EYFP localizada en la membrana, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 45 la FIG. 2B muestra fotocorrientes de neuronas que expresan VChR1-EYFP cuando se iluminan con luz a 531 nm y 589 nm, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 la FIG. 2C muestra corrientes hacia el interior de luz a 531 nm y 589 nm en células enteras, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 la FIG. 2D muestra veinte pulsos de luz de 5 ms suministrados a neuronas VChR1-EYFP en brida de corriente a varias frecuencias, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 50 la FIG. 2E muestra los porcentajes de impulsos satisfactorios a varias frecuencias, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 la FIG. 2F muestra que el aumento de las frecuencias de los pulsos de luz suministrados aumentó la despolarización en estado estacionario, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 55 la FIG. 2G muestra la resistencia de la membrana, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 la FIG. 2H muestra el potencial de membrana en reposo, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 la FIG. 3A muestra las respuestas de tensión a la estimulación óptica a diferentes longitudes de onda, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 60 la FIG. 3B muestra un porcentaje de impulsos satisfactorios para la estimulación óptica a diferentes longitudes de onda e intensidades, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 la FIG. 3C muestra un porcentaje de impulsos satisfactorios para la estimulación óptica a diferentes longitudes de onda e intensidades, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención;
 65 la FIG. 4A-D muestra la inhibición óptica directa de las neuronas del núcleo subtalámico (STN) locales;
 la FIG. 5 A-C muestra las astroglias de dirección dentro del STN;

la FIG. 6A-C muestra la despolarización óptica de las neuronas del STN a diferentes frecuencias;
 la FIG. 7A-C muestra la cuantificación del volumen de tejido reclutado por la intervención óptica;
 la FIG. 8A-C muestra el control óptico selectivo de las fibras aferentes en el STN;
 la FIG. 9A-D muestra la estimulación óptica selectiva de las neuronas de la capa V de la corteza motora primaria anterior;
 la FIG. 10A-C muestra la lesión de la sustancia negra y la vía cánula;
 la FIG. 11A-C muestra una caracterización histológica adicional;
 la FIG. 12A-D muestra resultados de comportamiento adicionales;
 la FIG. 13A-D muestra resultados electrofisiológicos adicionales;
 la FIG. 14A-D muestra trazas de alta resolución temporal de Optrode;
 la FIG. 15A-C muestra la latencia de la respuesta de M1 a la estimulación óptica del STN; y
 la FIG. 16A-F muestra los cambios en las características de frecuencia de la actividad neuronal producida por la estimulación óptica.

Si bien la invención es susceptible de diversas modificaciones y formas alternativas, sus especificaciones se han mostrado a modo de ejemplo en los dibujos y se describirán en detalle.

Descripción detallada

La presente invención se cree que es útil para facilitar las aplicaciones prácticas de varias estructuras biomoleculares fotosensibles, y se ha encontrado que la invención es particularmente adecuada para su uso en las disposiciones y los métodos que se ocupan del control y de la estimulación de la tensión de la membrana celular. Aunque la presente invención no se limita necesariamente a dichas aplicaciones, se pueden apreciar diversos aspectos de la invención a través de una descripción de varios ejemplos que usan dicho contexto.

De acuerdo con la presente invención, se diseña una proteína/molécula fotosensible en una célula. La proteína afecta a un flujo de iones a través de la membrana celular en respuesta a la luz. Este cambio en el flujo de iones crea un cambio correspondiente en las propiedades eléctricas de las células incluyendo, por ejemplo, la tensión y el flujo de corriente a través de la membrana celular. En un caso, la proteína funciona *in vivo* usando un cofactor endógeno para modificar el flujo de iones a través de la membrana celular. En otro caso, la proteína cambia la tensión a través de la membrana celular a fin de disuadir el disparo de los potenciales de acción en la célula. En otro caso más, la proteína es capaz de cambiar las propiedades eléctricas de la célula en el transcurso de varios milisegundos de la introducción de la luz.

De acuerdo con la presente invención, se usa una proteína, identificada en el presente documento como VChR1, de *Volvox carteri*, para el control óptico de exactitud temporal de la actividad neuronal. VChR1 permite la excitación selectiva de los potenciales de acción individuales, incluyendo la generación de trenes de impulsos rápidos y el bloqueo sostenido de los impulsos durante muchos minutos. El espectro de acción de VChR1 es potentemente desplazado al rojo en relación con ChR2, pero opera a una potencia de luz similar, y funciona en mamíferos sin cofactores exógenos. En un caso, VChR1 se puede expresar junto con NpHR y/o ChR2 en las células diana. Del mismo modo, VChR1, NpHR y ChR2 se pueden dirigir a músculo de *C. elegans* y las neuronas motoras colinérgicas para controlar la locomoción bidireccionalmente. En este sentido, VChR1, NpHR y ChR2 forman un sistema optogenético para la interrogación totalmente óptica, dirigida genéticamente, de alta velocidad, multimodal de los circuitos neuronales vivos.

Una lista no exclusiva de vectores de expresión incluyen plásmidos bacterianos, víricos y vegetales.

Hay aspectos de la presente invención que se dirigen a variaciones de la VChR1 específica desvelada en la FIG. 1B. Uno de dichos aspectos incluye mutaciones de la proteína. Estas mutaciones se pueden dirigir, por ejemplo, a partes de la proteína VChR1 que desplazar o cambiar de otro modo la longitud de onda de la luz que activa la proteína.

Las proteínas microbianas activadas por luz rápida adaptadas para la neurociencia, incluyendo la canalrodopsina ChR2 y la halorhodopsina NpHR, permiten el control óptico con una precisión de milisegundos de tipos de células genéticamente definidas del tejido neuronal intacto. Dado que ChR2 es un canal catiónico activado por luz azul que puede activar las neuronas, y que NpHR es una bomba de cloruro activada por la luz amarilla que puede inhibir las neuronas, la combinación de estas dos proteínas permite la excitación neuronal y la inhibición independientes de la misma preparación. Una tercera herramienta optogenética importante, en concreto, un segundo canal catiónico con espectro de acción significativamente desplazado en relación con ChR2, permitiría el ensayo experimental de la contribución diferencial o la interacción de dos tipos distintos de células en la computación o el comportamiento del circuito.

Se ha descrito una secuencia relacionada con ChR2 del alga esferoide *Volvox carteri* (FIG. 1A), pero el espectro de absorción de la proteína y la dinámica del fotociclo son prácticamente idénticos a los de ChR2. Se ha descubierto una segunda ChR *Volvox*, más relacionada con ChR1 de *Chlamydomonas reinhardtii* (FIG. 1B). Esta nueva proteína y las variantes de la misma se denominan en el presente documento VChR1.

5 En un ensayo experimental, se expresó VChR1 en oocitos de *Xenopus* y células HEK293, y se encontró que provoca fotocorrientes similares a las de ChR1 de *Chlamydomonas*. Se graduaron las fotocorrientes con la intensidad de la luz, y mostraron inactivación desde un pico rápido hacia una meseta estacionaria ligeramente reducida (FIG. 1C). El pico apareció preferentemente en luz de intensidad relativamente alta, probablemente atribuible al aumento de la acumulación de un producto intermedio del fotociclo no conductor tardío esperado (FIG. 1C), y dado que la intensidad de la luz se aproximó a la saturación, la corriente evocada presentó un mínimo característico antes de alcanzar el estado estacionario. VChR1 presentó una relación de corriente-tensión de rectificación hacia el interior (FIG. 1D) y, en condiciones fisiológicas neuronales, condujo principalmente Na^+ , pero también H^+ , K^+ y Ca^{2+} (FIG. 1E).

15 Se identificaron diferencias estructurales primarias entre VChR1 y las ChR de *Chlamydomonas* para permitir la predicción de las propiedades de absorción modificadas (FIG. 1B, que representa las SEC. ID. NO: 001 (ChR2), 002 (ChR1) y 003 (VChR1), con las diferencias estructurales primarias resaltadas). En primer lugar, basándose en los cálculos anteriores del potencial electrostático de la bacteriorrodopsina (BR, máximo de absorción a 570 nm) y la rodopsina sensorial II (SRII, máximo de absorción a 500 nm), y en cálculos adicionales de mecánica cuántica-mecánica molecular (QM/MM), el complejo de contraíón del cofactor de base de Schiff retinal todo-*trans* (RSB; FIG. 1B) probablemente será más crítico para el ajuste del color, la fotoisomerización y la dinámica del fotociclo. Basándose en la homología con otros genes de opsina microbianos de los que se conoce la estructura 3D, el complejo de contraíón en ChR2 debería estar definido por R120, E123 y D253. Sin embargo, estos restos están completamente conservados tanto en ChR1 como en VChR1 (Fig. 1B, columnas destacadas 104). En segundo lugar, los cálculos teóricos de acuerdo con los experimentos de mutaciones anteriores predicen que tres restos del bolsillo de unión a RSB podrían contribuir significativamente a las diferencias en la absorción entre las proteínas rodopsinas microbianas. Estos aminoácidos son G181, L182 y S256 en ChR2 (secuencia de la FIG. 1B, columnas destacadas 106); se espera que los dos primeros se encuentren cerca del anillo de β -ionona de la RSB (estructura de la Fig. 1B, 108) y pueden, junto con C183, determinar el espectro de absorción, mientras que S256 es, en cambio, probablemente adyacente al nitrógeno protonado de la RSB (estructura de la FIG. 1G, 110). En VChR1, se espera que el extremo del anillo de β -ionona de la RSB sea más polar que en ChR1 y ChR2, ya que las dos posiciones 181 y 183 se han sustituido con una Ser polar, mientras que, por el contrario, el ambiente de nitrógeno de RSB es, en realidad, menos polar con una Ala en la posición 256. La combinación de estos tres intercambios en las posiciones 181, 183 y 256 generan la expectativa de una redistribución de la carga positiva a lo largo del sistema de polieno de RSB y un desplazamiento sustancial hacia el rojo, probablemente en más de 40 nm, en VChR1 en comparación con ChR2.

Se espera que otros tres aminoácidos H114, E235 y E245 (Fig. 1B, columnas destacadas 102) modulen la distribución de las cargas de RSB mediante el acoplamiento de largo alcance, y en este caso, se prevé además que el intercambio de H114N tanto en VChR1 como en ChR1 aumente el potencial de RSB en el extremo de β -ionona. El máximo de absorbancia a 495 nm de ChR1 (que no se expresa bien en las neuronas), de hecho, se desplaza ligeramente al rojo con respecto al de ChR2, pero la combinación de muchos cambios significativos en VChR1 predijo un potente desplazamiento de la longitud de onda en una escala útil para definir una nueva clase de herramientas para la neurociencia.

45 Para sondear inicialmente la dependencia de la longitud de onda, se excitaron oocitos con expresión de VChR1 usando pulsos láser de 10 ns a lo largo de un intervalo de longitudes de onda, para permitir la delimitación de un espectro de acción marcadamente desplazado al rojo que revelara un máximo a ~535 nm y un pequeño hombro a longitudes de onda inferiores coincidentes con una segunda isoforma que alcanza el máximo a 505 nm (FIG. 1F). Se construyó un lentivirus portador del promotor de CaMKII α para dirigir la potente expresión proteica con el fin de ensayar la función de VChR1 en las neuronas. Para visualizar la expresión de VChR1, los siete dominios transmembrana de VChR1 (restos 1-300, basados en la homología con los primeros 315 restos de ChR2) estaban en marco fusionados al extremo amino de la proteína fluorescente amarilla (VChR1-EYFP). Las neuronas que expresan VChR1-EYFP mostraron claramente fluorescencia de EYFP localizada en la membrana, similar a la que se había publicado anteriormente para ChR2-EYFP (FIG. 2A), con el nivel de expresión ligeramente más débil en comparación con ChR2-EYFP usando el mismo vector de expresión de CaMKII α lentiviral. Sin embargo, las neuronas VChR1-EYFP presentaron potentes fotocorrientes cuando se iluminaron con luz a 531 nm e incluso a 589 nm (FIG. 2B). Las corrientes medias hacia el interior de las células enteras resultaron ser de $2080,8 \pm 22,3$ pA (se presenta la media \pm ETM a menos que se indique lo contrario, $n = 20$) y $177,6 \pm 24,7$ pA ($n = 10$) cuando se iluminaron con 15 mW/mm^2 de luz a 531 nm y $13,8 \text{ mW/mm}^2$ de luz a 589 nm en la muestra, respectivamente (FIG. 2C). Las constantes de tiempo aparentes para el aumento de la fotocorriente resultaron ser más rápidas más cerca de la longitud de onda de activación máxima, debido al cambio en el coeficiente de absorción, con valores correspondientes de $\tau_{531_activación} = 2,8 \pm 0,3$ ms y $\tau_{589_activación} = 8,0 \pm 0,7$ ms ($n = 11$ para 531 nm y $n = 10$ para 589 nm). Las constantes de tiempo de desintegración correspondientes fueron $\tau_{531_desactivación} = 133,4 \pm 11,7$ ms ($n = 11$) y $\tau_{589_desactivación} = 135,7 \pm 9,8$ ms ($n = 10$).

65 Se exploró la dependencia de la frecuencia de VChR1 en impulsos provocados usando trenes de veinte pulsos de luz de 5 ms a 531 nm o 589 nm suministrados a neuronas VChR1-EYFP en la brida de corriente (trazos ilustrativos de

589 nm de excitación en la FIG. 2D). Hasta los 10 Hz, más del 90 % de las células ensayadas dispararon el 100 % de los potenciales de acción del tren a cualquier longitud de onda, y a 20 Hz, por lo general, las células se dispararon en respuesta al ~65 % de los pulsos de luz (FIG. 2E). En estas células de alto nivel de expresión, se podrían activar impulsos fiables hasta 30 Hz (FIG. 2D; las neuronas piramidales en cultivo normalmente no pueden seguir 50 Hz o más allá en respuesta a bien una inyección de corriente o fotoestimulación con ChR2), y a 531 nm, se generaron ocasionalmente dobletes de impulsos por cada pulso de luz, muy probablemente debido a la constante de desintegración τ desactivación más lenta de 133 ms en comparación con los 12 ms para ChR210. Al igual que con ChR2, VChR1 también podría desencadenar despolarizaciones por debajo del umbral de tipo EPSP con intensidades de luz de estimulación inferior. El suministro de barreras de pulsos de luz provocó la típica suma de los cambios en la tensión de la membrana por debajo del umbral, suministrando las frecuencias crecientes de los pulsos de luz una mayor despolarización en estado estacionario (FIG. 2F).

Para ensayar los posibles efectos sobre la integridad de la membrana, se compararon la resistencia de la membrana y el potencial de membrana en reposo (FIG. 2G y 2H) mediante una pinza de parche de células enteras, entre 1) neuronas con expresión de VChR1-EYFP; 2) neuronas no transducidas; y 3) neuronas con expresión de VChR1-EYFP, con la primera pinza de parche 24 horas después de la exposición a un protocolo de pulsos de luz típico (1 s de 20 Hz, pulsos de luz de 5 ms, una vez por minuto, durante 10 minutos). Todas las células registradas presentaron valores comparables, lo que sugiere que la expresión de VChR1-EYFP no alteró significativamente las propiedades eléctricas de la membrana. La distribución subcelular pareció similar a la de ChR2, con una fuerte localización en la membrana, y VChR1 fue bien tolerada por estas neuronas. Por otra parte, al igual que con ChR2 y NpHR, no fue necesaria la suplementación retinal todo-*trans* tras la transducción de VChR1 en las neuronas; todos estos genes codifican opsinas microbianas, que requieren la incorporación de todo-*trans* retinal para formar la RSB y convertirse en rodopsinas funcionales, pero se ha encontrado que las neuronas de los vertebrados convierten de manera constante las opsinas expresadas en proteínas funcionales sin la suplementación de cofactores químicos.

Se realizó un ensayo para determinar si la separación espectral pronunciada entre la activación de ChR2 y VChR1 sería suficiente para permitir la activación separable usando dos longitudes de onda de luz diferentes. Basándose en los espectros de acción (FIG. 1F), se seleccionaron 406 nm y 589 nm como las longitudes de onda de excitación óptima probables para investigar la activación separables de ChR2 y VChR1. Para las neuronas que expresan bien ChR2 o VChR1, se realizó un ensayo para determinar los potenciales de acción evocados en respuesta a trenes de veinte pulsos de luz de 5 ms (406 nm y 589 nm) suministrados a 5 Hz. Cada longitud de onda se ensayó a varias intensidades de luz diferentes para determinar los parámetros que maximizan la activación de ChR2 la vez que minimizan la activación de VChR1 a 406 nm, y viceversa. Se descubrió que las neuronas ChR2 y VChR1 se pueden activar por separado mediante luz a 406 nm y 589 nm, respectivamente (FIG. 3A). De hecho, ninguna neurona ChR2 disparó potenciales de acción cuando se iluminó con pulsos de luz a 589 nm, ya que la absorción es prácticamente cero a esta longitud de onda, mientras que las neuronas VChR1 se dispararon de forma fiable a esta longitud de onda. Por el contrario todas las neuronas ChR2 dispararon 20 potenciales de acción cuando se iluminaron con la luz a 406 nm, a las tres intensidades de luz ($n = 10$, FIG. 3B). Mientras que las células VChR1 fueron capaces de disparar potenciales de acción ocasionales en respuesta a pulsos a 406 nm (en general, todas las rodopsinas presentan cierta absorción a esta longitud de onda debido a la transición al segundo estado electrónico, transición $S_0 \rightarrow S_2$), el porcentaje de impulsos se pudo reducir hasta $13 \pm 9\%$ cuando se redujo la intensidad de la luz a 406 nm a $1,2 \text{ mW/mm}^2$ ($n = 10$, FIG. 3C), una intensidad que continuó generando impulsos fiables y potentes en las neuronas ChR2.

Como se ha implementado actualmente, se podría usar la aplicación simultánea de VChR1 y ChR2 para ensayar el reclutamiento progresivo de diferentes poblaciones de células en el control del comportamiento de los circuitos. Por ejemplo, se podrían reclutar dos poblaciones diferentes de interneuronas o neuromoduladores por etapas: en primer lugar mediante el aislamiento de la población A con luz amarilla, seguido de la activación de la combinación de las poblaciones A y B con la adición de luz azul. Este tipo de experimento ha sido la principal fuerza impulsora subyacente al desarrollo de canalrodopsinas con desplazamiento de la longitud de onda, pues la complejidad del procesamiento de la información neuronal y las interacciones de los diferentes sistemas neuromoduladores requerirá una excitación óptica rápida en más de una longitud de onda para probar la importancia de los cálculos combinatorios y la estimulación moduladora en la dinámica y el comportamiento de los circuitos neuronales.

Aunque se puede ensayar el papel de cada tipo de célula en experimentos separados, por conveniencia, en algunos experimentos podría ser útil activar dos poblaciones aisladas en diferentes momentos. Para este tipo de experimento, una estrategia óptima implicaría el uso de las intensidades de luz mínimas a 406 nm y 589 nm suficientes para desencadenar por separado impulsos fiables de ChR2 y VChR1 respectivamente, lo que simplemente requiere la calibración independiente en cada preparación experimental (como en las Fig. 3A-C). También se puede emplear una reducción progresiva transversal de los colores de la luz usando un monocromador o varios filtros; a longitudes de onda del color amarillo, exclusivamente se controlará la población marcada con VChR1, y a medida que la longitud de onda de excitación se vuelve progresivamente más azul más allá de 535 nm, la contribución de la población marcada con ChR2 se convertirá de manera constante más dominante (FIG. 1F). Se pueden implantar perfeccionamientos moleculares (por ejemplo, ChR2 de desplazamiento al azul y reduciendo el espectro de VChR1) para proporcionar una separación adicional en el extremo azul del espectro.

La identificación y caracterización de VChR1 para la excitación neuronal con luz amarilla, en el presente documento,

define la tercera categoría importante funcionalmente distinta de herramientas optogenéticas rápidas disponibles para interrogar a la organización y al funcionamiento de los circuitos neuronales, tras la introducción de ChR2 para la excitación neuronal con luz azul y NpHR para la inhibición neuronal con luz amarilla. Además de su espectro de acción desplazado al rojo funcionalmente significativo, VChR1 muestra propiedades adicionales que son de interés, incluyendo la proporción reducida de la corriente máxima con respecto a la corriente en estado estacionario (FIG. 1C, 2B) en comparación con ChR2; mientras que la magnitud de corriente máxima, por lo general, en las canalrodopsinas depende de la intensidad de la luz, del pH externo y de la tensión de la membrana, la proporción del estado estacionario con respecto al máximo es mayor para VChR1 que para ChR2 en todas las condiciones que se han explorado.

- 5
- 10 La existencia de dos proteínas de excitación independientemente controlables abre la puerta a varias aplicaciones, incluyendo, pero sin limitación, aplicaciones para el tratamiento de varios trastornos y el uso de una pluralidad de proteínas fotosensibles que se pueden seleccionar con el fin de responder a una pluralidad de respectivas longitudes de onda e intensidades de luz. Hay aspectos de la invención que permiten mutaciones adicionales y/o búsquedas de secuencias que permiten longitudes de onda ópticas adicionales y/o canales de proteínas controlables individualmente. También se pueden usar las variaciones en el estímulo óptico (por ejemplo, una longitud de onda, intensidad o perfil de duración). Por ejemplo, los perfiles de estimulación pueden aprovechar los solapamientos en las longitudes de onda de excitación de dos proteínas de canales iónicos diferentes para permitir la excitación de ambas proteínas al mismo tiempo. En uno de dichos casos, las proteínas pueden tener diferentes niveles de responsabilidad. Por lo tanto, en una aplicación neuronal, un conjunto de canales iónicos puede producir impulsos a un porcentaje de éxito diferente con respecto a un segundo conjunto de canales iónicos.

Muchas aplicaciones en seres humanos de la presente invención requieren la aprobación gubernamental antes de su uso. Por ejemplo, el uso en seres humano de la terapia génica puede requerir dicha aprobación. Sin embargo, las terapias génicas similares en las neuronas (células no proliferativas que no son susceptibles a los tumores) están avanzando rápidamente, y hay ensayos clínicos activos, aprobados por la FDA, que ya están en marcha de suministro de genes virales en los cerebros humanos. Esto puede facilitar el uso de diversas realizaciones de la presente invención para una gran variedad de aplicaciones. A continuación, se presenta una lista no exhaustiva de algunos ejemplos de dichas aplicaciones y realizaciones.

30 La adicción se asocia con varias funciones del cerebro, incluyendo la recompensa y las expectativas. Además, la causa que conduce a la adicción puede variar entre individuos. De acuerdo con una realización, la adicción, por ejemplo, la adicción a la nicotina, se puede tratar con la estabilización optogenética de pequeñas zonas en la ínsula. Opcionalmente, se puede usar la formación de imágenes funcionales del cerebro, por ejemplo, mediante PET en estado de espera o fMRI, para localizar un foco hipermetabólico con el fin de determinar un punto diana exacto para la intervención sobre la superficie de la ínsula.

40 La excitación optogenética del núcleo accumbens y del septo puede proporcionar recompensa y placer a un paciente sin necesidad de recurrir al uso de sustancias, y por lo tanto, puede ser la clave para el tratamiento de la adicción. Por el contrario, se puede usar la estabilización optogenética del núcleo accumbens y del septo para reducir el deseo hacia un fármaco en el contexto de la adicción. En una realización alternativa, la estabilización optogenética de la actividad hipermetabólica observada en el genu de la corteza cingulada anterior (BA32) se puede usar para reducir el deseo de drogas. La estabilización optogenética de células dentro del núcleo arqueado del hipotálamo medial que contienen productos peptídicos de proopiomelanocortina (POMC) y la transcripción de regulación de la cocaína y la anfetamina (CART) también se puede usar para reducir el comportamiento adictivo hacia las drogas. Para más información a este respecto, se puede hacer referencia a: Naqvi N. H., Rudrauf D., Damasio H., Bechara A. "Damage to the insula disrupts addiction to cigarette smoking", *Science*. 26 de enero de 2007; 315(5811):531-534.

50 Se puede usar la estimulación optogenética de las neuronas neuroendocrinas del núcleo periventricular del hipotálamo que secretan somatostatina para inhibir la secreción de hormona del crecimiento de la hipófisis anterior, por ejemplo, en acromegalia. La estabilización optogenética de las neuronas neuroendocrinas que secretan somatostatina o la hormona de crecimiento se puede usar para aumentar el crecimiento y el desarrollo físico. Entre los cambios que acompañan al envejecimiento "normal", hay una fuerte reducción de los niveles de la hormona del crecimiento en suero tras la cuarta o quinta década. Por consiguiente, es posible reducir el deterioro físico asociado con el envejecimiento a través de la estabilización optogenética del núcleo periventricular.

60 La estabilización optogenética del núcleo ventromedial del hipotálamo, en particular, la proopiomelanocortina (POMC) y la transcripción de la regulación de la cocaína y la anfetamina (CART) del núcleo arqueado, se puede usar para aumentar el apetito, y por lo tanto, para el tratamiento de la anorexia nerviosa. Como alternativa, la estimulación optogenética de los núcleos laterales del hipotálamo se puede usar para aumentar el apetito y para los comportamientos de la alimentación.

65 La excitación optogenética en las células colinérgicas de las zonas afectadas, incluyendo el lóbulo temporal, el NBM (núcleo basal de Meynert) y la circunvolución del cíngulo posterior (BA 31) proporciona la estimulación, y por lo tanto, la transmisión neurotrófica a las zonas deterioradas. Debido a que las zonas afectadas se han extendido por el cerebro, un tratamiento análogo con electrodos implantados puede ser menos factible que un enfoque optogenético.

Los trastornos de ansiedad normalmente se asocian con una mayor actividad en la corteza temporal izquierda y frontal y la amígdala, que vuelve a la normalidad cuando se resuelve la ansiedad. Por consiguiente, las regiones temporal izquierda y frontal afectadas, y la amígdala se pueden tratar con la estabilización optogenética, a fin de amortiguar la actividad en estas regiones.

En la fisiología normal, las células neuronales fotosensibles de la retina, que se despolarizan en respuesta a la luz que reciben, crean un mapa visual del patrón de luz recibido. Se pueden usar canales iónicos optogenéticos para imitar este proceso en muchas partes del organismo, y los ojos no son una excepción. En el caso de la deficiencia visual o la ceguera debido a un daño en la retina, se puede desarrollar una retina funcionalmente nueva, que use la luz ambiental natural en lugar de patrones de luz intermitente de un dispositivo implantado. La retina artificial desarrollada se puede colocar en la ubicación de la retina original (donde puede aprovechar el nervio óptico que sirve como un conducto de vuelta a la corteza visual). Como alternativa, la retina artificial se puede colocar en otra ubicación, tal como la frente, a condición de que se proporcione un conducto para que se transmitan las señales de despolarización al tejido cortical capaz de descifrar la información codificada de la matriz del sensor optogenético. La ceguera cortical también se podría tratar mediante la simulación de las vías visuales aguas abajo de la corteza visual. La estimulación se basaría en los datos visuales producidos aguas arriba de la corteza visual o mediante un sensor de luz artificial.

El tratamiento de la taquicardia puede realizarse con la estimulación optogenética de las fibras del sistema nervioso parasimpático incluyendo CN X o nervio vago. Esto provoca una reducción de la frecuencia del nódulo SA, reduciendo así la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción. Del mismo modo, la estabilización optogenética de las fibras del sistema nervioso simpático de los nervios de la médula T1 a T4, sirve para reducir el ritmo cardíaco. Para el tratamiento de la bradicardia patológica, la estabilización optogenética del nervio vago o la estimulación optogenética de las fibras simpáticas en T1 a T4 servirán para aumentar la frecuencia cardíaca. Las disritmias cardíacas resultantes de focos eléctricos aberrantes que superan el nódulo sinusal se pueden suprimir mediante el tratamiento de los focos eléctricos aberrantes con la estabilización optogenética moderada. Esto disminuye la tasa intrínseca de disparo dentro del tejido tratado, y permite que el nódulo sinoatrial recupere su papel en la estimulación del sistema eléctrico del corazón. De manera similar, se podría tratar cualquier tipo de arritmia cardíaca. La degeneración de tejido cardíaco que se produce en la cardiomiopatía o insuficiencia cardíaca congestiva también se podría tratar usando la presente invención; y el tejido restante se podría excitar usando diversas realizaciones de la invención.

La estimulación de excitación optogenética de las regiones del cerebro, incluyendo el lóbulo frontal, los lóbulos parietales y los hipocampos, puede aumentar la velocidad de procesamiento, mejorar la memoria, y estimular el crecimiento y la interconexión de las neuronas, incluyendo el impulso del desarrollo de las células progenitoras neuronales. Como ejemplo, una de dichas aplicaciones de la presente invención se refiere a la estimulación de excitación optogenética de neuronas diana del tálamo con el fin de sacar a un paciente de un estado casi vegetativo (apenas-consciente). Se efectúa el crecimiento de los canales iónicos abiertos por luz o bombas en la membrana de las neuronas del tálamo diana. Estas neuronas modificadas se estimulan luego (por ejemplo, a través de la óptica que también puede tener acceso por la misma vía de paso) dirigiendo un pulso de luz de inmediato con el fin de modular la función de las neuronas diana y/o las células circundantes. Para más información con respecto a las técnicas de modulación adecuadas (a través de un tratamiento a base de electrodos) o más información con respecto a las regiones del cerebro asociadas para dichos pacientes, se puede hacer referencia a: Schiff N. D., Giacino J. T., Kalmar K., Victor J. D., Baker K., Gerber M., Fritz B., Eisenberg B., O'Connor J. O., Kobylarz E. J., Farris S., Machado A., McCagg C., Plum F., Fins J. J., Rezai A. R. "Behavioral improvements with thalamic stimulation after severe traumatic brain injury", *Nature*, Vol. 448, 2 de agosto de 2007, pág. 600-604.

En una realización alternativa, la excitación optogenética se puede usar para tratar el músculo cardíaco debilitado en afecciones tales como la insuficiencia cardíaca congestiva. En general, la asistencia eléctrica al músculo cardíaco afectado de CHF no es práctica, debido al estado de estiramiento fino, frágil, de la pared cardíaca, y a la dificultad de proporcionar un acoplamiento eléctrico uniformemente distribuido entre los electrodos y el músculo. Por esta razón, los métodos preferidos hasta la fecha para aumentar la contractilidad cardíaca han incluido bien métodos farmacológicos, tales como los agonistas beta, o enfoques mecánicos, tales como dispositivos de asistencia ventricular. En esta realización de la presente invención, la excitación optogenética se suministra en el músculo del corazón debilitado a través de elementos emisores de luz en la superficie interior de un revestimiento que rodea el corazón o de otra manera contra la pared del corazón afectada. La luz se puede difundir por medios bien conocidos en la técnica, para cubrir uniformemente grandes superficies de músculo, provocando la contracción con cada pulso de luz.

En la estabilización optogenética de la parte subgenual de la circunvolución del cíngulo (Cg25), se puede aplicar luz amarilla con un dispositivo implantado. El objetivo sería tratar la depresión mediante la supresión de la actividad diana de manera análoga a las enseñanzas de Mayberg H. S. *et al.*, "Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression," *Neuron*, Vol. 45, 651-660, 3 de marzo de 2005, pág. 651-660. En un caso alternativo, un método de estimulación de excitación optogenética consiste en aumentar la actividad en esa región de una manera análoga a las enseñanzas de Schlaepfer *et al.*, "Deep Brain stimulation to Reward Circuitry Alleviates Anhedonia in Refractory Major Depression", *Neuropsychopharmacology* 2007, pág. 1-10.

En otra realización más, la corteza prefrontal dorsolateral izquierda (LDPFC) es sometida a un método de estimulación

de excitación optogenética. La estimulación de la LDLPFC a 5-20 Hz sirve para aumentar el nivel metabólico basal de esta estructura que, a través de circuitos de conexión, sirve para reducir la actividad en Cg 25, mejorando la depresión en el proceso. La supresión de la corteza prefrontal dorsolateral derecha (RDLPFC) también es una estrategia eficaz para el tratamiento de la depresión. Esto se puede lograr por la estabilización optogenética en la RDLPFC, o la supresión también puede realizarse mediante el uso de estimulación de excitación optogenética, y con pulsos a una velocidad lenta (por ejemplo, a 1 Hz o inferior), mejorando la depresión en el proceso. La estimulación del nervio vago (VNS) se puede mejorar usando un enfoque optogenético. El uso de excitación optogenética se puede emplear con el fin de estimular solo los aferentes vagos del cerebro, tales como el ganglio nodoso y el ganglio yugular. Los eferentes del cerebro no recibirían la estimulación mediante este enfoque, eliminando así algunos de los efectos secundarios en el VNS, incluyendo las molestias en la garganta, tos, dificultad para tragar y voz ronca. En una realización alternativa, el hipocampo se puede excitar optogenéticamente, lo que conduce al aumento de los brotes dendríticos y axonales, y al crecimiento global del hipocampo. Otras regiones del cerebro implicadas en la depresión que se podrían tratar usando la presente invención incluyen la amígdala, el núcleo accumbens, la corteza orbitofrontal y orbitomedial, el hipocampo, la corteza olfativa, y las proyecciones dopaminérgicas, serotoninérgicas y noradrenérgicas. Los enfoques optogenéticos se podrían usar para controlar la propagación de la actividad a través de estructuras tales como el hipocampo para controlar los síntomas depresivos.

Siempre y cuando haya poblaciones de células alfa y beta viables en los islotes de Langerhans del páncreas, los islotes pueden ser la diana en el tratamiento de la diabetes. Por ejemplo, cuando la glucosa en suero es alta (determinada manualmente o mediante el sistema de detección de glucosa de bucle cerrado), se puede usar la excitación optogenética para provocar la liberación de insulina desde las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, mientras que la estabilización optogenética se usa para prevenir la liberación de glucagón de las células alfa de los islotes de Langerhans del páncreas. Por el contrario, cuando los niveles de azúcar son demasiado bajos (determinados manualmente o mediante el sistema de detección de glucosa de bucle cerrado), la estabilización optogenética se puede usar para detener la secreción de células beta de la insulina, y la excitación optogenética se puede usar para aumentar la secreción de células alfa de glucagón.

Para el tratamiento de la epilepsia, la inactivación o el bloqueo de la actividad epileptogénica es susceptible a los enfoques optogenéticos. La mayoría de los pacientes con epilepsia tienen un patrón estereotipado de difusión de la actividad procedente de un foco epiléptico. La estabilización optogenética se podría usar para suprimir la actividad anómala antes de que se extendiera o truncarla prematuramente en su curso. Como alternativa, se podría proporcionar la activación del tejido excitador a través de la estimulación de excitación optogenética en una serie de patrones deliberadamente asíncronos para interrumpir la actividad convulsiva emergente. Otra alternativa implica la activación de la estimulación de excitación optogenética en las neuronas GABAérgicas para proporcionar un resultado similar. Las transmisiones talámicas pueden recibir la estabilización optogenética desencadenada cuando se detecta un patrón de EEG anormal.

Otra realización implica el tratamiento de los trastornos gastrointestinales. El sistema digestivo tiene su propio sistema nervioso semiautónomo, que contiene neuronas sensoriales, neuronas motoras e interneuronas. Estas neuronas controlan el movimiento del tracto GI, además de hacer que determinadas células del intestino liberen ácido, enzimas digestivas y hormonas entre las que se incluyen la gastrina, la colecistoquinina y la secretina. Los síndromes que incluyen una secreción insuficiente de cualquiera de estos productos celulares se pueden tratar con estimulación optogenética de los tipos de células productoras o neuronas que solicitan su actividad. Por el contrario, la estabilización optogenética se puede usar para tratar síndromes en los que se están creando excesivos productos endocrinos y exocrinos. Los trastornos de reducción de la motilidad intestinal, que van desde el estreñimiento (especialmente en pacientes con lesión de la médula espinal) al megacolon, se pueden tratar con la excitación optogenética de las neuronas motoras en los intestinos. Los trastornos de la hipermotilidad intestinal, incluyendo algunas formas del síndrome del intestino irritable, se pueden tratar con la estabilización optogenética de las neuronas que controlan la motilidad. La obstrucción de la salida gástrica neurogénica se puede tratar con la estabilización optogenética de las neuronas y la musculatura del píloro. Un enfoque alternativo para los síndromes de hipomotilidad sería proporcionar excitación optogenética a las neuronas sensibles al estiramiento de las paredes del intestino, aumentando la señal de que el intestino está lleno y que necesita ser vaciado.

En este mismo paradigma, un acercamiento a los síndromes de hiperactividad del intestino sería proporcionar estabilización optogenética para estirar las neuronas receptoras del GI inferior, proporcionando así una "falsa señal" de que el intestino estaba vacío, y no era necesario vaciarlo. En el caso de la incontinencia fecal manifiesta, la obtención de un mayor control de los esfínteres interno y externo puede ser preferible para reducir la motilidad de todo el tracto. Durante los períodos de tiempo en los que un paciente necesita contener las heces, la excitación optogenética del esfínter anal interno proporcionará la retención. La estimulación optogenética del esfínter externo se puede usar para proporcionar continencia adicional. Cuando el paciente necesita defecar, el esfínter anal interno, y luego el esfínter anal externo se deben relajar, ya sea haciendo una pausa en la estimulación optogenética o mediante la adición de estabilización optogenética.

La pérdida de audición conductiva se puede tratar mediante el uso de implantes cocleares ópticos. Una vez que la cóclea se ha preparado para la estimulación optogenética, se puede usar un implante coclear que emita luz. La pérdida auditiva neurosensorial se puede tratar a través de la estimulación óptica de dianas de aguas abajo de la vía auditiva.

Otra realización de la presente invención se dirige hacia tratamiento de los trastornos de la presión sanguínea tales como la hipertensión. Los barorreceptores y quimiorreceptores de regiones tales como la aorta (cuerpos aórticos y cuerpos paraaórticos) y las arterias carótidas ("cuerpos carótidos") participan en la regulación de la presión arterial y la respiración mediante el envío de aferentes a través del nervio vago (NC X), y otras vías a la médula y la protuberancia, particularmente al tracto solitario y al núcleo. La excitación optogenética de los cuerpos carotídeos, cuerpos aórticos, cuerpos paraaórticos, se puede usar para enviar un mensaje falso de "hipertensión" al núcleo solitario y al tracto, enviando la información de que es necesario reducir la presión arterial. La excitación o estabilización optogenética directamente a partes apropiadas del tallo cerebral también se pueden usar para reducir la presión arterial. La modalidad opuesta hace que el enfoque optogenético sirva como un compresor, elevando la presión arterial. También se puede conseguir un efecto similar a través de la excitación optogenética del nervio vago o mediante la estabilización optogenética de las fibras simpáticas de los nervios espinales T1-T4. En una realización alternativa, la hipertensión se puede tratar con la estabilización optogenética del corazón, dando lugar a la reducción del gasto cardíaco y a la disminución de presión arterial. De acuerdo con otra realización, se puede usar la estabilización optogenética de las células productoras de aldosterona dentro de la corteza suprarrenal para reducir la presión arterial. En otra realización alternativa más, la hipertensión se puede tratar mediante la estabilización optogenética del músculo liso vascular. La luz de activación se puede pasar por vía transcutánea al lecho vascular periférico.

Otra realización del ejemplo se dirige hacia el tratamiento de los trastornos del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. En el tratamiento del hipotiroidismo, se puede usar la excitación optogenética de las neuronas neuroendocrinas parvocelulares de los núcleos paraventricular e hipotalámico anterior para aumentar la secreción de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). La TRH, a su vez, estimula la hipófisis anterior para secretar TSH. Por el contrario, el hipertiroidismo se puede tratar con la estabilización optogenética de las neuronas neuroendocrinas parvocelulares. Para el tratamiento de la insuficiencia suprarrenal o de la enfermedad de Addison, se puede usar la excitación optogenética de las neuronas neuroendocrinas parvocelulares del núcleo supraóptico y los núcleos paraventriculares para aumentar la secreción de vasopresina, que, con la ayuda de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), estimula la hipófisis anterior para que secrete ACTH. El síndrome de Cushing, frecuentemente causado por la secreción de ACTH excesiva, se puede tratar con la estabilización optogenética de las neuronas neuroendocrinas parvocelulares del núcleo supraóptico a través de la misma cadena fisiológica de los efectos descritos anteriormente. Las neuronas neuroendocrinas del núcleo arqueado producen dopamina, que inhibe la secreción de prolactina de la hipófisis anterior. Por lo tanto, la hiperprolactinemia se puede tratar a través de la excitación optogenética, mientras que la hipoprolactinemia se puede tratar con la estabilización optogenética de las células neuroendocrinas del núcleo arqueado.

En el tratamiento de los estados hiperautónomos, por ejemplo, los trastornos de ansiedad, se puede usar la estabilización optogenética de la médula suprarrenal para reducir la producción de norepinefrina. Del mismo modo, la estimulación optogenética de la médula suprarrenal se puede usar en las personas que necesitan subidas de adrenalina, por ejemplo, aquellas que padecen asma grave o trastornos que se manifiestan como somnolencia crónica.

La estimulación optogenética de la corteza suprarrenal causará la liberación de productos químicos como el cortisol, la testosterona y la aldosterona. A diferencia de la médula suprarrenal, la corteza suprarrenal recibe sus instrucciones de hormonas neuroendocrinas secretadas de la hipófisis y el hipotálamo, los pulmones y los riñones. Independientemente, la corteza suprarrenal es susceptible a la estimulación optogenética. La estimulación optogenética de las células productoras de cortisol de la corteza suprarrenal se puede usar para tratar la enfermedad de Addison. La estabilización optogenética de las células productoras de cortisol de la corteza suprarrenal se puede usar para tratar la enfermedad de Cushing. La estimulación optogenética de las células productoras de testosterona se puede usar para tratar los trastornos de interés sexual en las mujeres: la estabilización optogenética de esas mismas células se puede usar para reducir el vello facial en las mujeres. La estabilización optogenética de las células productoras de aldosterona dentro de la corteza suprarrenal se puede usar para reducir la presión arterial. La excitación optogenética de las células productoras de aldosterona dentro de la corteza suprarrenal se puede usar para aumentar la presión arterial.

La estimulación de excitación optogenética de determinadas regiones del cerebro afectadas se puede usar para aumentar la velocidad de procesamiento, y estimular el crecimiento y la interconexión de las neuronas, incluyendo la estimulación de la maduración de células progenitoras neuronales. Dichos usos pueden ser particularmente útiles para el tratamiento del retardo mental.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se pueden tratar diversas enfermedades y lesiones musculares. Las parálisis relacionadas con el daño muscular, daño nervioso periférico y las enfermedades distróficas se pueden tratar con la excitación optogenética para causar la contracción, y con la estabilización optogenética para producir la relajación. Este último enfoque de relajación a través de la estabilización optogenética también se puede usar para prevenir la pérdida de masa muscular, mantener el tono y permitir el movimiento coordinado cuando se contraen grupos de músculos opuestos. Del mismo modo, la espasticidad manifiesta se puede tratar a través de la estabilización optogenética.

- En campos tan diversos como el truncamiento de los nervios periféricos, la apoplejía, la lesión cerebral traumática y la lesión de la médula espinal, existe la necesidad de fomentar el crecimiento de nuevas neuronas, y facilitar su integración en una red funcional con otras neuronas y con su tejido diana. El recrecimiento de nuevas vías neuronales puede fomentarse a través de la excitación optogenética, que sirve para señalar a las células madre a que broten axones y dendritas, e integrarse con la red. El uso de una técnica optogenética (a diferencia de los electrodos) impide la recepción de señales por el tejido intacto, y sirve para garantizar que el nuevo tejido diana crezca en virtud de una comunicación establecida con las neuronas en desarrollo, y no con una señal artificial como la corriente que emana de un electrodo.
- 5
- 10 La obesidad se puede tratar con la excitación optogenética en el núcleo ventromedial del hipotálamo, en particular, la proopiomelanocortina (POMC) y la transcripción de la regulación de la cocaína y la anfetamina (CART) del núcleo arqueado. En una realización alternativa, la obesidad se puede tratar a través de la estabilización optogenética de los núcleos laterales del hipotálamo. En otra realización, la estimulación optogenética a las células productoras de leptina o a las células con receptores de leptina del hipotálamo se puede usar para reducir el apetito y, por lo tanto, para el
- 15 tratamiento de la obesidad.
- Las lesiones destructivas de la cápsula anterior y la DBS análoga en esa región son medios establecidos para tratar el trastorno obsesivo-compulsivo 48 (OCD48) grave e intratable. Dichos enfoques pueden ser emulados usando la estabilización optogenética en la extremidad anterior de la cápsula interna o en regiones tales como BA32 y Cg24 que muestran la reducción metabólica cuando remite el TOC.
- 20
- El dolor crónico se puede tratar usando otra realización de la presente invención. Los métodos de estimulación eléctrica incluyen la estimulación local de los nervios periféricos, la estimulación local del nervio craneal y la estimulación de la corteza motora "subumbral". Los enfoques autogénicos razonables incluyen la estabilización optogenética en los sitios dolorosos locales. La atención a la selección del promotor garantizaría que otras fibras sensitivas y motoras no se vieran afectadas. La excitación optogenética selectiva de las interneuronas de la corteza motora primaria también puede proporcionar un alivio eficaz del dolor. Además, la estabilización optogenética en el tálamo sensorial, (en particular, los núcleos talámicos mediales), la materia gris periventricular y los núcleos del rafe ventral, se puede usar para producir alivio del dolor. En una realización alternativa, la estabilización optogenética de la dirección de las células que expresan parvalbúmina como estrategia de dirección, se puede usar para tratar el dolor mediante la reducción de la producción de la sustancia P. La liberación de opiáceos endógenos se puede lograr mediante el uso de la excitación optogenética para aumentar la actividad en el núcleo accumbens. En una realización alternativa, cuando las neuronas POMC del núcleo arqueado del hipotálamo medial se excitan optogenéticamente, se aumenta la endorfina beta, proporcionando enfoques de tratamiento viables para la depresión y el dolor crónico.
- 25
- 30
- 35
- Ciertos trastornos de la personalidad, incluyendo los tipos límite y antisocial, demuestran déficit focales en los trastornos cerebrales que incluyen "hipofrontalidad". Se prevé que la excitación optogenética directa o indirecta de estas regiones producirá una mejora de los síntomas. También se sabe que los estallidos anormales de actividad en la amígdala desatan disparados de rabia repentinos imprevistos: un síntoma del trastorno límite de la personalidad, así como de otras afecciones, que pueden beneficiarse de la estabilización optogenética de la amígdala. Los enfoques optogenéticos podrían mejorar la comunicación y la sincronización entre las diferentes partes del cerebro, incluyendo la amígdala, el cuerpo estriado y la corteza frontal, que podrían ayudar en la reducción de la impulsividad y la mejora de la comprensión.
- 40
- 45 El modelo amigdalocéntrico del trastorno de estrés postraumático (TEPT) propone que se asocia con la hiperactivación de la amígdala y el control insuficiente de arriba a abajo por la corteza prefrontal medial y el hipocampo. Por consiguiente, el trastorno de estrés postraumático se puede tratar con la estabilización optogenética de la amígdala o del hipocampo.
- 50
- 55 La esquizofrenia se caracteriza por anomalías entre las que se incluyen las alucinaciones auditivas. Estas se pueden tratar mediante la supresión de la corteza auditiva usando la estabilización optogenética. La hipofrontalidad asociada con la esquizofrenia se podría tratar con la excitación optogenética en las regiones frontales afectadas. Los enfoques optogenéticos podrían mejorar la comunicación y la sincronización entre las diferentes partes del cerebro, lo que podría ayudar en la reducción de la atribución errónea de estímulos autogenerados como foráneos.
- 60
- 65 La estabilización optogenética de las células dentro del núcleo arqueado del hipotálamo medial, que contienen productos peptídicos de proopiomelanocortina (POMC) y la transcripción de la regulación de la cocaína y la anfetamina (CART), se puede usar para reducir el comportamiento sexual compulsivo. La excitación optogenética de las células dentro del núcleo arqueado del hipotálamo medial que contienen productos peptídicos de proopiomelanocortina (POMC) y la transcripción de la regulación de la cocaína y la anfetamina (CART) se puede usar para aumentar el interés sexual en el tratamiento de los casos de trastornos del deseo sexual. En el tratamiento de los trastornos del deseo sexual hipoactivo, la producción de testosterona por parte de los testículos y las glándulas suprarrenales puede aumentarse por medio de la excitación optogenética de la hipófisis. La excitación optogenética del núcleo accumbens se puede usar para el tratamiento de la anorgasmia.
- El núcleo supraquiasmático segrega melatonina, que sirve para regular los ciclos de sueño/vigilia. La excitación optogenética del núcleo supraquiasmático se puede usar para aumentar la producción de melatonina, inducir el sueño,

tratando de este modo el insomnio. Las neuronas orexinas (hipocretinas) excitan fuertemente numerosos núcleos del cerebro con el fin de promover la vigilia. La excitación optogenética de poblaciones de células productoras de orexina se puede usar para tratar la narcolepsia y la somnolencia diurna crónica.

- 5 La estimulación optogenética del núcleo supraóptico se puede usar para inducir la secreción de oxitocina, se puede usar para estimular el parto y se puede usar para tratar los trastornos de unión social.

Al igual que las parálisis musculares, las funciones motoras que han sido desaferentadas por una lesión de la médula espinal se pueden tratar con la excitación optogenética para causar la contracción, y la estabilización optogenética para producir la relajación. Este último enfoque de relajación a través de la estabilización optogenética también se puede usar para prevenir la atrofia muscular, mantener el tono y permitir el movimiento coordinado cuando se contraen grupos opuestos de músculos. Del mismo modo, la espasticidad manifiesta se puede tratar a través de la estabilización optogenética. El recrecimiento de nuevas vías neuronales de la médula espinal puede fomentarse a través de la excitación optogenética, que sirve para señalar a las células madre al brote de axones y dendritas, e integrarse con la red.

Los déficits de apoplejía incluyen cambios en la personalidad, déficits motores, déficits sensoriales, pérdida cognitiva e inestabilidad emocional. Una de las estrategias para el tratamiento de los déficits de apoplejía es proporcionar estimulación optogenética a las estructuras del cerebro y del organismo que han sido desaferentadas de las conexiones excitadoras. Del mismo modo, se pueden conferir capacidades de estabilización optogenética a las estructuras del cerebro y del organismo que han sido desaferentadas de las conexiones inhibitorias.

Las investigaciones indican que la biopatología subyacente al síndrome de Tourette es una disfunción fásica de la transmisión de dopamina en las regiones corticales y subcorticales, el tálamo, los ganglios basales y la corteza frontal. Para proporcionar una terapia, las zonas afectadas se identifican preferentemente primero usando técnicas que incluyen la obtención de imágenes y la magnetoencefalografía (MEG) del cerebro funcional. Ya esté identificada específicamente o no, la estabilización optogenética de los tractos candidatos se puede usar para suprimir los tics motores. Las pruebas empíricas de los parámetros del dispositivo realizadas tras la implantación revelan qué sitios de estabilización optogenética es necesario que continúen y qué sitios no son necesarios que continúen.

Para tratar los trastornos de incontinencia urinaria o fecal, se puede usar la estabilización optogenética en los esfínteres, por ejemplo, a través de la estabilización optogenética del músculo liso detrusor de la vejiga o de las inervaciones de ese músculo. Cuando se necesita la micción, estos procesos optogenéticos se apagan o, como alternativa, se pueden invertir, con la estabilización optogenética en el esfínter urinario (externo), y la excitación optogenética del músculo detrusor de la vejiga o sus inervaciones. Cuando la vejiga ha sido desaferentada, por ejemplo, cuando las raíces dorsales sacras se cortan o destruyen por enfermedades de las raíces dorsales tales como tabes dorsal en los seres humanos, todas las contracciones reflejas de la vejiga se suprimen, y la vejiga se distiende. La excitación optogenética del músculo se puede usar directamente para restablecer el tono del detrusor, prevenir el daño renal y para ayudar en el proceso de la micción. A medida que la vejiga se "descentraliza" y se vuelve hipersensible al movimiento, y por lo tanto, propensa a la incontinencia, la estabilización optogenética al músculo de la vejiga se puede usar para minimizar esta reactividad del órgano.

Con el fin de excitar/inhibir selectivamente una determinada población de neuronas, por ejemplo, aquellas implicadas en el estado patológico de una enfermedad, se pueden usar varias estrategias para dirigir las proteínas/moléculas optogenéticas a poblaciones específicas.

Para diversas realizaciones de la presente invención, la dirección genética se puede usar para expresar diversas proteínas o moléculas optogenéticas. Dicha dirección implica la expresión específica de las proteínas/moléculas optogenéticas a través de elementos de control genético, tales como promotores (por ejemplo, parvalbúmina, somatostatina, colecistoquinina, GFAP), potenciadores/silenciadores (por ejemplo, potenciador temprano inmediato del citomegalovirus), y otros elementos reguladores de la transcripción o traducción (por ejemplo, elemento regulador posterior a la transcripción del virus de la hepatitis de la marmota). Las permutaciones de la combinación de elementos promotores + potenciadores + reguladores se pueden usar para restringir la expresión de sondas optogenéticas a poblaciones definidas genéticamente.

Con el uso de la dirección espacial/anatómica se pueden implantar diversas realizaciones de la presente invención. Dicha dirección se aprovecha del hecho de que los patrones de proyección de las neuronas, los virus u otros reactivos portadores de información genética (plásmidos de ADN, fragmentos, etc.), se pueden suministrar focalmente a una zona en la que se proyecta una determinada población de neuronas. A continuación, se transportará de nuevo el material genético a los cuerpos de las neuronas para mediar en la expresión de las sondas optogenéticas. Como alternativa, si se desea marcar células en una región focal, se puede suministrar focalmente virus o material genético a la región de interés para mediar en la expresión localizada.

Hay varios sistemas de administración de genes que son útiles en la aplicación de una o más realizaciones de la presente invención. Uno de dichos sistemas de administración es el virus adeno-asociado (AAV). El AAV se puede usar para administrar un casete de promotor + sonda optogenética a una región específica de interés. La elección del promotor dirigirá la expresión en una población específica de neuronas. Por ejemplo, usando el promotor de

CaMKII α , se dirigirá la expresión específica de neuronas excitadoras de las sondas optogenéticas. El AAV mediará en la expresión a largo plazo de la sonda optogenética durante al menos un año o más. Para lograr una mayor especificidad, el AAV se puede pseudotipificar con serotipos específicos 1 a 8, teniendo cada uno un tropismo diferente para los diferentes tipos de células. Por ejemplo, se sabe que el serotipo 2 y 5 tienen un buen tropismo específico neuronal.

Otro mecanismo de administración de genes es el uso de un retrovirus. El VIH u otros vectores retrovirales basados en lentivirus se pueden usar para suministrar un casete de promotor + sonda optogenética a una región específica de interés. Los retrovirus también se pueden pseudotipificar con la glicoproteína de la envoltura del virus de la rabia para lograr el transporte retrógrado de células de marcaje basándose en sus patrones de proyección axonal. Los retrovirus se integran en el genoma de la célula hospedadora, por lo tanto, son capaces de mediar en la expresión permanente de las sondas optogenéticas. Los vectores retrovirales no basados en lentivirus se pueden usar para marcar selectivamente las células en división.

El adenovirus de Gutless y el virus del herpes simple (HSV) son dos virus basados en ADN que se pueden usar para administrar un casete de promotor + sonda optogenética también a regiones específicas del cerebro. El HSV y el adenovirus tienen capacidades de empaquetamiento mucho mayores y, por lo tanto, pueden alojar elementos promotores de tamaño mucho mayor y también se pueden usar para suministrar múltiples sondas optogenéticas u otros genes terapéuticos junto con sondas optogenéticas.

La electroporación focal también se puede usar para transfectar neuronas de forma transitoria. Se pueden suministrar plásmidos o fragmentos de ADN focalmente a una región específica del cerebro. Mediante la aplicación de corriente eléctrica suave, las células locales circundantes recibirán el material de ADN y la expresión de las sondas optogenéticas.

En otro caso, se puede usar la lipofección mediante la mezcla de material genético con reactivos de lípidos y luego la posterior inyección en el cerebro para mediar la transfección de las células locales.

Diversas realizaciones incluyen el uso de diferentes elementos de control. Además de los elementos de control genético, se pueden usar otros elementos de control (en particular, promotores y potenciadores cuyas actividades son sensibles a la química, la estimulación magnética o la radiación infrarroja) para mediar en la expresión controlada temporalmente de las sondas optogenéticas. Por ejemplo, un promotor cuya actividad transcripcional se somete a la radiación infrarroja permite usar radiación enfocada para ajustar la expresión de sondas optogenéticas en una región focal en solo el tiempo deseado.

La enfermedad de Parkinson se puede tratar mediante la expresión de la estabilización optogenética en las neuronas glutamatérgicas, ya sea del núcleo subtalámico (STN) o el globo pálido interno (GPi) usando un promotor excitador específico tal como CaMKII α , y aplicar la estabilización optogenética. A diferencia de la modulación eléctrica en la que se ven afectados todos los tipos de células, solo se suprimen las neuronas glutamatérgicas del STN.

Los aspectos de la presente invención se dirigen a ensayar un modelo de un circuito o enfermedad neuronal. El modelo puede definir la respuesta de salida del circuito en función de las señales de entrada. La respuesta de salida se puede evaluar usando una serie de diferentes características medibles. Por ejemplo, las características pueden incluir una respuesta eléctrica de las neuronas aguas abajo y/o una respuesta de comportamiento de un paciente. Para ensayar el modelo, se expresan sondas optogenéticas en una posición de entrada para el modelo. Las sondas optogenéticas se estimulan, y las características de salida se controlan y se comparan con una salida predicha por el modelo.

En ciertas implementaciones, el uso de sondas optogenéticas permite el ajuste de modelos definidos usando sondas eléctricas. Como sondas eléctricas, solo proporcionan una capacidad limitada para dirigir el estímulo y, por lo tanto, no son muy adecuadas para el estímulo de determinadas regiones, sin estimular también directamente las zonas cercanas. Las sondas optogenéticas desveladas en el presente documento proporcionan un mecanismo para la selección más precisa de la localización del estímulo. Por ejemplo, el estímulo de las sondas optogenéticas puede dirigirse a tipos muy específicos de circuitos/células, tales como fibras aferentes. La siguiente descripción proporciona un ejemplo de implementación que coincide con dicha realización, y pretende demostrar la viabilidad y aplicabilidad de amplio alcance de los aspectos de la presente invención.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la invención se puede usar en modelos animales de DBS, por ejemplo, en ratas con parkinson, para identificar los tipos de células diana responsables de los efectos terapéuticos (un campo de intenso debate e inmensa importancia clínica). Este conocimiento por sí solo puede conducir al desarrollo de mejores estrategias farmacológicas y quirúrgicas para el tratamiento de enfermedades humanas.

Una de dichas aplicaciones implica la potenciación a largo plazo (PLP) y/o la depresión a largo plazo (DLP) entre dos grupos neuronales. Mediante la dirección de la expresión de VChR1 y ChR2 a diferentes poblaciones neuronales y la estimulación de cada una con una frecuencia diferente de la luz, se pueden realizar la PLP o la DLP entre los dos grupos. Cada grupo se puede controlar individualmente usando la longitud de onda respectiva de la luz. Esto puede ser particularmente útil para aplicaciones en las que la disposición espacial de los dos grupos presenta problemas con

el control individual usando la misma longitud de onda de la luz. Por lo tanto, el/los dispositivo/s de suministro de luz es/son menos susceptible/s a la excitación del grupo neuronal erróneo y puede/n ser menos dependiente/s de la ubicación espacial exacta del estímulo óptico.

5 La administración de las proteínas a células *in vivo* se puede realizar usando una serie de diferentes dispositivos, métodos y sistemas de administración. En dicho dispositivo de administración hay un dispositivo implantable que suministra una secuencia de nucleótidos para la modificación de las células *in vivo*, tal como un vector viral. El dispositivo implantable también puede incluir un mecanismo de suministro de luz. El suministro de luz se puede realizar usando, por ejemplo, diodos emisores de luz (LED), fibra óptica y/o láseres.

10 Otra realización de la presente invención implica el uso de VChR1 en afectar en el destino de células madre, incluyendo la supervivencia/muerte, la diferenciación y la replicación. La modulación de las propiedades eléctricas ha demostrado controlar el destino de las células madre. Se pueden usar diversas técnicas para proporcionar los patrones de estímulo que modifiquen el destino de las células madre. Un ejemplo específico coincide con las técnicas usadas en Deisseroth, K. *et al.* "Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells", *Neuron* 42, pág. 535-552 (2004).

15 Otra realización de la presente invención se dirige al uso de VChR1 para evaluar la eficacia de los tratamientos. Esto puede incluir, pero sin limitación, la detección de fármacos, las pautas de tratamiento o la modelización de tratamientos/trastornos. En una realización específica, se usa VChR1 como la principal proteína ópticamente sensible en dichas evaluaciones. En realizaciones alternativas, VChR1 se usa con otros tipos de proteínas ópticamente sensibles (por ejemplo, ChR2 y/o NpHR) que responden a diferentes longitudes de onda.

20 Una realización específica de la presente invención implica el uso de VChR1 para generar una secuencia de ADNc de codones optimizados de mamífero y sintetizada (DNA 2.0, Menlo Park, CA).

25 La construcción del vector lentiviral se realizó usando los siguientes métodos. Se construyó VChR1-EYFP mediante la fusión de VChR1(1-300) con EYFP a través de un sitio de restricción de NotI. A continuación, se ligó el gen de fusión en los sitios de AgeI y EcoRI de la cadena principal lentiviral de CaMKII α para generar el vector pLenti-CaMKII α -VChR1-EYFP-WPRE. La construcción del vector de pLenti-CaMKII α -ChR2-EYFP-WPRE se ha descrito anteriormente. Se generaron lentivirus recombinantes. Para más detalles sobre la construcción o el uso de dichos vectores, se puede hacer referencia a Zhang, F., *et al.* "Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry," *Nature* 446, pág. 633-639 (2007).

30 Se prepararon neuronas del hipocampo cultivadas como se describe en Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. y Deisseroth, K. "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity", *Nat Neurosci* 8, pág. 1263-1268 (2005).

35 Para el registro de células enteras en las neuronas del hipocampo en cultivo, la solución intracelular contenía K-gluconato 129 mM, HEPES 10 mM, KCl 10 mM, MgATP 4 mM y Na3GTP 0,3 mM, titulada a pH 7,2. Para las neuronas del hipocampo en cultivo, se empleó la solución de Tyrode como la solución extracelular (NaCl 125 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 3 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 30 mM y HEPES 25 mM, pH a 7,3). Los registros se realizaron en un microscopio vertical Leica DM-LFSA dotado de un objetivo de inmersión en agua de 40 aumentos. Las resistencias de las pipetas de vidrio de borosilicato (Sutter Instruments) eran de ~ 5 M Ω , con un intervalo de 4-6 M Ω . La resistencia de acceso era de 10-30 M Ω , y se controló la estabilidad durante todo el registro. Todos los registros se realizaron en presencia de bloqueadores de la transmisión sináptica como se describe en Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. y Deisseroth, K. "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity", *Nat Neurosci*, pág. 1263-1268 (2005).

40 Para la fotoestimulación de las neuronas del hipocampo, se usaron los tres filtros siguientes en el conmutador óptico Lambda DG-4 (Sutter Instruments) con una lámpara de 300 W Xenon: 406 nm (FF01-406/15-25), 531 nm (FF01-531/22-25) y 589 nm (FF01-589/15-25) (Semrock).

45 Para los experimentos de ovocitos, se subclonó una secuencia de ADN sintético correspondiente a VChR11-313 (vchop1; adaptado al uso en codón humano, Geneart, Regensburg, Alemania) en pGEMHE y pEGFP de VChR1. Se inyectaron ARNc codificantes de ChR2 y VChR1, sintetizados *in vitro* a partir del plásmido pGEMHE por la ARN polimerasa de T7 (mMessage mMachin, Ambion), en los ovocitos (50 ng/célula). Los ovocitos se almacenaron durante 3-7 días a oscuras a 18 °C en solución de Ringer (NaCl 96 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, mM MgCl₂ 1 mM, MOPS-NaOH 5 mM, pH 7,5) en presencia de 1 mg/ml de penicilina, 1 mg/ml de estreptomycin, todo-*trans*-retinal 1 μ M y teofilina 0,5 mM.

50 Se realizó un ensayo de fijación de la tensión de dos electrodos en ovocitos de *Xenopus laevis* para obtener los espectros de acción. Se aplicaron pulsos láser de 10 ns (400-620 nm, 4-9 x 10¹⁹ fotones/s.m²) desde un OPO Rainbow (OPOTEK, Carlsbad, CA) bombeado por el tercer armónico de un Láser Nd-YAG brillante b (Quantel, Les Ulis Cedex, Francia) a los ovocitos a través de una guía de luz de 1 mm. Se compensó el amplificador Tec-05X (NPI Electronic, Tamm, Alemania) para mantener el cambio de tensión por debajo de 0,05 mV a una saturación de la mitad del pulso láser. La adquisición de datos y la activación de la luz se controlaron con el software pCLAMP a través de los interfaces

DigiData 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, EE.UU.).

La siguiente descripción incluye una descripción detallada de los resultados de una aplicación para el tratamiento y la caracterización de la enfermedad de Parkinson (EP). Esta implementación específica y los resultados correspondientes no pretenden ser limitantes.

Para abordar en primer lugar la hipótesis más ampliamente sostenida en el campo, los presentes inventores se preguntaron si la inhibición directa, reversible y auténtica de las neuronas del STN excitadoras del circuito local sería terapéutica en la enfermedad de Parkinson. El STN se mide en $< 1 \text{ mm}^3$ en ratas, pero la exactitud de la dirección puede apoyarse de registros extracelular durante la introducción del vector de opsina, ya que el STN se caracteriza por un patrón de disparo particular que es distinguible de las regiones fronterizas (FIG. 4A, FIG. 10C).

El STN es una estructura predominantemente excitadora embebida dentro de una red inhibitoria. Esta disposición anatómica permite una estrategia de dirección para la inhibición selectiva del STN (FIG. 4B), en la que eNpHR se expresa bajo el control del promotor de CamKII α , selectivo de las neuronas glutamatérgicas excitadoras y las células no inhibitorias, fibras de paso, glía o estructuras vecinas. De esta manera, se dirige una verdadera inhibición óptica al tipo de neurona local dominante del STN.

Se ensayaron intervenciones en el circuito óptico en ratas que se habían vuelto hemiparkinsonianas mediante la inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) unilateralmente en el haz medial del cerebro anterior derecho (MFB). La pérdida de células dopaminérgicas de la sustancia negra después de la administración de 6-OHDA fue confirmada por una reducción de los niveles de tirosina hidroxilasa unilateralmente en la parte dura de la sustancia negra (FIG. 10A). Estos roedores hemiparkinsonianos tienen déficit específicos en el uso de la extremidad contralateral (izquierda) y presentan rotaciones ipsilaterales a la lesión (hacia la derecha), que aumentan en frecuencia cuando los sujetos reciben anfetamina para facilitar la evaluación funcional, y disminuyen en frecuencia tras el tratamiento con agonistas de la dopamina o tras la DBS eléctrica (FIG. 4D, *derecha*). Este ensayo de rotación inducida por anfetamina es ampliamente usado para la identificación de los tratamientos en los roedores hemiparkinsonianos, que se pueden complementar con otros ensayos del comportamiento tales como de locomoción, escalada, y el sesgo de posición de la cabeza. Para inhibir directamente las neuronas del STN excitadoras, se administraron lentivirus que portaban eNpHR bajo el promotor de CamKII α al STN derecho de las ratas hemiparkinsonianas. La expresión de CamKII α ::eNpHR-EYFP fue específica de las neuronas excitadoras (como se muestra por la expresión de CamKII α y glutamato; FIG. 4B, *derecha*; FIG. 11A), consistente (tasa de infección DEL 95,73 % \pm 1,96 ETM, evaluada en n = 220 células positivas en CamKII α y limitada al STN (FIG. 4B, *izquierda* y *centro*). Para validar los efectos fisiológicos resultantes del control óptico, se empleó un dispositivo híbrido de estimulación óptica/registro eléctrico (Optrode) en los animales anestesiados con isoflurano para confirmar que eNpHR era funcional *in vivo*, inhibiendo de forma potente (> 80 %) los impulsos de neuronas registradas en el STN (FIG. 4C; FIG. S13A, B, FIG. 14A). Esta inhibición dirigida al tipo celular era temporalmente exacta y reversible, y se extendió en todas las bandas de frecuencia de disparo neuronal (FIG. 4C, FIG. 16A).

Para los ensayos de rotación de comportamiento en las ratas hemiparkinsonianas, se acopló fibra óptica dirigida al STN a un diodo láser de 561 nm para activar eNpHR. La DBS eléctrica fue muy eficaz en la reducción del comportamiento de rotación patológico, pero a pesar de la dirección precisa y la consistente eficacia fisiológica de la inhibición de eNpHR, los animales hemiparkinsonianos ni siquiera mostraron cambios mínimos en el comportamiento rotacional con la inhibición óptica directa de las neuronas del STN excitadoras locales (FIG. 4D). Además, no hubo efecto en la longitud de la trayectoria ni el sesgo de la posición de la cabeza en respuesta a la luz durante estos experimentos (véanse los métodos suplementarios). Aunque la administración de muscimol y lidocaína en la región del STN en monos y roedores puede aliviar los síntomas parkinsonianos (30), los datos de la FIG. 4 muestran que la intervención más específica de reducir de forma selectiva la actividad de las neuronas excitadoras locales del STN no pareció bastar por sí misma para afectar a los síntomas motores.

Otra posibilidad es que la DBS podría estar activando la secreción de moduladores gliales que tendrían la capacidad de modular los circuitos del STN locales. Esto coincidiría con los hallazgos recientes que indican que un factor derivado de la glía (adenosina) se acumula durante la DBS y desempeña un papel en la atenuación mediada por la DBS del temblor talámico. De hecho, el STN expresa receptores para moduladores derivados de la glía que pueden inhibir las corrientes postsinápticas en el STN. ChR2 presenta una interesante posibilidad para el reclutamiento de células gliales; cuando se abre por la luz, además de iones de Na $^+$ y K $^+$, ChR2 también puede pasar corrientes traza de Ca $^{2+}$ que desencadenan ondas de Ca $^{2+}$ en y activan astroglias que expresan ChR2. Se empleó un promotor de GFAP para dirigir ChR2 a las astroglias locales, validado con tinción de GFAP y S100 β (FIG. 5 A, FIG. 11B). Los registros del Optrode revelaron que la estimulación con luz azul del STN después de la transducción con GFAP::ChR2 inhibió reversiblemente el disparo neuronal en el STN (FIG. 5B, FIG. 12A), con un retardo variable en una escala de tiempo de segundos. Sin embargo, el reclutamiento de células astrogliales por este mecanismo no bastó para causar ni siquiera respuestas traza en la patología motora de los roedores parkinsonianos (FIG. 5C, FIG. 12B). La longitud de la trayectoria y el sesgo de la posición de la cabeza tampoco se vieron afectados por la luz durante estos experimentos. Si bien estos datos no excluyen la importancia de la inhibición del STN local como un factor que contribuye en la respuesta de la DBS, ya que no todas las neuronas del STN pueden ser afectadas de la misma manera por la modulación glial indirecta, la activación directa de las células gliales locales no pareció bastar para tratar los síntomas

del parkinson, lo que apunta a otros mecanismos del circuito.

Las oscilaciones de la red a determinadas frecuencias podrían desempeñar un papel importante en la patología y el tratamiento de la EP. Por ejemplo, la EP se caracteriza por niveles patológicos de oscilaciones beta en los ganglios basales, y la sincronización del STN a frecuencias gamma puede mejorar los síntomas de la EP, mientras que las frecuencias beta pueden empeorar los síntomas. Dado que la sola inhibición de los cuerpos celulares excitadores del STN no afectó a la patología del comportamiento, y dado que se usa la estimulación de alta frecuencia (HFS): 90-130 Hz para la DBS eléctrica, se usó ChR2 para activar oscilaciones de alta frecuencia en este intervalo dentro del STN. Se inyectó CaMKII α ::ChR2 en el STN (FIG. 6A) y se usó iluminación pulsada con un diodo láser de 473 nm para activar las neuronas excitadoras en el STN (FIG. 6B, FIG. 14B) durante los ensayos del comportamiento en los roedores parkinsonianos (FIG. 6C, FIG. 12C). A pesar de los efectos consistentes sobre la energía de alta frecuencia de la tasa de impulsos neuronales en el STN de los animales anestesiados (FIG. 16B), la HFS administrada localmente en la zona del STN no afectó a los síntomas del comportamiento de la EP (la longitud de la trayectoria y el sesgo de la posición de la cabeza se mantuvieron sin cambios por la luz - véanse los métodos complementarios). Animales ensayados en paralelo con impulsos de frecuencia beta tampoco mostraron ninguna respuesta de comportamiento, lo que indica que (si bien no se excluye un papel contributivo) las oscilaciones generadas directamente dentro de las neuronas excitadoras del STN no bastan para dar cuenta de los efectos terapéuticos.

Los presentes inventores midieron previamente en el tejido cortical y el hipotalámico la propagación de la luz azul en el ajuste de la iluminación de fibra óptica-diodo láser. Se observó que se podrían reclutar con fiabilidad volúmenes sustanciales de tejido (comparables a los del STN) a una densidad de energía luminosa suficiente para activar corrientes de opsina microbiana fisiológicamente significativas. Era importante repetir y extender estas medidas al entorno de la EP. En primer lugar, se confirmó que las mediciones de la propagación de la luz azul (473 nm) en el tejido cerebral representan un límite inferior en el volumen de tejido reclutado, debido a la menor dispersión de los fotones de baja energía suministrados desde el diodo láser a 561 nm. Por lo tanto, hay suficiente potencia luminosa presente para activar las opsinas en los 1,5 mm de la fibra para cualquier longitud de onda de la luz (FIG. 7A). A continuación, se extendieron estos hallazgos con un ensayo funcional para el reclutamiento de tejido en condiciones que imitaban los presentes experimentos de comportamiento (FIG. 7B,C). Después de un paradigma de estimulación óptica *in vivo* dirigida al STN con expresión de CaMKII α ::ChR2 en ratas con libertad de movimiento, se realizó una inmunohistoquímica para *c-fos*, un marcador bioquímico de la activación neuronal. Se observó la activación consistente de *c-fos* en el STN (FIG. 7B) en un volumen extendido (FIG. 7C.). De hecho, como era de esperar a partir de las mediciones de la dispersión de la luz y la geometría del tejido, se encontró que al menos 0,7 mm³ de STN son reclutados mediante la estimulación luminosa, casi coincidiendo con el volumen real del STN (FIG. 7C). Por lo tanto, la penetración de la luz no fue limitante, ya que todo el STN es reclutado por los paradigmas de modulación óptica de las FIG. 4-6.

Los efectos terapéuticos podrían surgir de la activación de las proyecciones axonales que entran en el STN, pues los electrodos de la DBS modularán de forma potente, no solo las células locales y sus eferentes, sino también las fibras aferentes. La optogenética diferencia estas dos posibilidades, ya que los lentivirus transducen somas sin transducir los axones aferentes. Para evaluar la posibilidad de que las respuestas del comportamiento motor de la EP estén moduladas por la dirección de proyecciones aferentes hacia el STN, se usaron ratones transgénicos Thy1::ChR2 en los que ChR2 se expresa en las neuronas de proyección, y se verificó que en la línea 18 de Thy1::ChR2, ChR2-YFP se excluye de los cuerpos celulares del STN, pero es abundante en las fibras aferentes (FIG. 8A).

Los presentes inventores realizaron registros con un optrode en ratones 6-OHDA anestesiados (FIG. 10B) para evaluar los efectos locales en la fisiología del STN de activar axones aferentes de forma selectiva, y encontraron efectos dependientes de la frecuencia (FIG. 8B). En primer lugar, se observó que la HFS de las fibras aferentes en el STN redujo potentemente los impulsos del STN en todas las bandas de frecuencia. Este efecto no cesó completamente sus circuitos locales, pues oscilaciones de alta frecuencia y de baja amplitud persistieron durante la estimulación (Figura 8B; FIG. 13C, D; FIG. 14C). A continuación, se encontró que la LFS de las fibras aferentes aumentó el disparo de frecuencia beta en el STN, sin afectar al estallido endógeno (FIG. 8B, FIG. 14D). A continuación, se evaluó el impacto de estas intervenciones específicas en el comportamiento de la EP en ratones 6-OHDA, y por primera vez entre las intervenciones optogenéticas, se observaron efectos notables. La activación de las fibras aferentes del STN con la HFS mejoró de manera consistente y reversible los síntomas de la EP, medidos por el comportamiento de rotación y el sesgo de la posición de la cabeza (FIG. 8C). Los efectos de la HFS no fueron sutiles. De hecho, en casi todos los casos, estos animales gravemente afectados por la enfermedad de Parkinson recobraron un comportamiento que no se distinguía del normal, y en todos los casos, el efecto terapéutico se invirtió de modo inmediato y por completo con el retorno de las rotaciones ipsilaterales al suspender el paradigma de pulsos de luz. En particular, los animales tratados podían cambiar libremente la dirección de su movimiento y la posición de la cabeza de izquierda a derecha, y viceversa. En marcado contraste con la HFS óptica, la LFS óptica (20 Hz) de las mismas fibras aferentes empeoró los síntomas de la EP, conduciendo un mayor comportamiento de rotación ipsilateral (FIG. 8C), lo que demuestra que los efectos del comportamiento observados no son consecuencia de la simple activación de la actividad unilateral. Por lo tanto, a diferencia de las intervenciones celulares directas en el STN, la activación de las fibras aferentes del STN con la HFS y la LFS moduló diferencialmente los síntomas de la EP de una manera correspondiente a las frecuencias de la estimulación relacionada clínicamente con la mejoría o el agravamiento de los síntomas de la EP.

Una amplia selección de fibras procedentes de amplias zonas del cerebro converge en el STN, destacando quizás la utilidad del STN como diana focal de la DBS. Probablemente, muchos de estos aferentes contribuyen conjuntamente a los efectos terapéuticos, y es poco probable que una sola fuente de fibras sea completamente responsable de los efectos observados en el comportamiento. Sin embargo, se han explorado estos aferentes en mayor detalle para determinar la clase general de fibras que pueden contribuir.

Los animales Thy1::Chr2 muestran expresión de Chr2 principalmente en las neuronas de proyección excitadoras. De hecho, los marcadores inhibidores GABA y GAD67 no fueron detectables en las fibras de Thy1::Chr2 del STN (Figura 9A, izquierda), descartando de manera eficaz las contribuciones de las proyecciones GABAérgicas palidales (LGP/GPe). Tampoco se encontró ninguna localización de los principales marcadores de neuromoduladores (dopamina y acetilcolina) dentro de las fibras de Thy1::Chr2 del STN (FIG. 11C), descartando también el SNr dopaminérgico como un origen de fibra relevante. A continuación, se exploraron las posibles fuentes de fibras excitadoras, y no se encontró ninguna expresión de Chr2-YFP en los cuerpos celulares de los núcleos parafascicular o pedúnculo pontino excitadores, posibles contribuyentes de fibras excitadoras al STN. Dentro del neocórtex de estos ratones, sin embargo, se expresó Chr2-YFP fuertemente en las neuronas excitadoras que se proyectan hacia el STN. Dado que se ha sugerido que hay una conectividad patológicamente potente entre el STN y la corteza motora primaria M1 subyacente a la disfunción del circuito de la EP, por lo tanto, se exploró M1 como un posible factor contribuyente.

Se verificó en M1 Thy1::Chr2 la presencia de la expresión de Chr2 potente y selectiva, restringida en gran medida a las neuronas de la capa V y las dendritas apicales correspondientes, pero no las células del interior de otras capas (FIG. 9A, derecha). Para investigar la conectividad funcional entre estas neuronas de proyección de la capa V y STN en los animales con EP, se realizó un experimento con un optrode separado en animales anestesiados en los que se habían colocado electrodos de fibra óptica y de registro en dos regiones diferentes del cerebro en animales Thy1::Chr2 (FIG. 9B). Mediante la activación de las neuronas de proyección de la capa V de M1 y el registro simultáneo tanto en M1 como en STN, se encontró que este tipo de estimulación precisa de M1 influyó de forma potente en la actividad neuronal del STN (FIG. 9C, FIG. 16C, D), y que las neuronas de la capa V de M1 se podrían reclutar antidrómicamente mediante la estimulación óptica en el STN (FIG. 15). Mientras que, como se ha señalado anteriormente, muchos aferentes locales de la región STN, incluyendo los de ZI, es probable que sean subyacentes a los complejos efectos terapéuticos de la DBS, las influencias funcionales entre la capa V de M1 y el STN podrían ser un importante factor contribuyente. De hecho, se encontró que la estimulación óptica HFS selectiva de la capa V de M1 fue suficiente para mejorar los síntomas de la EP de una manera similar a la estimulación de STN en una serie de medidas que iban desde el comportamiento de rotación (FIG. 9D) hasta el sesgo de la posición de la cabeza y la locomoción (FIG. 9E, F). Al igual que con la estimulación de STN, las rotaciones patológicas y el sesgo de la posición de la cabeza se redujeron mediante la HFS óptica en M1. Por el contrario, aunque no aumentó la patología, la estimulación óptica de 20 Hz (LFS) de M1 no tuvo ningún efecto terapéutico (FIG. 9D, E, F), e incluso a las intensidades de luz más altas alcanzables sin epileptogénesis, la LFS de M1 no activó ni modificó el comportamiento de rotación, a diferencia de la estimulación cortical LFS de M2, que puede provocar rotaciones contralaterales. Por último, se confirmó el aumento de la movilidad funcional con la HFS de M1, pero no con la LFS, con la cuantificación del aumento de la distancia y la velocidad de la locomoción en ratones Thy1::Chr2 con EP; en ausencia de anfetamina, la HFS de M1 permitió a los animales con otra forma de bradicinesia moverse libremente sin provocar comportamiento rotacional (FIG. 9F).

La FIG. 4 muestra la inhibición óptica directa de las neuronas locales del STN. (A) La colocación de la cánula, la inyección del virus y la profundidad de la fibra se guiaron por registros del STN, que está rodeado por la zona incerta (ZI) silenciosa y de la cápsula interna (IC). (B) Imágenes confocales de las neuronas del STN que expresan CaMKII α ::eNpHR-EYFP y marcadas para CaMKII α específica de las neuronas excitadoras (derecha). (C) La iluminación continua a 561 nm del STN que expresa CaMKII α ::eNpHR-EYFP en ratas 6-OHDA anestesiadas reduce la actividad del STN; se muestran el rastro del optrode representativo y el espectro de amplitud. La frecuencia media de los impulsos se redujo de 29 ± 3 Hz a 5 ± 1 Hz (media \pm ETM, $p < 0,001$, prueba t de Student, $n = 8$ rastros de diferentes coordenadas del STN en 2 animales). (D) Las rotaciones inducidas por la anfetamina no se vieron afectadas por la estimulación del STN en estos animales ($p > 0,05$, $n = 4$ ratas, prueba t con $\mu = 0$). La flecha roja indica la dirección de los efectos patológicos, mientras que la flecha verde indica la dirección de los efectos terapéuticos. El control eléctrico implantado con un electrodo de estimulación mostró efectos terapéuticos con la HFS (120-130 Hz, ancho de pulso de 60 μ s, 130-200 μ A, $p < 0,05$, prueba t con $\mu = 0$). El porcentaje de cambio de -100 % indica que el roedor está totalmente corregido. Los datos de todas las cifras son las medias \pm ETM ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

La FIG. 5 muestra las astroglias diana de dentro del STN. (A) Las imágenes confocales muestran los astrocitos del STN que expresan GFAP::Chr2-mCherry, teñidos conjuntamente con GFAP (derecha). (B) Iluminación a 473 nm del STN que expresa GFAP::Chr2-mCherry en ratas 6-OHDA anestesiadas. El registro del optrode reveló que la iluminación continua inhibió la actividad del STN con 404 ± 39 ms de retardo hasta el comienzo y 770 ± 82 ms de retardo hasta la compensación ($n = 5$ rastros de diferentes coordenadas del STN en 2 animales), mientras que el coeficiente de utilización del 50 % también inhibió los impulsos, con un retardo hasta el comienzo de 520 ± 40 ms y un retardo hasta la compensación de 880 ± 29 ms ($n = 3$ rastros de diferentes coordenadas del STN en 2 animales) con $p < 0,001$. (C) Las rotaciones inducidas por anfetamina no se vieron afectadas por la iluminación del coeficiente de utilización del 50 % en estos animales (derecha, $p > 0,05$, $n = 7$ ratas, prueba t con $\mu = 0$).

La FIG. 6 muestra la despolarización óptica de las neuronas del STN a diferentes frecuencias. (A) Imágenes confocales de las neuronas del STN que expresan CaMKII α ::ChR2-mCherry y marcadas para el marcador CaMKII α específico de las neuronas excitadoras. (B) HFS óptica (120 Hz, ancho de pulso de 5 ms) del STN que expresa CaMKII α ::ChR2-mCherry de ratas 6-OHDA resgistrada con el optrodo conectado a un diodo láser de 473 nm (se muestran el rastro y el espectro de amplitud representativos). La frecuencia de los impulsos aumentó de 41 ± 2 Hz a $85 \text{ Hz} \pm 2$ (HFS frente a antes, $n = 5$ rastros: $p < 0,001$, prueba t , después, $n = 3$ rastros; se muestrearon rastros de diferentes coordenadas del STN en 1 animal). (C) Las rotaciones inducidas por la anfetamina no se vieron afectadas por la estimulación óptica de alta frecuencia (izquierda, 130 Hz, 5 ms, $n = 5$ ratas) o baja frecuencia (centro, 20 Hz, 5 ms, $n = 2$ ratas).

La FIG. 7 muestra la cuantificación del volumen de tejido reclutado por la intervención óptica. (A) Se muestran los valores de intensidad para la luz a 473 nm (azul) y 561nm (amarilla) para una fibra de 400 μm en función de la profundidad en el tejido cerebral. La línea discontinua a 1 mW/mm^2 (fuente de luz de 30 mW) indica la intensidad mínima necesaria para activar las canalrodopsinas y las halorodopsinas. (B) Las imágenes confocales de las neuronas del STN que expresan CaMKII α ::ChR2-mCherry y marcadas para el producto génico temprano inmediato c-fos muestran la activación neuronal consistente producida por la estimulación con luz *in vivo*. Las puntas de flecha indican las células positivas en c-fos. Se estimularon ratas que tenían libertad de movimiento que expresaban ChR2 en el STN (mismos animales que en la FIG. 6) con luz de 473 nm (20 Hz, ancho de pulso de 5 ms). (C) El volumen del STN que mostró una potente activación de c-fos se estimó en al menos $0,7 \text{ mm}^3$ (las líneas discontinuas indican los límites del STN); la activación potente de c-fos se observó medial-lateral (1,155 mm), anterior-posterior (0,800 mm) y dorsal-ventral (0,770 mm) en cortes subtalámicos fotografiados mediante microscopía confocal con contraste de DAPI.

La FIG. 8 muestra el control óptico selectivo de las fibras aferentes en el STN. (A) Las imágenes confocales de la expresión de Thy1::ChR2-EYFP en el STN y la tinción con DAPI para los núcleos muestra la expresión selectiva en las fibras y no en los cuerpos celulares (*derecha*). (B) La HFS óptica (130 Hz, ancho de pulso de 5 ms) de la región del STN en un ratón 6-OHDA Thy1::ChR2-EYFP anestesiado con luz a 473 nm inhibió los impulsos de gran amplitud del STN (rastro de muestra, *parte superior izquierda*), a la vez que indujo oscilaciones de alta frecuencia y de menor amplitud (FIG. 13C, D; 14C). La LFS óptica (20 Hz, ancho de pulso de 5 ms) produjo una generación de impulsos fiable a 20 Hz (*parte inferior izquierda*). Mientras que la HFS impidió el estallido (*parte superior derecha*, $p < 0,001$, $n = 3$), la LFS no tuvo ningún efecto significativo en la frecuencia de estallidos mediante una prueba t de student de 2 muestras ($p > 0,05$, $n = 3$ rastros), ni en los impulsos/estallido (*parte inferior derecha*, $p > 0,05$, $n = 3$ rastros). (C) La HFS óptica en el STN de estos animales (*izquierda*, 100-130 Hz, 5 ms, $n = 5$ ratones) produjo efectos terapéuticos consistentes, reduciendo las rotaciones ipsilaterales y permitiendo que los animales cambiaran libremente de dirección. Por el contrario, la LFS óptica (*segunda de la izquierda*, 20 Hz, 5 ms, $n = 5$ ratones) agravó los efectos patológicos, causando el aumento de las rotaciones ipsilaterales. Ambos efectos fueron reversibles (Después). Los cambios fueron significativos mediante la prueba t con $\mu = 0$ para ambas HFS ($p < 0,001$, $n = 5$ ratones) y la LFS ($p < 0,05$, $n = 5$ ratones) en comparación con la línea basal (luz apagada). (F) El sesgo de la posición de la cabeza contralateral también mostró una corrección consistente con la HFS mediante la prueba t de student de 2 muestras (HFS frente a luz apagada: $p < 0,05$; $n = 2$ ratones), pero no con la LFS (LFS frente a luz apagada: $p > 0,05$, $n = 2$ ratones).

La FIG. 9 muestra la estimulación óptica selectiva de las neuronas de la capa V de la corteza motora primaria anterior. (A) La tinción con GAD67 y GABA no mostraron colocalización con Thy1::ChR2-EYFP en el STN (*izquierda*). Las dendritas apicales de las neuronas de la capa V se pueden ver ascendiendo a la superficie pial (22, 23) (*derecha*). (B) Esquema para la estimulación óptica de M1 con el registro simultáneo en el STN de los ratones Thy1::ChR2. (C) Estimulación óptica (473 nm) de M1 y registro simultáneo en el STN de ratones Thy1::ChR2 anestesiados. La HFS óptica (130 Hz, ancho de pulso de 5 ms) de la actividad modulada por M1 tanto en M1 como en STN. La LFS óptica (20 Hz, 5 ms) de M1 produjo un disparo tónico de 20 Hz tanto en M1 como en STN. (D) La HFS óptica (130 Hz, ancho de pulso de 5 ms) redujo las rotaciones ipsilaterales inducidas por la anfetamina en ratones 6-OHDA Thy1::ChR2 ($p < 0,01$, $n = 5$ ratones) en contraste con la LFS óptica (20 Hz, ancho de pulso de 5 ms, $p > 0,05$, $n = 4$ ratones); prueba t con $\mu = 0$. (E) El sesgo de la posición de la cabeza contralateral se corrigió en la HFS (HFS frente a luz apagada: $p < 0,001$, $n = 4$ ratones), mientras que la LFS tuvo poco efecto (LFS frente a luz apagada: $p > 0,05$, $n = 3$ ratones); prueba t de student de 2 muestras. (F) La HFS pero no la LFS en M1 aumentaron significativamente la longitud del trayectoria (HFS, $p < 0,01$, $n = 2$ ratones) y la escalada ($p < 0,05$, $n = 3$ ratones); prueba t de student de 2 muestras. Se muestran las trayectorias de la muestra antes, durante y después de la HFS (100 segundos cada una, las longitudes de la trayectoria se indican en cm).

De acuerdo con una implementación específica, se siguieron las siguientes etapas en la obtención de los resultados descritos en el presente documento. Para verificar el fenotipo de las células y medir la actividad de c-fos, se anestesiaron roedores con 65 mg/kg de pentobarbital sódico y se perfundieron por vía transcardiaca con paraformaldehído helado al 4 % (PFA) en PBS (pH 7,4). Se fijaron los cerebros durante una noche en PFA al 4 % y luego se equilibraron en sacarosa al 30 % en PBS. Se hicieron cortes coronales de 40 micrómetros de espesor en un micrótomos de congelación y se almacenaron en un crioprotector a 4 °C hasta su procesamiento para la inmunohistoquímica. Se lavaron los cortes que flotaban libremente en PBS y después se incubaron durante 30 min en Triton X-100 al 0,3 % (Tx100) y suero normal de burro al 3 % (NDS). Se incubaron los cortes durante una noche con el anticuerpo primario en Tx100 al 0,01 % y NDS al 3 % (anti-cfos de conejo a 1:500, anti-GFAP de conejo a 1:500, anti-MAP2 de ratón a 1:500, anti-GAD67 de ratón a 1:500, anti-GABA de conejo a 1:200, anti-vGlut1 de ratón a 1:500,

anti-VGlu2 de ratón a 1:500, anti-CaMKII α de ratón a 1:200, anti-S100 β de ratón a 1:250, anti-glutamato de conejo a 1:200, anti-tirosina hidroxilasa de pollo a 1:500, y anti-colina acetiltransferasa de cabra a 1:200). A continuación, se lavaron los cortes y se incubaron con anticuerpos secundarios (1:1000) conjugado con FITC, Cy3 o Cy5 durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras una incubación de 20 min con DAPI (1:50.000), se lavaron los cortes y se montaron en portaobjetos de microscopio con PVA-DABCO.

Se adquirieron imágenes de fluorescencia confocales en un microscopio láser de barrido usando un objetivo de inmersión en aceite 20X/0.70NA o 40X/1.25NA. Para determinar el volumen de la activación de c-fos, se adquirieron imágenes apiladas en serie que cubrían una profundidad de 20 μ m a través de múltiples cortes subtalámicos mediales-laterales, anteriores-posteriores y dorsales-ventrales usando los ajustes equivalentes. El software de análisis de imágenes calculó el número de células positivas en c-fos por campo mediante la umbralización de la inmunorreactividad de c-fos por encima de los niveles de fondo y usando la tinción con DAPI para delinear los núcleos. Para determinar la tasa de transducción viral, se determinó el porcentaje de neuronas inmunorreactivas con CaMKII α por campo de 40 aumentos que también eran positivas en eNpHR-YFP en múltiples imágenes apiladas en serie de cortes subtalámicos. Las imágenes de campo grande de los cortes enteros se recogieron en un microscopio estereoscópico Leica MZL 6FA.

Se construyeron vectores lentivirales portadores de los genes usados usando técnicas de clonación. La construcción de CaMKII α ::eNpHR se produjo mediante la amplificación por PCR de la construcción de eNpHR-EYFP previamente publicada y clonada en marco en los sitios de restricción AgeI y EcoRI de un lentivirus portador del promotor de CaMKII α . La construcción de CaMKII α ::ChR2 se produjo mediante la amplificación por PCR de la construcción de ChR2-mCherry, y también se clonó en marco en los sitios de restricción AgeI y EcoRI de un lentivirus portador del promotor de CaMKII α . La construcción de GFAP::ChR2 se produjo reemplazando el promotor de CaMKII α por el promotor de GFAP en la construcción de CaMKII α ::ChR2-mCherry usando los sitios de las enzimas de restricción AgeI y Pad.

Entonces se produjo un lentivirus de alto título ($> 10^9$ ufp/ml) a través de la cotransfección con fosfato de calcio de células 293FT con el vector lentiviral, pCMV Δ R8.74 y PMD2.G (S2). 24 h después de la transfección, se cambiaron las células 293FT a medio exento de suero que contenía butirato de sodio 5 mM; se recogió el sobrenadante 16 h después y se concentró por ultracentrifugación a 50.000 x g con cojín de sacarosa al 20 %. Se volvió a suspender el sedimento viral resultante en solución salina tamponada con fosfato a 1/1.000 del volumen original.

Para garantizar que no hubiera ninguna fuga significativa de expresión en los tipos de células no diana, se empleó un vector AAV inducible por Cre con un marco de lectura abierto (ORF) invertido flanqueado por dos sitios LoxP, en el que la secuencia de ChR2-EYFP está presente en la orientación antisentido. Tras la transducción, las células que expresan Cre invierten el ORF de ChR2-EYFP de una manera estable e irreversible, y de ese modo, activan la expresión sostenida de ChR2-EYFP bajo el control del promotor del factor de elongación 1 α (EF-1 α) potente y constitutivamente activo (Feng Zhang, resultados no publicados). Para construir vectores AAV recombinantes activados por Cre, se sintetizó el casete de ADN portador de dos pares de sitios lox incompatibles (loxP y lox2722), y se insertó el transgén ChR2-EYFP entre los sitios loxP y lox2722 en la orientación inversa. El casete de ChR2-EYFP invertido flanqueado por dos sitios LoxP resultante se clonó en una versión modificada del vector pAAV2-MCS portador del promotor de EF-1 α y el elemento regulador posterior a la traducción del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) para mejorar la expresión. Los vectores AAV recombinantes se serotiparon con proteínas de la cubierta de AAV5 y fueron empaquetados por el núcleo del vector viral en la Universidad de Carolina del Norte. La concentración viral final fue de 2×10^{12} copias del genoma (gc)/ml.

Los sujetos de estos experimentos fueron ratas adultas (Fisher hembras, 200-300 g) y ratones (machos y hembras, antecedentes C57BL/6, 15-30 g). La cría de los animales y todos los aspectos de la manipulación experimental de los mismos se realizaron estrictamente de acuerdo con las directrices del Instituto Nacional de Salud, y han sido aprobados por los miembros del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Stanford. Todas las cirugías se realizaron en condiciones asépticas. Los roedores fueron anestesiados usando isoflurano al 1,5 % (para cirugías de más de 1 hora) o mediante inyección por vía intraperitoneal (90 mg/kg de ketamina y 5 mg/kg de xilazina para las ratas; 80 mg/kg y 15-20 mg/kg, respectivamente, para los ratones). Se afeitó la parte superior de la cabeza de los animales, se limpió con un etanol al 70 % y betadine, y luego se colocaron en un aparato estereotáctico. Se aplicó pomada oftálmica para evitar el secado de los ojos. Se realizó una incisión en la línea media del cuero cabelludo, y luego se realizaron pequeñas craneotomías usando un taladro montado en el aparato estereotáctico para la inyección de 6-OHDA en el haz medial del cerebro anterior (rata: -2 AP, 2 ML, -7,5 DV; ratón: -1,2 AP, 1,2 ML, -4,75 DV) y la inyección del virus en el STN (rata: -3.6 mm AP, 2,5 mm ML; ratón: -1,9 mm AP, 1,7 mm ML).

Para los roedores que recibieron la inyección de lentivirus en el STN, se usó el registro extracelular *in vivo* para determinar con precisión la ubicación del STN a lo largo del eje dorsal-ventral. La profundidad fue de aproximadamente -7 mm en las ratas y de -4 mm en los ratones. Se administró el lentivirus concentrado (descrito anteriormente) en el STN usando una jeringa de 10 μ l y una aguja fina de metal de calibre 34; se controlaron el volumen y el caudal de inyección (3 sitios dentro del STN a lo largo del eje dorso-ventral; cada inyección fue de 0,6 μ l a 0,1 μ l/min) con una bomba de inyección. Tras la inyección final, se dejó la aguja en su lugar durante 10 minutos más y luego se retiró lentamente.

- A continuación, se usó 6-OHDA para lesionar la sustancia negra y producir roedores hemiparkinsonianos. Se administró desipramina (20 mg/kg para las ratas; 10 mg/kg para los ratones; inhibidor de la recaptación noradrenérgica para evitar daños en los terminales noradrenérgicos), seguida ~30 minutos más tarde de 6-OHDA (8 µg/4 µl para las ratas; 6 µg/2 µl para los ratones) con ácido ascórbico al 0,1 % (para evitar la degradación de 6-OHDA) en el haz medial del cerebro anterior derecho (rata: -2 AP, +2 ML y -7,5 DV; ratón: -1,2 AP, +1,2 ML y -4,75 DV). La perfusión para la inyección de 6-OHDA (rata: 4 µl, ratón 2 µl) fue a un caudal de 1,2 µl/min durante 4 min, y se dejó la aguja *in situ* durante 5 minutos más.
- 5
- 10 Se biseló una guía de fibra (rata: C312G, ratón: C313G) para formar un borde afilado (para penetrar más fácilmente en el tejido cerebral y reducir el movimiento del tejido), y luego se insertó a través de la craneotomía a una profundidad de aproximadamente 400 µm por encima del STN o la corteza motora primaria anterior (ratón: 2 AP, 2 ml, 0,5 DV). Se usó una capa de cemento adhesivo seguida de cemento cranioplástico para asegurar el sistema de guía de fibra al cráneo. Después de 20 min, se cerró herméticamente de nuevo el cuero cabelludo usando adhesivo tisular. El animal se mantuvo en una almohadilla térmica hasta que se recuperó de la anestesia. Se administró buprenorfina (0,03 mg/kg) por vía subcutánea después del procedimiento quirúrgico para minimizar las molestias. Se insertó una cánula ficticia (rata: C313G, ratón: C312G) para mantener la guía de fibra patente.
- 15
- 20 Para los roedores de control de DBS eléctrica, se implantó un electrodo de estimulación (MS303/3-B) en el STN. Se siguió el procedimiento anterior para la inyección de OHDA y, a continuación, se usó el registro extracelular *in vivo* para determinar la profundidad del STN, y se insertó el electrodo de estimulación a esa profundidad y se fijó usando una capa de cemento adhesivo seguida de cemento cranioplástico. Se usó adhesivo tisular para volver a pegar el cuero cabelludo, y el animal se mantuvo en un cojín de calentamiento hasta que se recuperó de la anestesia y se administró buprenorfina para minimizar las molestias. Luego se usó una tapa contra el polvo (303DC/1) para cubrir los contactos de los electrodos.
- 25
- Se realizaron simultáneamente la estimulación óptica y el registro eléctrico en una sola región en roedores vivos como se ha descrito previamente usando un optrode compuesto de un electrodo de tungsteno extracelular (1 MΩ, ~125 m) firmemente unido a una fibra óptica (~200 m) con la punta del electrodo más profunda (~0,4 mm) que la punta de la fibra, para asegurar la iluminación de las neuronas registradas. Para la estimulación y el registro en dos regiones distintas, se crearon pequeñas craneotomías por encima de ambas regiones diana, y se colocó una fibra o un optrode por encima de una región a través de una craneotomía, y un electrodo plano o un optrode en la otra región a través de una craneotomía separada (véase la FIG. 9B para ver el diagrama). La estimulación de la corteza motora anterior se logró mediante la colocación de la fibra óptica justo por encima de la superficie del cerebro, activando la capa 5 de la corteza; para la estimulación del STN, la fibra se situó 300 µm por encima del STN. El STN se identificó usando su patrón de disparo altamente estereotipado y por el hecho de que está rodeado dorsoventralmente por regiones silenciosas. Se acopló la fibra óptica a un diodo láser de 473 nm o 561 nm (salida de la fibra de 30 mW) de CrystaLaser. Se realizaron registros de una sola unidad en ratas anestesiadas con isoflurano al 1,5 % y ratones anestesiados con inyecciones intraperitoneales de cóctel de ketamina (80 mg/kg)/xilazina (15-20 mg/kg). Se usaron pClamp 10 y una la tarjeta Digidata 1322A tanto para recoger los datos como para generar pulsos de luz a través de la fibra. La señal registrada fue filtrada por el paso de banda a 300 Hz de baja/5 kHz de alta (amplificador de CA de microelectrodos modelo 1800). Para la colocación exacta del par de fibra/electrodo, se usó la instrumentación estereotáctica.
- 30
- 35
- 40
- Para el comportamiento, se cortaron con precisión fibras ópticas multimodales (NA 0,37; rata: núcleo de 400 µm, BFL37-400; ratón: núcleo de 300 µm, BFL37-300) a la longitud óptima para maximizar el volumen del STN con recepción de luz. Aproximadamente una semana antes del comportamiento, se usó un electrodo de registro extracelular para determinar la profundidad del borde dorsal del STN desde la punta de la guía de la cánula, y se cortaron las fibras para que fueran de 200 a 300 µm más cortas. Para la estimulación de la corteza motora anterior, la fibra se colocó encima de la capa 5 (a menos de un milímetro de profundidad). Para garantizar la estabilidad de la fibra durante las pruebas en los animales en movimiento, se pegó un adaptador de cánula interno a la fibra óptica extraída. Para insertar la fibra, se colocaron los roedores brevemente bajo isoflurano y se insertó la fibra mientras el animal se recuperaba de la anestesia. Se ajustó el adaptador interno de la cánula a presión sobre la guía de la cánula y también se usó la mitad inferior de la parte de plástico de una cánula ficticia para asegurarse de que el adaptador permaneciera conectado a la parte superior de la guía de la cánula.
- 45
- 50
- 55
- Para la estimulación óptica, se conectó la fibra a un diodo láser de 473 nm o 561 nm (salida de la fibra de 20 mW) a través de un adaptador de FC/PC. La salida del láser se controló mediante un generador de funciones (33220A) para variar la frecuencia, el coeficiente de utilización y la intensidad. Para los animales Thy1::Chr2, la intensidad mínima media usada para producir la conducta terapéutica fue de 10 mW. Se usó un conmutador óptico giratorio de aluminio personalizado para liberar la torsión en la fibra causada por la rotación de los animales.
- 60
- La conducta motora se evaluó usando las rotaciones inducidas por anfetaminas, el sesgo de la posición de la cabeza, la escalada y la longitud de la trayectoria. Los animales solo fueron aceptados para la investigación experimental cuando la anfetamina indujo de manera fiable rotaciones en la dirección ipsilateral, confirmando una lesión de 6-OHDA de la sustancia negra. Antes y después de cada ensayo de estimulación, se usó un ensayo de igual duración con la
- 65

luz apagada como un control. Cada uno de estos ensayos fue de aproximadamente 3 minutos de duración haciendo toda la secuencia de luz apagada-luz encendida-luz apagada en 9 minutos de duración. Para el comportamiento inducido por anfetamina, se inyectó anfetamina (rata: 2 mg/kg; ratón: 2,6 mg/kg) 30 minutos antes de las mediciones del comportamiento; se insertó la fibra en la cánula y se colocó el roedor en un cilindro opaco, no reflectante (rata: diámetro de 25 cm, altura de 61 cm, ratón: diámetro de 20 cm, altura de 46 cm) 10 minutos antes de los experimentos del comportamiento. Se contaron las rotaciones ipsilaterales a las lesiones de 6-OHDA (giro en el sentido de las agujas del reloj) y se restaron las rotaciones contralaterales. En el cálculo del porcentaje de cambio, se consideró el cambio en el sesgo de rotación en relación con el período sin estimulación. El sesgo de la posición de la cabeza se determinó contando el número de inclinaciones de la cabeza ($> 10^\circ$ de desviación hacia la izquierda o hacia la derecha de la línea media) en el tiempo. Cada vez que el roedor se levantó y tocó con cualquier pata la pared del cilindro se contabilizó como una escalada. La longitud de la trayectoria se midió con Viewer. Una vez finalizados los experimentos de comportamiento, se confirmó la colocación de la cánula mediante un corte.

Para los experimentos en los que la estimulación óptica no produjo un cambio en el comportamiento de los roedores, también se recogieron los datos de la longitud de la trayectoria y el sesgo de la posición de la cabeza, mientras que los roedores estaban con anfetamina. La iluminación continua a 561 nm del STN con expresión de CaMKII α ::eNpHR-EYFP en ratas 6-OHDA no afectó a la longitud de la trayectoria (cm/min; luz encendida frente a la luz apagada: $757,05 \pm 163,11$ frente a $785,74 \pm 157,56$, $p = 0,90$, $n = 4$ ratas; media \pm ETM; prueba t de 2 muestras) ni al sesgo de la posición de la cabeza (% del tiempo hacia la derecha; luz encendida frente a la luz apagada: $99,92 \pm 0,08$ frente a $99,75 \pm 0,25$, $p = 0,56$, $n = 4$ ratas; media \pm ETM; prueba t de 2 muestras); la HFS óptica (120 Hz, ancho de pulso de 5 ms) o la LFS (20 Hz, ancho de pulso de 5 ms) del STN con expresión de CaMKII α ::ChR2-mCherry en ratas 6-OHDA no afectaron a la longitud de la trayectoria (cm/min; HFS frente a la luz apagada: $803,82 \pm 129,04$ frente a $851,95 \pm 166,20$, $p = 0,83$, $n = 5$ ratas; LFS frente a la luz apagada: $847,15 \pm 141,95$ frente a $779,11 \pm 104,01$, $p = 0,74$, $n = 2$ ratas; media \pm ETM; prueba t de 2 muestras) ni al sesgo de la posición de la cabeza (% de tiempo hacia la derecha; HFS frente a la luz apagada: $93,97 \pm 3,78$ frente a $94,20 \pm 2,96$, $p = 0,96$, $n = 5$ ratas; LFS frente a la luz apagada: $98,50 \pm 1,50$ frente a $98,50 \pm 0,50$, $p = 1,00$, $n = 2$ ratas; media \pm ETM; prueba t de 2 muestras); la iluminación a 473 nm del STN con expresión de GFAP::ChR2-mCherry en ratas 6-OHDA tampoco afectó a la longitud de la trayectoria (cm/min; luz encendida frente a luz apagada $1042,52 \pm 113,73$ frente a $1025,47 \pm 113,63$, $p = 0,92$, $n = 4$ ratas; media \pm ETM; prueba t de 2 muestras) ni al sesgo de la posición de la cabeza (% del tiempo hacia la derecha; luz encendida frente a luz apagada: $98,16 \pm 0,98$ frente a $98,98 \pm 0,65$, $p = 0,52$, $n = 4$ ratas; media \pm ETM; prueba t de 2 muestras).

Las mediciones de transmisión de luz se realizaron con bloques de tejido cerebral preparados a partir de dos ratas Fisher de 300 g y ensayados de inmediato. Se cortaron bloques de tejido de 2 mm de espesor en solución de sacarosa a 0-4 °C usando un vibratome. Luego se colocó el tejido en una placa de Petri que contenía la misma solución de sacarosa sobre el fotodetector de un medidor de potencia. La punta de una fibra óptica de 200 μ m de diámetro acoplada a un láser de diodo azul o amarillo (473 nm o 561 nm, salida de la fibra de 30 mW) se montó en un micromanipulador. En primer lugar, se midió la potencia a través de la solución. Luego, se movió la punta de la fibra hacia abajo en el tejido en incrementos de 100 μ m y se midió la potencia. Cuando la fibra alcanzó la placa de Petri, se comparó la potencia medida con la medición inicial a través de la solución para confirmar la potencia de salida total a través de la fibra. Entonces se calculó la fracción el porcentaje de transmisión como la proporción entre la potencia medida a través del tejido y la potencia medida a través de la solución. A continuación, se calculó la intensidad de la potencia teniendo en cuenta la intensidad de la luz propagada debido a la forma cónica de la salida de luz de 30 mW desde una fibra de 400 μ m basada en la apertura numérica de la fibra de 0,37. Se supuso que la salida de fibra era uniforme a través del diámetro del cono. Las mediciones se realizaron a través de la materia gris en tres bloques de tejido cerebral para cada longitud de onda con cada bloque moviéndose en sentido anterior-posterior en el tálamo y en la corteza y dorsal-ventralmente a través del tálamo.

Se usó el umbral de búsqueda de Clampfit para la detección automática de los impulsos del registro de múltiples unidades, que luego fue validado mediante inspección visual. Se observaron las formas de onda de los impulsos mostrados por Clampfit para comprobar la calidad de la detección de los impulsos. Para los rastros con poblaciones de múltiples impulsos, se establecieron umbrales para capturar todos los impulsos; durante el estallido, es probable que se registraran múltiples neuronas de forma simultánea. Los estallidos se identificaron en Clampfit; dos impulsos cualquiera consecutivos que ocurrieron en un intervalo de menos de 300 ms se contaron como pertenecientes al mismo estallido, y solo se incluyeron estallidos de al menos 3 impulsos. Para cuantificar la actividad neuronal a diferentes frecuencias, se generaron espectros para los rastros de los registros extracelulares *in vivo* usando una transformada ondícula después de convertir los rastros en trenes de impulsos binarios. A continuación, se convirtió el rastro en un histograma con un ancho de caja de 0,5 ms para cada uno de los períodos en entre el período previo a la estimulación, la estimulación y después de la estimulación con ajuste de duración. A continuación, se enumeran las horas de inicio y fin de cada uno de los segmentos, así como el número de impulsos.

Tabla 1. Los tres segmentos de cada espectro de potencia se emparejaron con el tiempo. Esta tabla muestra los segmentos de cada rastro (la hora de inicio y fin en segundos), así como el número de impulsos detectados durante cada período. Los intervalos de tiempo se seleccionaron para que reflejaran los estados estacionarios antes, durante y después de la estimulación para cada rastro, para dar cuenta de los retardos temporales en el comienzo o la compensación de los efectos fisiológicos.

	<i>Antes de la estimulación</i>			<i>Luz encendida</i>			<i>Después de la estimulación</i>		
	Inicio	Fin	Impulsos	Inicio	Fin	Impulsos	Inicio	Fin	Impulsos
Fig 4 (CaMKII α ::eNpHR)	32,5	72,5	413	102,5	142,5	84	175	215	435
Fig 7 (CaMKII α ::ChR2, HFS)	5,28	10,4	238	15,38	20,5	477	22,48	27,6	235
Fig 8 (Thy1::ChR2, HFS)	0	10,62	90	14,98	25,6	0	29,38	40	94
Fig 8 (Thy1::ChR2, LFS)	0	10,62	139	14,98	25,6	383	29,38	40	132
Fig 9 (lengüeta de Thy1, HFS M1, M1)	0,8	4,8	55	15,46	19,46	28	26	30	30
Fig 9 (lengüeta de Thy1, HFS, M1, STN)	0,94	5,4	19	15	19,46	37	25,54	30	16
Fig 9 (lengüeta de Thy1, LFS M1, M1)	0	5,5	131	18,5	24	313	30,5	36	64
Fig 9 (lengüeta de Thy1, LFS M1, STN)	0	5,5	50	18,5	24	115	30,5	36	39
Fig 13 (eNpHR, unidad grande)	32,5	72,5	263	102,5	142,5	84	175	215	248
Fig 13 (eNpHR, unidad pequeña)	32,5	72,5	114	102,5	142,5	0	175	215	145

Se sometieron entonces los histogramas de impulsos a convolución con una ondícula para medir la amplitud de los espectros a frecuencias inferiores a 150 Hz en el tiempo. A continuación, se representó gráficamente la amplitud media en el tiempo para cada frecuencia. La ondícula usada se reproduce a continuación.

$$g(f, t) = e^{-t^2/2\sigma^2} e^{-2\pi i f t}$$

$$\sigma = 4/(3f).$$

5

Para determinar el cambio en la actividad de múltiples bandas de frecuencia, se calcularon los espectros de amplitud para múltiples barridos basales y de estimulación de duración equiparada como se ha descrito anteriormente. Se determinó la amplitud media de cada banda de frecuencia y la proporción de este valor (estimulación/línea basal). Las latencias de los impulsos de la respuesta de M1 a la estimulación óptica del STN se determinaron midiendo el retardo entre los primeros impulsos en registros del optrode simultáneos de M1 y STN de un ratón Thy1::ChR2-EYFP 6-OHDA. Se usó luz de 20 Hz, con 5 ms de ancho de pulso a 473 nm para activar el STN.

10

La FIG. 10 muestra la lesión de la sustancia negra y la trayectoria de la cánula. Pérdida de células dopaminérgicas de la sustancia negra después de la administración de 6-OHDA en rata (A) y ratón (B): los cortes coronales (rata: AP - 5.8; ratón AP -3) muestran la reducción de los niveles de tirosina hidroxilasa (rojo) de forma unilateral en la parte compacta de la sustancia negra; el SNC se indica entre corchetes blancos. Las inserciones de debajo muestran imágenes de mayor resolución de los lados lesionados (*izquierda*) y no lesionados (*derecha*) de la sustancia negra. (C) La trayectoria de la cánula es visible en un corte coronal que muestra la colocación correcta de la cánula por encima de la zona del STN.

15

20

La FIG. 11 muestra una caracterización histológica adicional. (A) Células del STN que expresan el marcador CaMKII α ::eNpHR-EYFP (verde) para el marcador de glutamato específico de neuronas excitadoras (rojo). (B) Las células del STN que expresan GFAP::ChR2-mCherry (rojo) se tiñen junto con el marcador específico de las astroglias S100 β (verde). En ambos (A) y (B), el color amarillo indica la colocalización de los dos marcadores. (C) Las imágenes confocales representativas de la mancha de TH para la dopamina (*arriba*) y la mancha de CHAT para la acetilcolina (*abajo*) no mostraron colocalización con la expresión de Thy1::ChR2-EYFP en el STN.

25

La FIG. 12 muestra resultados de comportamiento adicionales. (A) La iluminación continua a 473 nm del STN que expresa GFAP::ChR2-mCherry en un ratón 6-OHDA anestesiado inhibió completamente la actividad del STN. (B) y (C): Ampliación de los resultados del ratón. (B) Las rotaciones inducidas por la anfetamina no se vieron afectadas por la iluminación con un coeficiente de utilidad del 50 % del STN que expresa GFAP::ChR2 en ratones 6-OHDA (n = 1 ratón y 2 sesiones). (C) Las rotaciones inducidas por la anfetamina no se vieron afectadas por la estimulación óptica de alta frecuencia (130 Hz, 5 ms de ancho de pulso, n = 1 ratón y 2 sesiones) o de baja frecuencia (20 Hz, 5 ms, n = 1 ratón y 1 sesión) en el STN que expresa CaMKIIα::ChR2 en ratones 6-OHDA. (D) y (C): Modulación de las neuronas inhibitoras durante el comportamiento. Aunque principalmente excitadoras, el STN tiene aproximadamente 7-10 % de células que se tiñen con marcadores neuronales inhibitoras, tales como GAD65/67 y parvalbumina (Atlas cerebral de Allen). Para obtener la expresión específica bien en neuronas con GAD67 o en neuronas con parvalbumina, se inyectaron GAD67-Cre y parvalbumina-Cre respectivamente (obsequio de Sylvia Arber) con el vector del virus adeno-asociado (AAV) inducible con Cre portador de ChR2-EYFP (Métodos). Se observó la expresión de opsinas dependiente de Cre en la región del STN, pero el comportamiento se mantuvo sin cambios con la estimulación óptica. (D) Las rotaciones inducidas con anfetamina no se vieron afectadas por la estimulación óptica de alta frecuencia (130 Hz, 5 ms de ancho de pulso, n = 2 ratones y 4 sesiones) o de baja frecuencia (20 Hz, 5 ms, n = 1 ratón y 2 sesiones) en ratones 6-OHDA que expresaban GAD67-Cre. (E) Las rotaciones inducidas con anfetamina no se vieron afectadas por la estimulación óptica de alta frecuencia (130 Hz, 5 ms de ancho de pulso, n = 2 ratones y 2 sesiones) o de baja frecuencia (20 Hz, 5 ms, n = 2 ratones y 2 sesiones) en ratones 6-OHDA que expresaban parvalbumina-Cre.

La FIG. 13 muestra resultados electrofisiológicos adicionales. Aislamiento de unidades de mucha amplitud (A) y de poca amplitud (B) del rastro de la FIG. 4C y espectros de potencia correspondientes. Las líneas rojas representan formas de onda medias para todos los impulsos superpuestos que se produjeron durante los 70 s de actividad basal (n = 205 impulsos de unidad de gran amplitud y n = 428 impulsos de unidad de pequeña amplitud). Ambas unidades de mucha y poca amplitud mostraron una reducción de la actividad durante la luz que volvió a los niveles basales normales después de la estimulación. (C) Respuesta de STN a la estimulación óptica de STN en un ratón Thy1::ChR2-EYFP 6-OHDA a 90 Hz. El STN es inicialmente excitado, pero la actividad se reduce en el estado estacionario emergente medida por la pérdida de los impulsos de mucha amplitud evidentes durante la línea basal. Sin embargo, persiste actividad significativa de poca amplitud a lo largo de la estimulación. (D) Rastro de alta resolución temporal de la respuesta del STN a la estimulación óptica de STN en un ratón Thy1::ChR2 EYFP 6-OHDA a 130 Hz (véase la FIG. 5B para el rastro entero). Una vez más, el STN responde inicialmente con un impulso seguido de la actividad de poca amplitud durante toda la estimulación. Los cambios en la amplitud de las respuestas de circuitos locales pueden reflejar ya sea un número alterado de células reclutadas o la excitabilidad alterada de los elementos celulares reclutados. Aunque los registros del optrode no pueden informar sobre los tipos de células exactos que participan en la generación de actividad, mediante la eliminación de la aberración en la estimulación eléctrica, estos registros proporcionan una ventana a la amplitud y las propiedades de temporización de las respuestas eléctricas del circuito local de tipos de células excitadoras e inhibitoras locales y fibras de la región del STN que no se podría lograr con la estimulación eléctrica.

La FIG. 14 muestra los rastros de alta resolución temporal del optrode. (A) Actividad de una sola unidad en STN que expresa CaMKIIα::eNpHR-EYFP con iluminación de luz continua a 561 nm en una rata 6-OHDA anestesiada (correspondiente al rastro de la FIG. 4C). (B) Actividad neuronal en el STN que expresa CaMKIIα::ChR2-mCherry con la estimulación óptica de alta frecuencia (120 Hz, 5 ms de ancho de pulso, 473 nm) en una rata 6-OHDA anestesiada (correspondiente al rastro de la FIG. 3B). (C) y (D) Actividad en la región del STN en un ratón 6-OHDA que expresa Thy1::ChR2-EYFP anestesiado en respuesta a la estimulación óptica de alta frecuencia (HFS, 130 Hz, 5 ms) y de baja frecuencia (LFS, 20 Hz, 5 ms) usando luz a 473 nm. Cabe señalar la baja amplitud de la actividad en el rastro de HFS (correspondiente al rastro de la FIG. 5B).

La FIG. 15 muestra la latencia de la respuesta de M1 a la estimulación óptica del STN. (A) Respuesta de la Capa 5 de M1 (L5) a la estimulación óptica del STN en el ratón 6-OHDA que expresa Thy1::ChR2-EYFP a 20 Hz, 5 ms de ancho de pulso. (B) Mientras se estimulaba el STN con luz, los registros simultáneos de la actividad inducida por la luz en el STN (*rastro superior*) y M1/L5 (*rastro inferior*) revelaron pocas diferencias de latencia entre los primeros impulsos coincidentes con los impulsos antidrómicos. (C) Las diferencias individuales de latencia entre el primer impulso del STN y M1/L5 durante 16 episodios de estimulación reveló una fluctuación mínima (DT = 0,032 ms), en consonancia con los impulsos antidrómicos en la conocida proyección M1-STN.

La FIG. 16 muestra los cambios en las características de frecuencia de la actividad neuronal producida por la estimulación óptica. (A) La actividad en todas las bandas de frecuencia se redujo por la iluminación continua a 561 nm del STN que expresaba CaMKIIα::eNpHR-EYFP en ratas 6-OHDA anestesiadas (n = 5 barridos). Las bandas de frecuencia se definen como: delta 1-3 Hz; theta 4-8 Hz; alfa 9-12 Hz; beta 13-30 Hz; gamma 31-80 Hz; de alta frecuencia (HF) 81-130 Hz. (B) La HFS óptica (120 Hz, 5 ms de ancho de pulso) del STN que expresa CaMKIIα::ChR2-mCherry en ratas 6-OHDA redujo la actividad para las frecuencias de entre 4 y 80 Hz, a la vez que aumentó la actividad en la banda de HF (n = 3). (C) Cambio de actividad en M1 (*izquierda*, n = 4) y STN (*derecha*, n = 4) producido por la estimulación HFS óptica (130 Hz, 5 ms) de M1 en ratones 6-OHDA Thy1::ChR2. La actividad delta tanto en M1 como en STN se redujo. (D) Cambio de actividad en M1 (*izquierda*, n = 4) y STN (*derecha*, n = 4) producido por la estimulación LFS óptica (20 Hz, 5 ms) de M1 en ratones 6-OHDA Thy1::ChR2. La actividad Beta, gamma y HF tanto

5 en M1 como en STN se aumentó. (E) La LFS óptica (20 Hz, 5 ms) del STN en ratones 6-OHDA Thy1::Chr2 aumentó la actividad en las bandas beta, gamma y HF (n = 3). (F) Recuentos de los impulsos para segmentos de estimulación basal y óptica de duración equiparada para cada tipo de experimento. La estimulación óptica del STN que expresa CaMKII α ::GFAP-mCherry y la HFS óptica en ratones 6-OHDA Thy1::Chr2 suprimió la actividad de los impulsos, reduciendo la actividad en todas las frecuencias a cero (no mostrado). Las barras de error son el TEM.; prueba *t* con $\mu = 100$ usada para las estadísticas, **p* < 0,05.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> The Board of Trustess of the Leland Stanford Junior University
 <120> SISTEMAS, MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA ESTIMULACIÓN ÓPTICA DE CÉLULAS DIANA
 <130>AHB/FP7228752
 15 <140>
 <141> 08-04-2009
 <150> EP09735499.7
 20 <151> 08-04-2009
 <150> PCT/US2009/039949
 <151> 08-04-2009
 25 <150> US 61/047219
 <151> 23-04-2008
 <160> 3
 30 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 344
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 40 <400> 1

ES 2 701 349 T3

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
20 25 30

Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
35 40 45

Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
50 55 60

Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
65 70 75 80

Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
85 90 95

Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
100 105 110

ES 2 701 349 T3

Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Glu Ile Tyr Val Ala Thr Ile
 115 120 125

Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
 130 135 140

Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
 145 150 155 160

Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Arg Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn
 165 170 175

Leu Thr Gly Leu Ala Asn Asp Tyr Asn Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
 180 185 190

Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile Val Trp Gly Thr Thr Ala Ala Leu Ser
 195 200 205

Lys Gly Tyr Val Arg Val Ile Phe Phe Leu Met Gly Leu Cys Tyr Gly
 210 215 220

Ile Tyr Thr Phe Phe Asn Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Tyr His
 225 230 235 240

Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Asp Leu Val Arg Tyr Leu Ala Trp
 245 250 255

Leu Tyr Phe Cys Ser Trp Ala Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
 260 265 270

Pro Glu Gly Phe Gly His Ile Asn Gln Phe Asn Ser Ala Ile Ala His
 275 280 285

Ala Ile Leu Asp Leu Ala Ser Lys Asn Ala Trp Ser Met Met Gly His
 290 295 300

Phe Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
 305 310 315 320

Arg Lys Lys Gln Lys Val Asn Val Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
 325 330 335

Thr Met Val His Glu Glu Asp Asp
 340

<210> 2
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 701 349 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400>2

5

```

Met  Asp  Tyr  Gly  Gly  Ala  Leu  Ser  Ala  Val  Gly  Arg  Glu  Leu  Leu  Phe
 1      5      10      15

Val  Thr  Asn  Pro  Val  Val  Val  Asn  Gly  Ser  Val  Leu  Val  Pro  Glu  Asp
      20      25      30

Gln  Cys  Tyr  Cys  Ala  Gly  Trp  Ile  Glu  Ser  Arg  Gly  Thr  Asn  Gly  Ala
      35      40      45

Gln  Thr  Ala  Ser  Asn  Val  Leu  Gln  Trp  Leu  Ala  Ala  Gly  Phe  Ser  Ile
      50      55      60

Leu  Leu  Leu  Met  Phe  Tyr  Ala  Tyr  Gln  Thr  Trp  Lys  Ser  Thr  Cys  Gly
65      70      75      80

Trp  Glu  Glu  Ile  Tyr  Val  Cys  Ala  Ile  Glu  Met  Val  Lys  Val  Ile  Leu
      85      90      95

Glu  Phe  Phe  Phe  Glu  Phe  Lys  Asn  Pro  Ser  Met  Leu  Tyr  Leu  Ala  Thr
      100      105      110

Gly  His  Arg  Val  Gln  Trp  Leu  Arg  Tyr  Ala  Glu  Trp  Leu  Leu  Thr  Cys
      115      120      125

Pro  Val  Ile  Leu  Ile  His  Leu  Ser  Asn  Leu  Thr  Gly  Leu  Ser  Asn  Asp
      130      135      140

Tyr  Ser  Arg  Arg  Thr  Met  Gly  Leu  Leu  Val  Ser  Asp  Ile  Gly  Thr  Ile
145      150      155      160

Val  Trp  Gly  Ala  Thr  Ser  Ala  Met  Ala  Thr  Gly  Tyr  Val  Lys  Val  Ile
      165      170      175

Phe  Phe  Cys  Leu  Gly  Leu  Cys  Tyr  Gly  Ala  Asn  Thr  Phe  Phe  His  Ala
      180      185      190

Ala  Lys  Ala  Tyr  Ile  Glu  Gly  Tyr  His  Thr  Val  Pro  Lys  Gly  Arg  Cys
      195      200      205

Arg  Gln  Val  Val  Thr  Gly  Met  Ala  Trp  Leu  Phe  Phe  Val  Ser  Trp  Gly
210      215      220
    
```

ES 2 701 349 T3

Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
225 230 235 240

Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
245 250 255

Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
260 265 270

Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
275 280 285

Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
290 295 300

Glu
305

<210> 3
<211> 300
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 3

Met Asp Tyr Pro Val Ala Arg Ser Leu Ile Val Arg Tyr Pro Thr Asp
1 5 10 15

Leu Gly Asn Gly Thr Val Cys Met Pro Arg Gly Gln Cys Tyr Cys Glu
20 25 30

Gly Trp Leu Arg Ser Arg Gly Thr Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ala Ile
35 40 45

Thr Leu Gln Trp Val Val Phe Ala Leu Ser Val Ala Cys Leu Gly Trp
50 55 60

Tyr Ala Tyr Gln Ala Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val Tyr
65 70 75 80

Val Ala Leu Ile Glu Met Met Lys Ser Ile Ile Glu Ala Phe His Glu
85 90 95

Phe Asp Ser Pro Ala Thr Leu Trp Leu Ser Ser Gly Asn Gly Val Val
100 105 110

Trp Met Arg Tyr Gly Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile

5

10

ES 2 701 349 T3

115	120	125																		
His	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Asp	Asp	Tyr	Ser	Lys	Arg	Thr					
130						135					140									
Met	Gly	Leu	Leu	Val	Ser	Asp	Val	Gly	Cys	Ile	Val	Trp	Gly	Ala	Thr					
145					150					155					160					
Ser	Ala	Met	Cys	Thr	Gly	Trp	Thr	Lys	Ile	Leu	Phe	Phe	Leu	Ile	Ser					
			165						170					175						
Leu	Ser	Tyr	Gly	Met	Tyr	Thr	Tyr	Phe	His	Ala	Ala	Lys	Val	Tyr	Ile					
			180					185					190							
Glu	Ala	Phe	His	Thr	Val	Pro	Lys	Gly	Ile	Cys	Arg	Glu	Leu	Val	Arg					
		195					200					205								
Val	Met	Ala	Trp	Thr	Phe	Phe	Val	Ala	Trp	Gly	Met	Phe	Pro	Val	Leu					
	210					215					220									
Phe	Leu	Leu	Gly	Thr	Glu	Gly	Phe	Gly	His	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ser					
225					230					235					240					
Ala	Ile	Gly	His	Ser	Ile	Leu	Asp	Leu	Ile	Ala	Lys	Asn	Met	Trp	Gly					
				245					250					255						
Val	Leu	Gly	Asn	Tyr	Leu	Arg	Val	Lys	Ile	His	Glu	His	Ile	Leu	Leu					
			260					265					270							
Tyr	Gly	Asp	Ile	Arg	Lys	Lys	Gln	Lys	Ile	Thr	Ile	Ala	Gly	Gln	Glu					
		275					280					285								
Met	Glu	Val	Glu	Thr	Leu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp									
	290					295					300									

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de expresión que codifica una proteína VChR1 sensible a la luz de *Volvox carteri*, en donde dicha proteína tiene un máximo de espectro de acción de aproximadamente 535 nm y en donde dicha proteína VChR1 comprende los restos de aminoácidos S181, S183 y A256, basados en la numeración de Chr2 (SEQ ID NO:2), para su uso en un método de tratamiento optogenético de un sujeto.
- 10 2. El vector de expresión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método comprende administrar el vector a través de un dispositivo implicantable, comprendiendo el dispositivo un mecanismo de suministro de luz, y activando células diana *in vivo* con el dispositivo.
- 15 3. El vector de expresión para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el mecanismo de suministro de luz es un diodo de emisión de luz, una fibra óptica o un láser.
- 20 4. El vector de expresión para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el perfil del estímulo óptico varía mediante la longitud de onda, la intensidad o la duración.
- 25 5. El vector de expresión para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína VChR1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.
- 30 6. El vector de expresión para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el vector de expresión comprende un promotor alfa-CaMKII para expresar la proteína VChR1.
- 35 7. El vector de expresión para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un vector vírico.
8. El vector de expresión para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, que es un vector de lentivirus, un vector de retrovirus o un vector de virus adenoasociado.
9. El vector de expresión para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento optogenético se dirige a una neurona.
10. El vector de expresión para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento optogenético es tratamiento para la enfermedad de Parkinson.

FIG. 1

a

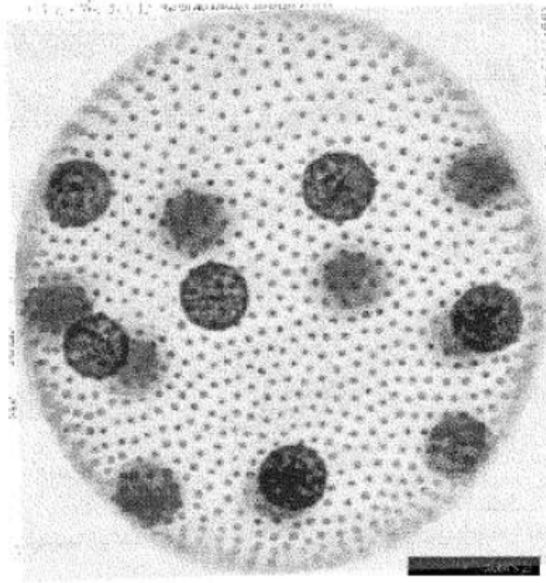
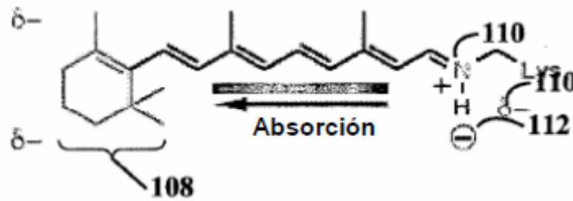


FIG. 1B



Chr2	M.....DYGG	ALSAVG....REL	14	
Chr1	MSRRPWLLAL	ALAVALAAGS	AGASTGSDAT	VPVATQDGPD	YVPHRAHERM	50
VChr1	M.....DY..PVAR	8	
Chr2	LFVTNPVVVN	.GSVLV..E	DOCYCAGWIE	SRGTNGAQT	SNVLONLAAG	61
Chr1	LFQTSYTLEN	NGSVICIPNN	QOCPCLAWLK	SNGTNAEKLA	ANILQWITFA	100
VChr1	LIVRYPTDLG	NGTVCMP..R	QOCYCEGWL	SRGTSIEKTI	AITLQWVFA	56
				TM1		
Chr2	FSILLLMFYA	YQTKWKSTCGW	EEIYVCAIEM	VKVILEFFFE	FKNPSMLYLA	111
Chr1	LSALCLMFYG	YQTKWKSTCGW	EEIYVATIEEM	IKFIIIEYFHE	FDEPAVIYSS	150
VChr1	LSVACLGWYA	YOAWRATCGW	EEVYVALIEM	MKSIIIEAFHE	FDSPATLWLS	106
				TM2		
		102	104	104		
Chr2	TGHRVQWLRY	AEWLLTCPVI	LIHLSNLTGL	SNDYSRRTMG	LLVSDIGTIV	161
Chr1	NGNKTVWLRY	AEWLLTCRVI	LIHLSNLTGL	ANDYKRTMG	LLVSDIGTIV	200
VChr1	SGNGVVMWRY	GEWLLTCPVL	LIHLSNLTGL	KDDYSKRTMG	LLVSDVGCIV	156
				TM3	TM4	
			106			
Chr2	WGATSAMATG	YVKVIFECIG	LCYGANTFFH	AAKAYIEGYH	TVPKGRGROV	211
Chr1	WGTTAALSKG	YVRVIFFLMG	LCYGIYTFEN	AAKVYIEAYH	TVPKGICRDL	250
VChr1	WGATSAMCTG	WTKILFFLIS	LSYGMYYTFH	AAKVYIEAFH	TVPKGICREL	206
				TM5		
			102	102	104	106
Chr2	VTGMAWLFFV	SWGMEPILFI	LGPEGFVLS	VYGSTVGHIT	IDLMSKNCWG	261
Chr1	VRYLAWLYEC	SWAMFPVLF	LGPEGFHIN	QFNBAIAHAI	LDLAKNNAWS	300
VChr1	VRVMAWTFV	AWGMEPVLFL	LGTEGFHIS	PYGSAIGHSI	LDLIAKNMWG	256
				TM6	TM7	
Chr2	LLGHYLRVLI	HEHILIHGDI	RKTKLNIIG	TEIEVETLVE	DEAE	311
Chr1	MMGHFLRVKI	HEHILLYGDI	RKKQKVNAG	QEMEVEVMVH	EEDD	350
VChr1	VLGNYLRVKI	HEHILLYGDI	RKKOKITAG	QEMEVEVLVA	EEDD	306

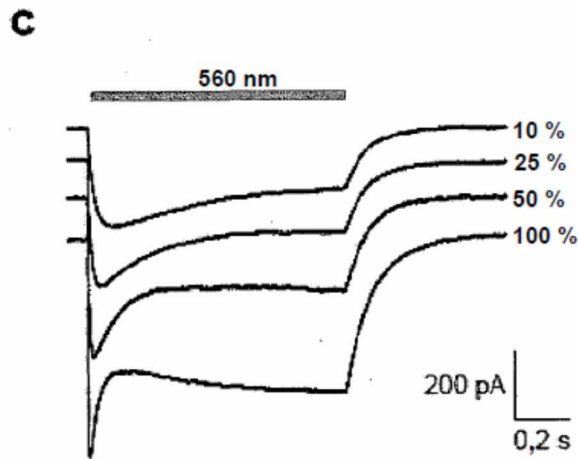
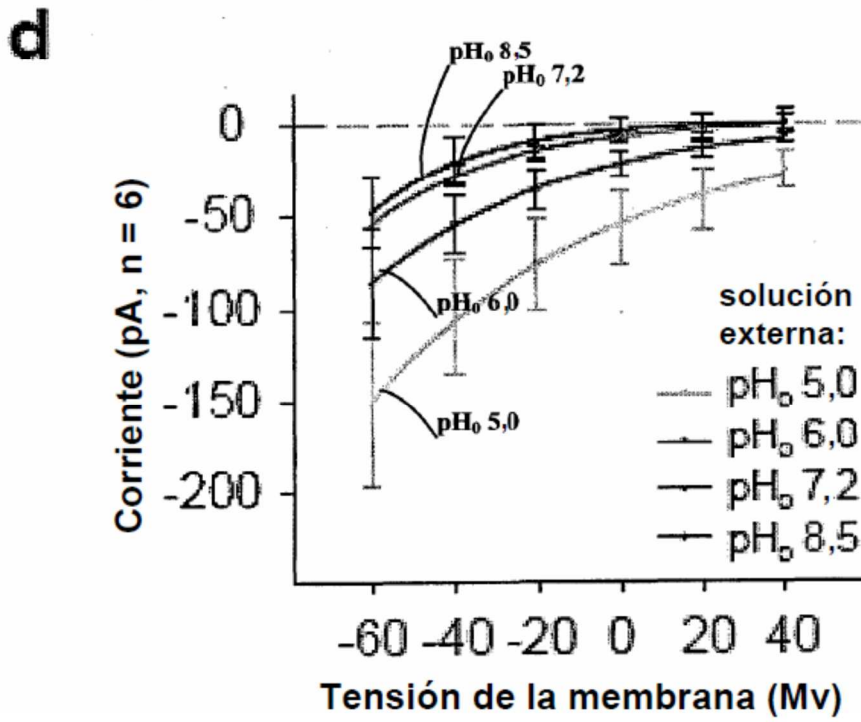


FIG. 1



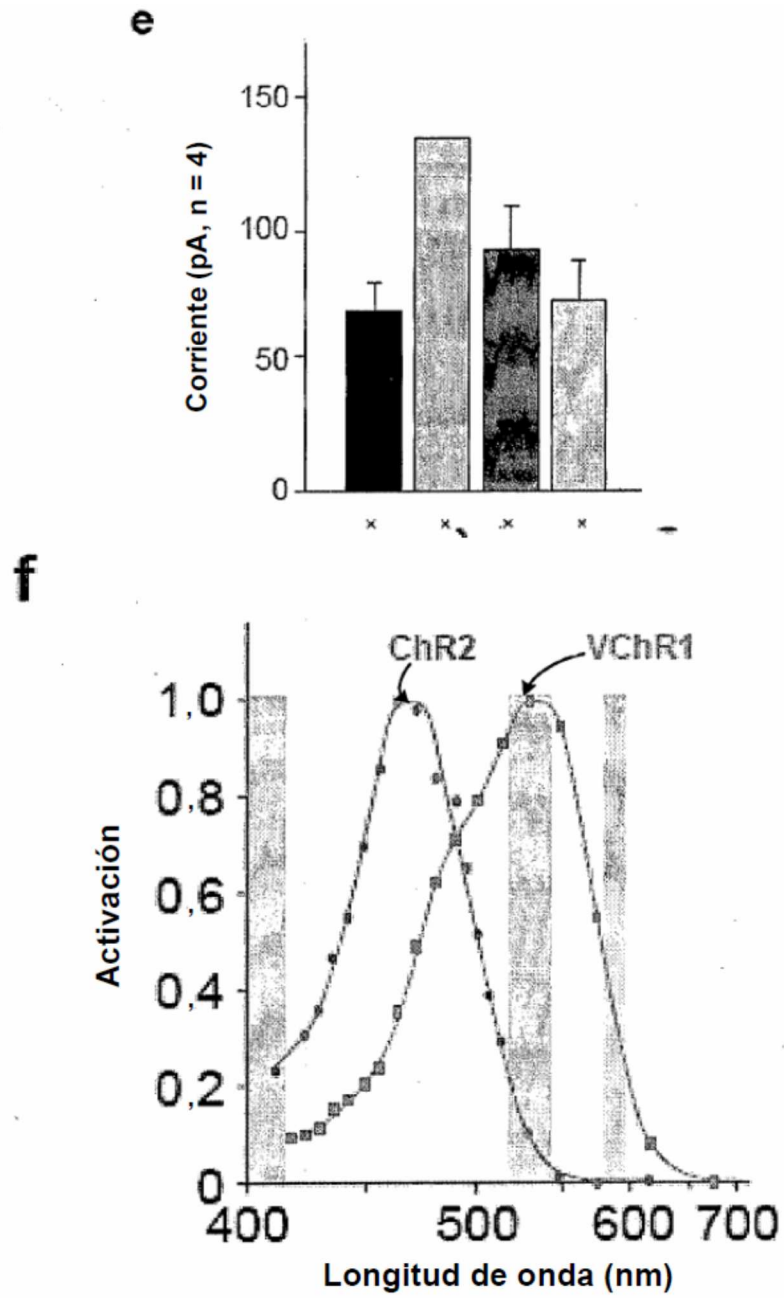


FIG. 1

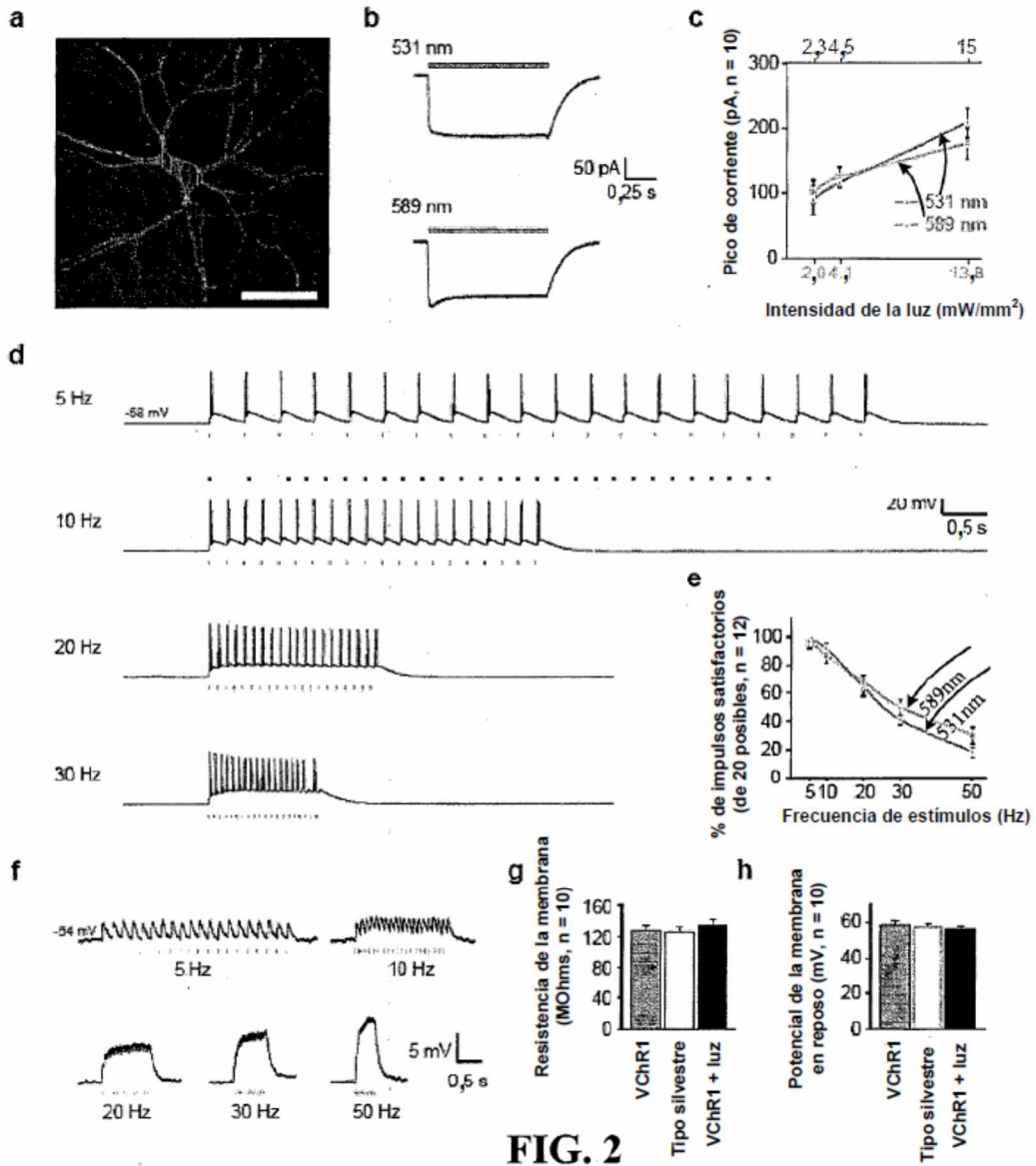


FIG. 2

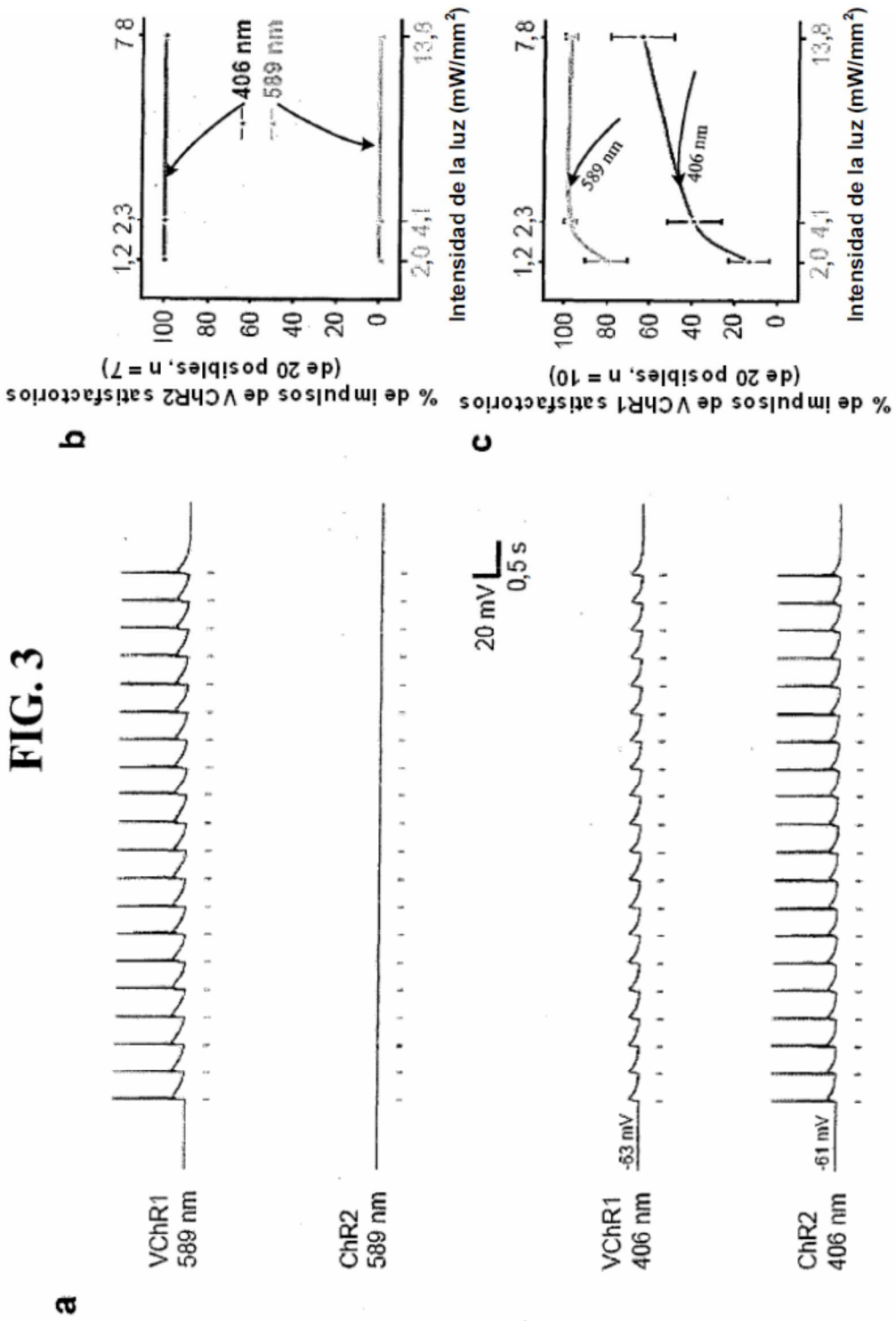


Figura 4

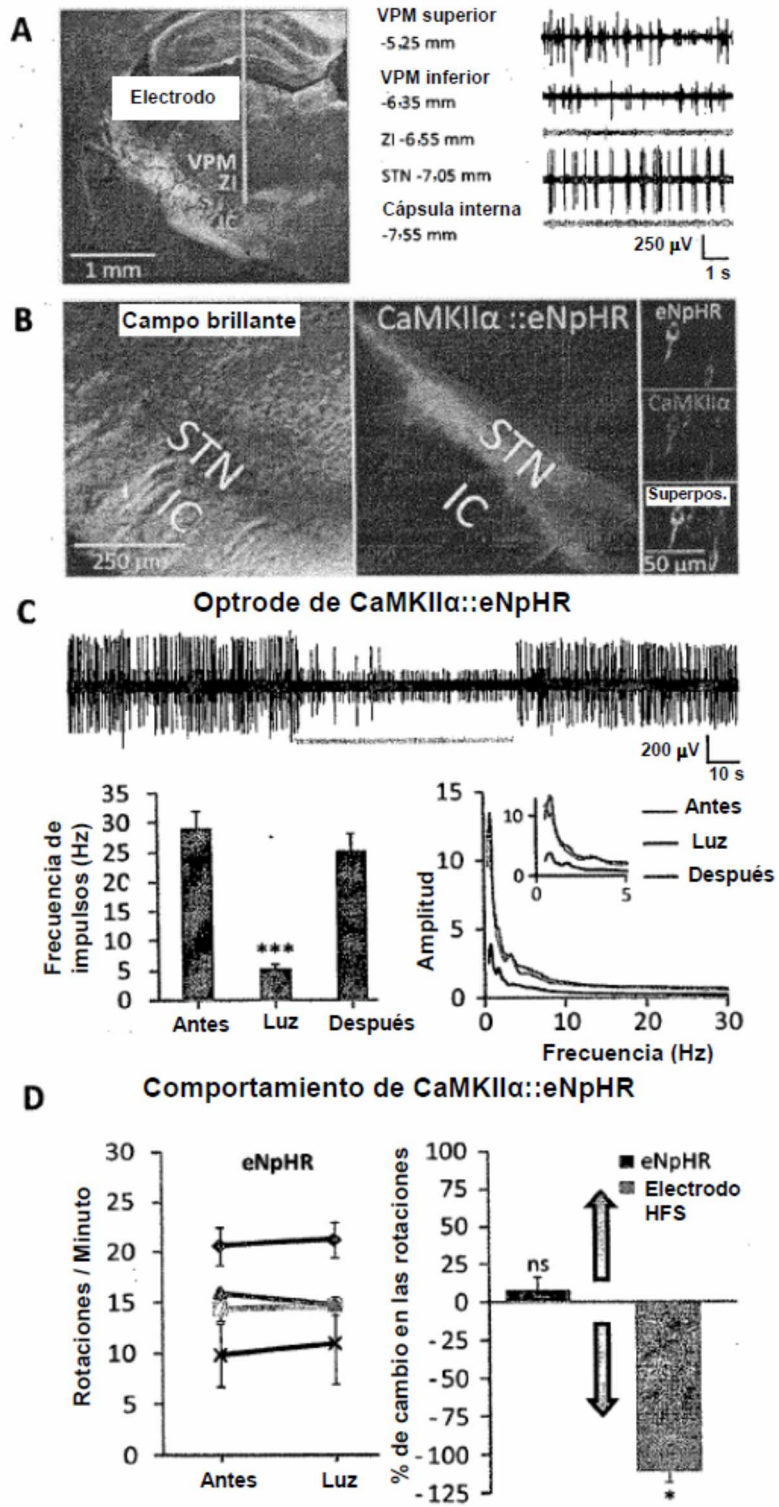


Figura 5

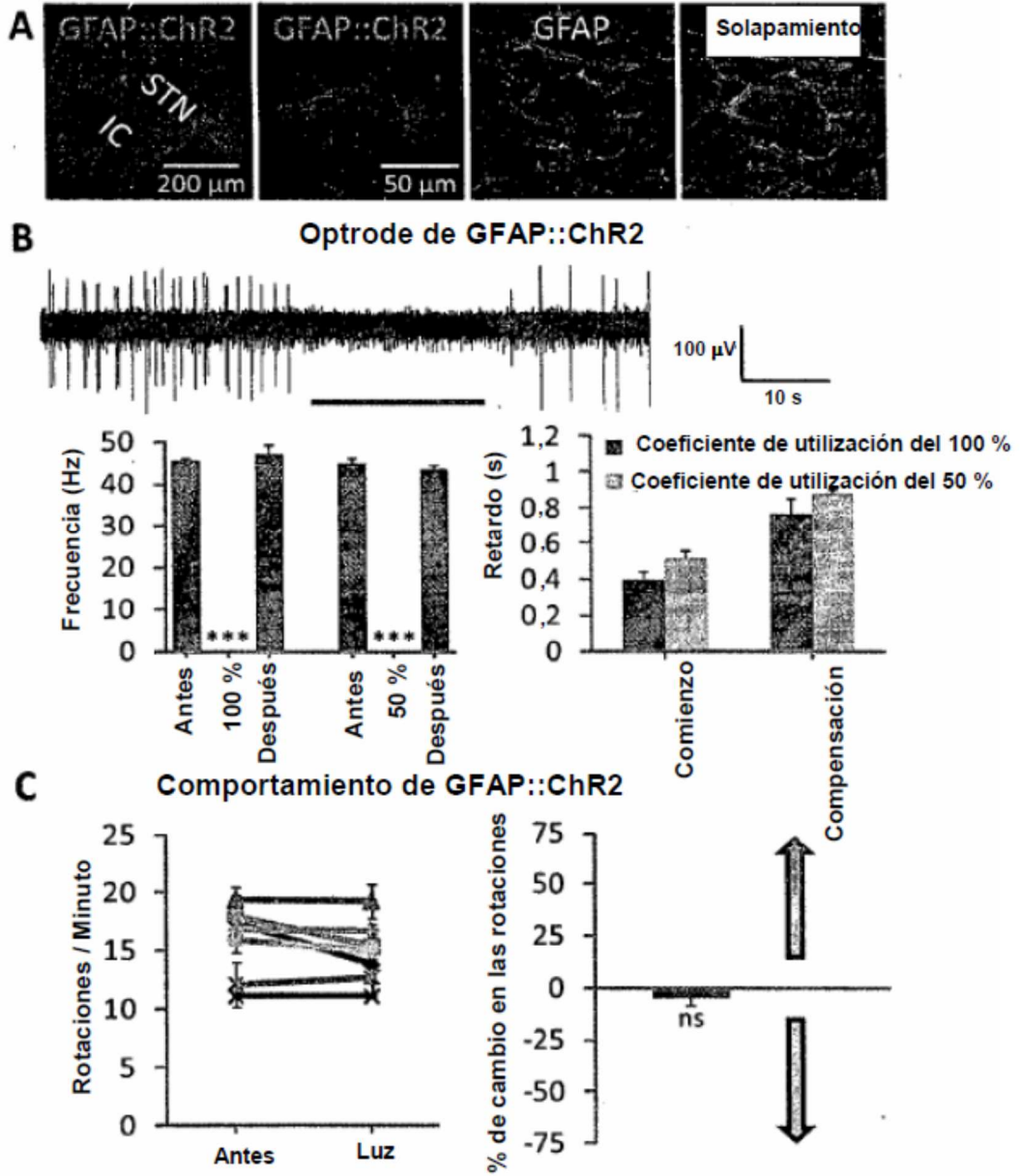


Figura 6

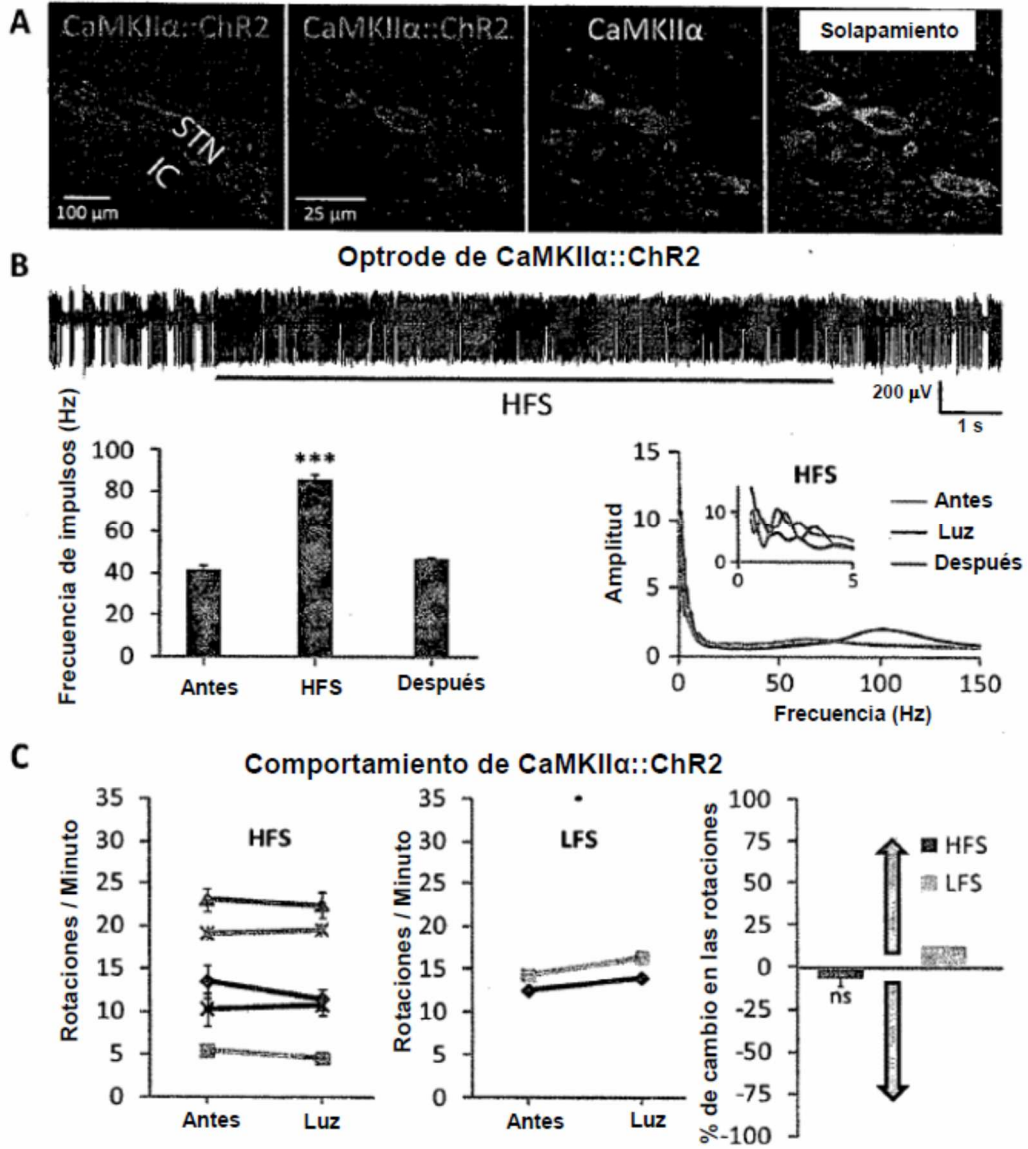


Figura 7

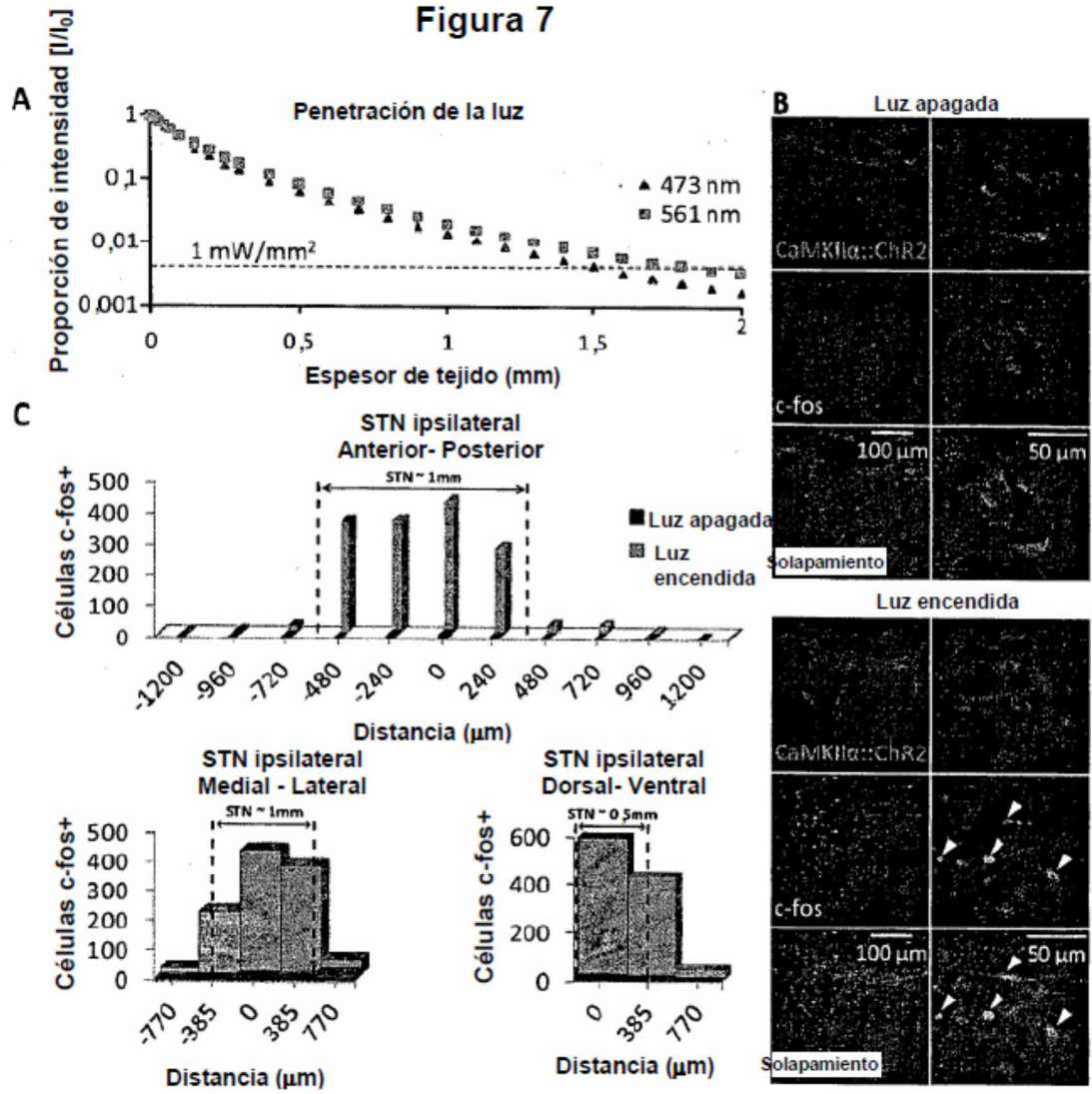


Figura 8

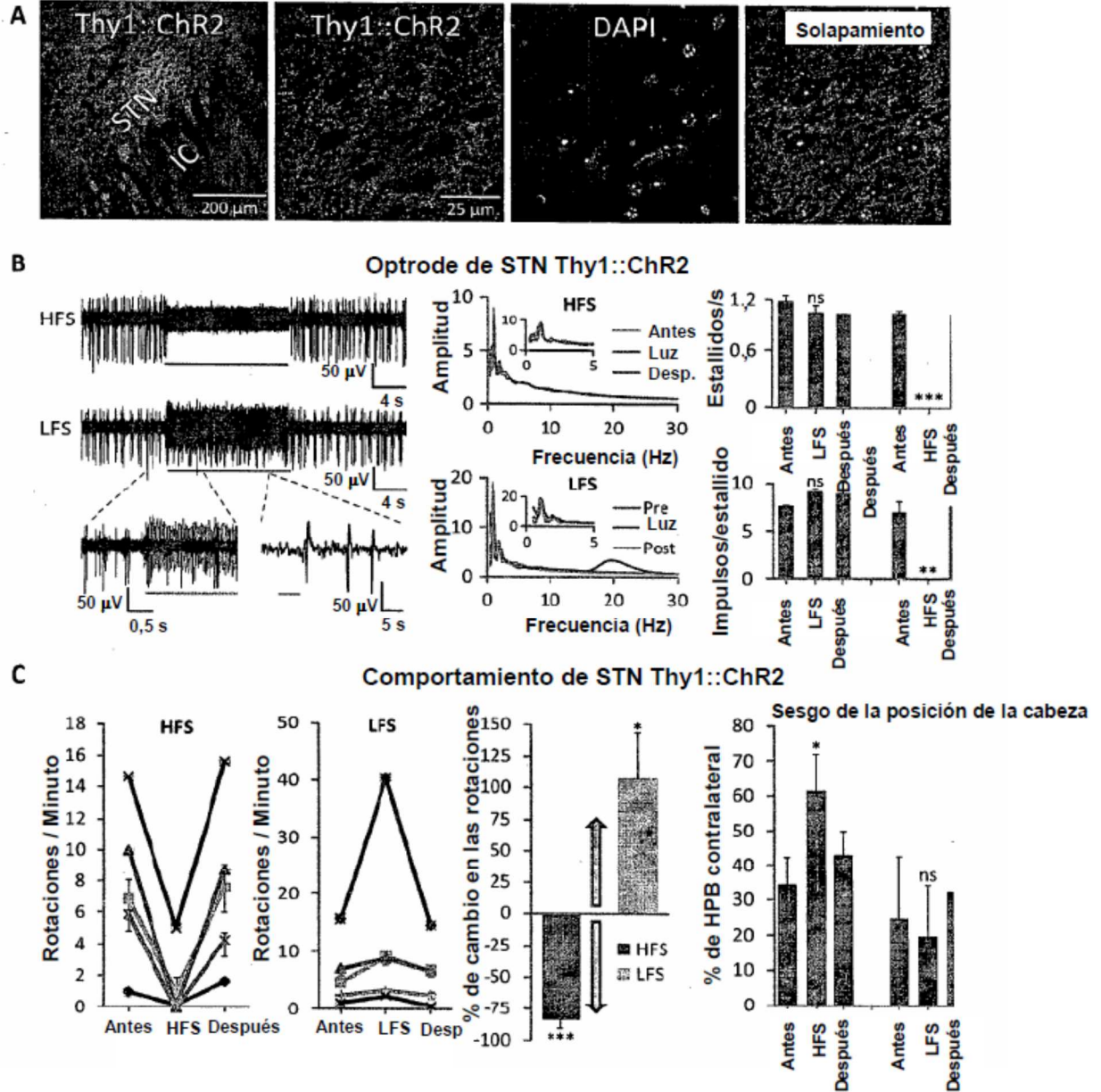


Figura 9

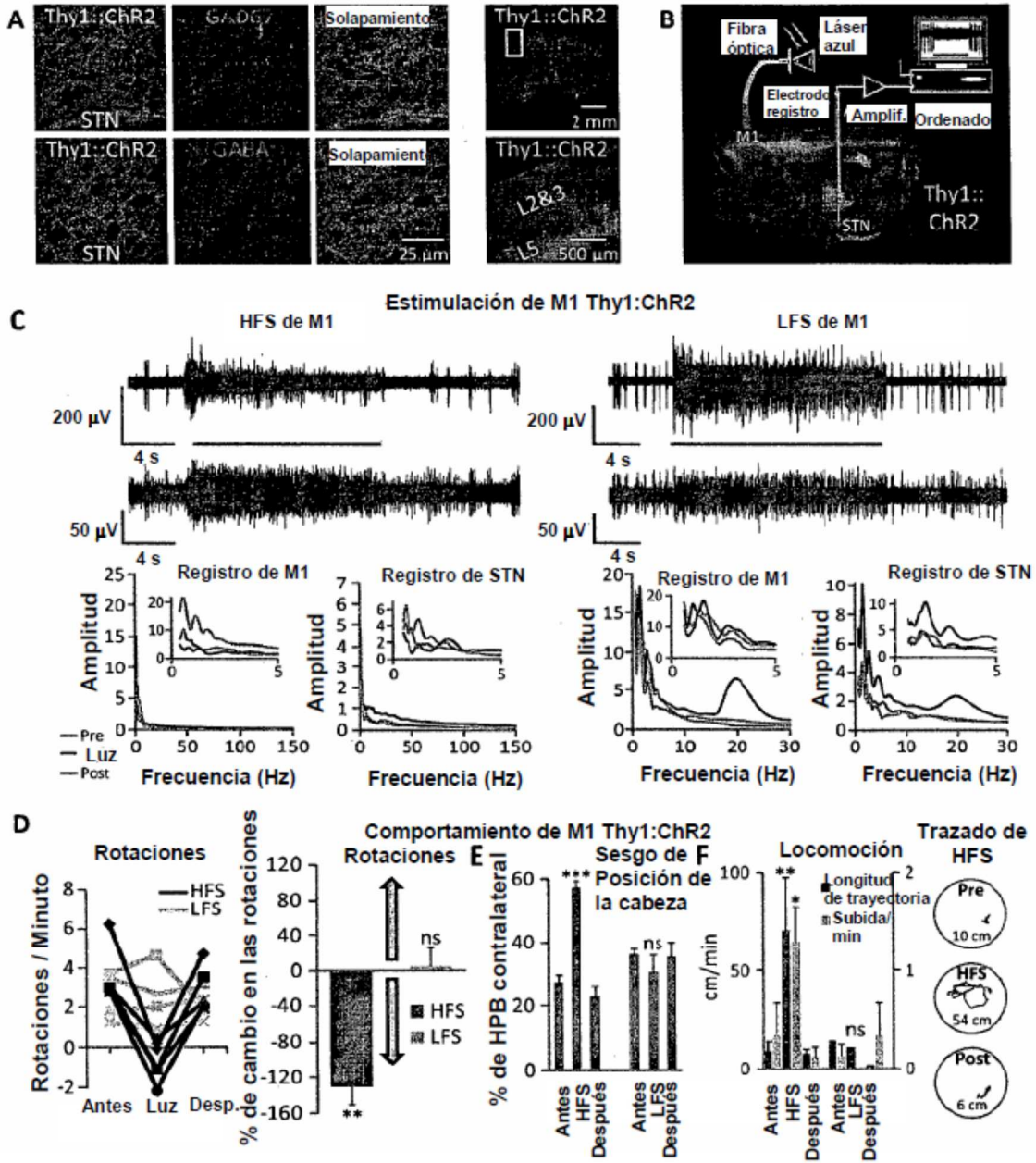


Figura 10

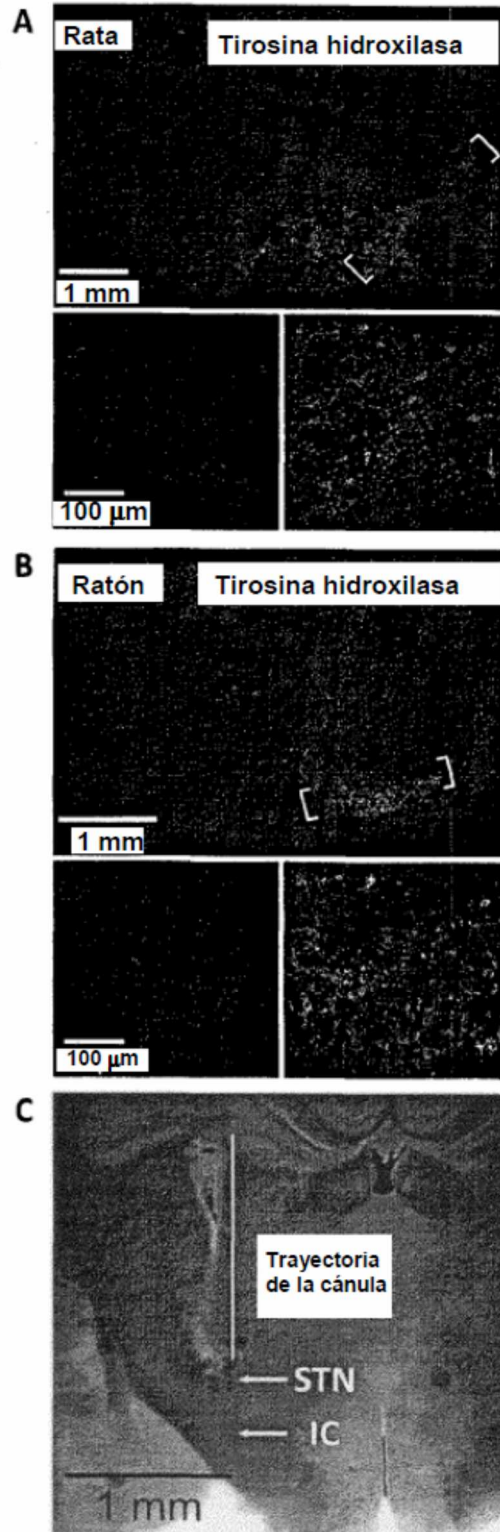


Figura 11

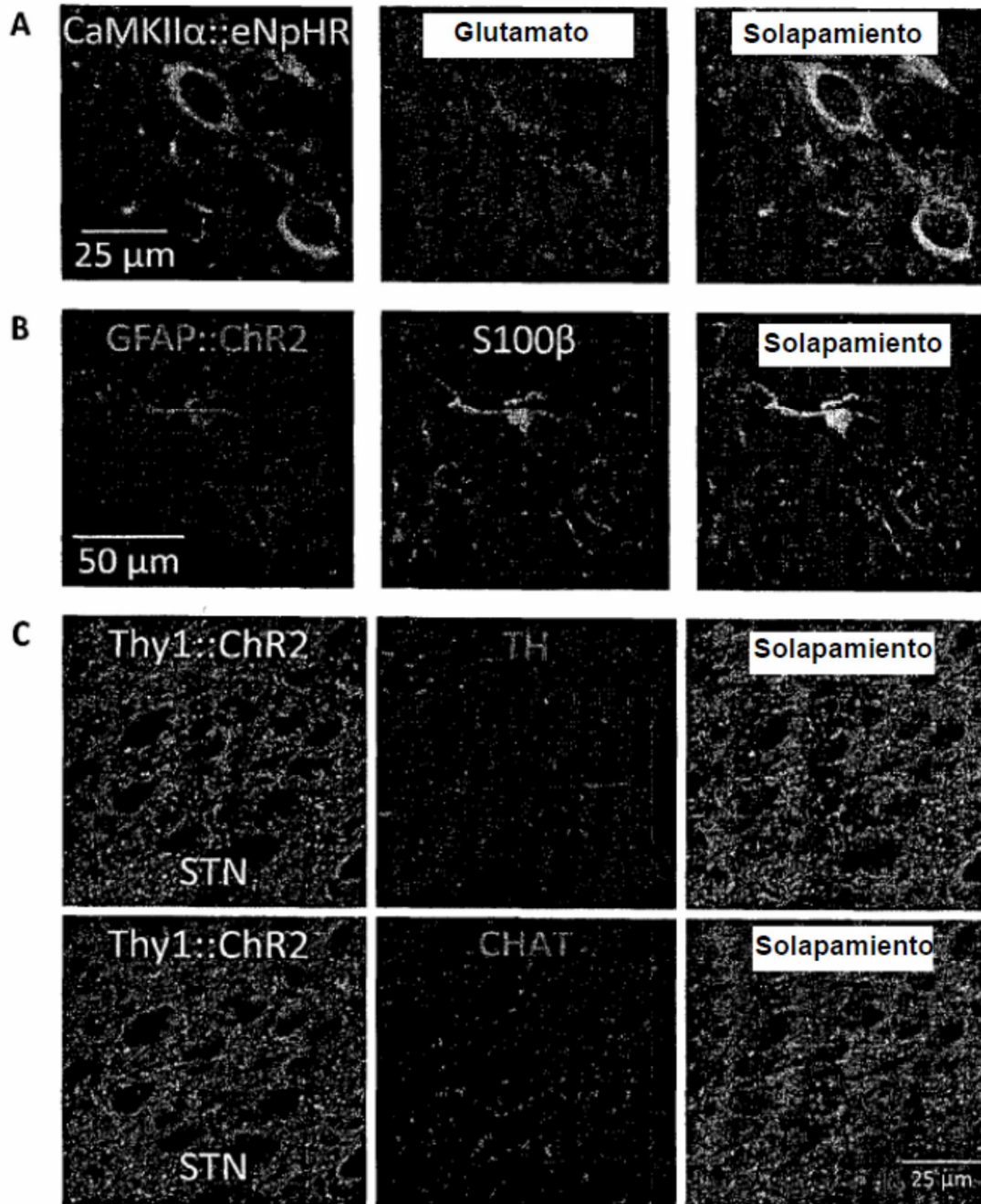


Figura 12

Optrode de ratón GFAP::ChR2

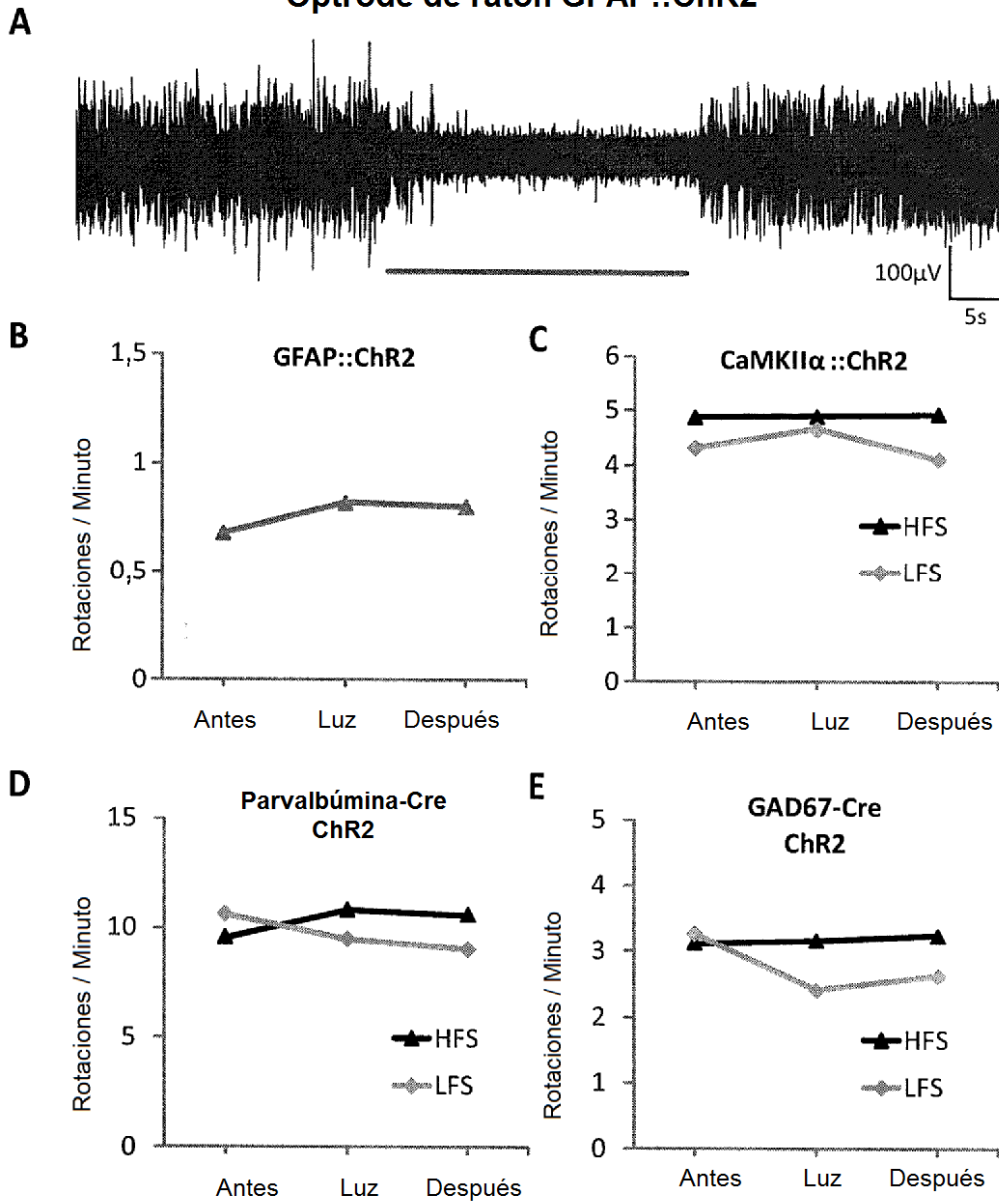


Figura 13

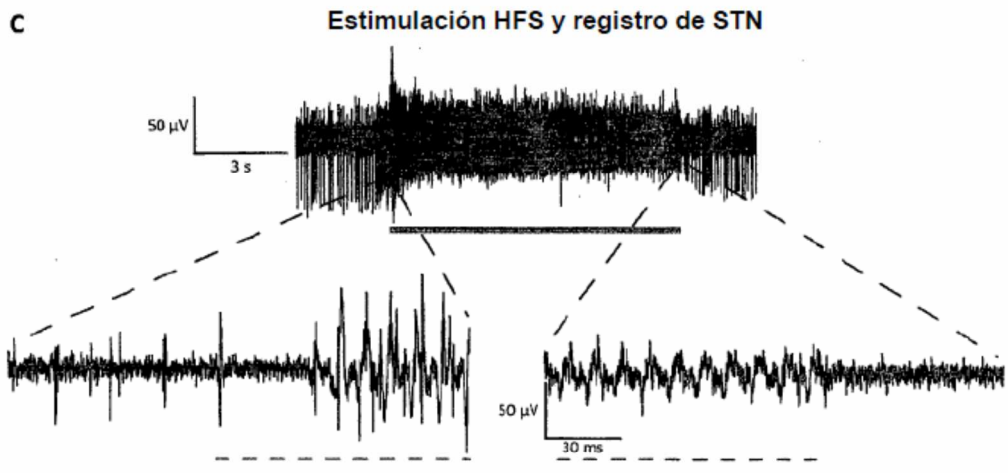
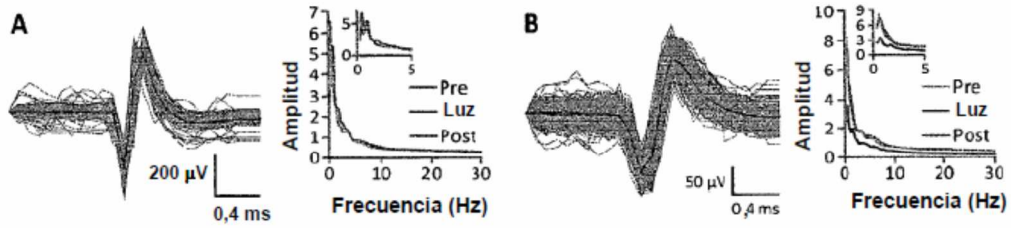


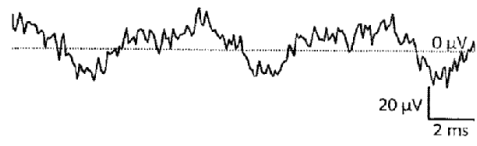
Figura 14

Rastros de alta resolución temporal

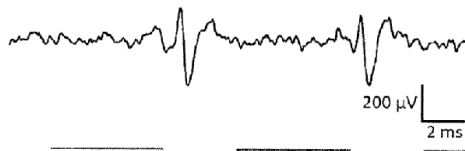
A Estimulación de eNpHR en STN (Fig. 1C)



C Estimulación HFS de Thy1 en STN (Fig. 5B)



B Estimulación HFS de Chr2 en STN (Fig. 3B)



D Estimulación LFS de Thy1 en STN (Fig. 5B)



Figura 15

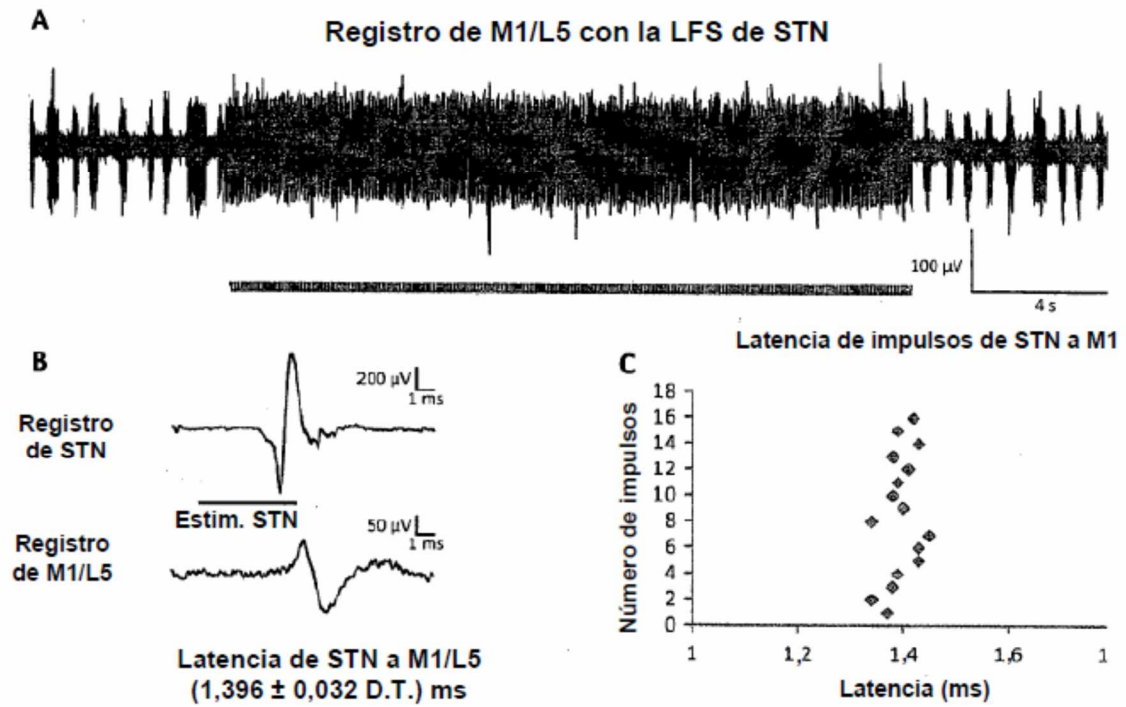


Figura 16

