

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
DIPARTIMENTO DI  
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE  
“GUGLIELMO MARCONI”

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELL'ELABORATO  
APPROCCI BIOMEDICI OTTICI PER LA STIMOLAZIONE ED IL  
MONITORAGGIO DELL'ATTIVITÀ CEREBRALE

Elaborato in  
Fisiologia

Relatrice  
Benfenati Valentina

Presentato da  
Altieri Fabiano

Anno accademico 2018-2019

# Sommario

---

<b>Abstract</b> .....	3
<b>CAPITOLO 1</b> .....	7
<b>Introduzione</b> .....	7
<i>La luce</i> .....	7
<i>L'interazione della luce con la materia vivente</i> .....	9
<b>CAPITOLO 2</b> .....	14
<b>Scopo della Ricerca: La luce e lo studio del cervello</b> .....	14
<b>CAPITOLO 3</b> .....	15
<b>I neuroni ed il loro principi funzionali</b> .....	15
<i>Organizzazione del Sistema Nervoso</i> .....	15
<b>CAPITOLO 4</b> .....	21
<b>Approcci e tecnologie fotoniche per lo studio delle cellule cerebrali</b> ..	21
<i>Laser</i> .....	21
<i>Fibra ottica</i> .....	23
<i>Molecole Esogene Fotosensibili</i> .....	24
<i>Optogenetica</i> .....	38
<i>Radiazione Infrarossa</i> .....	62
<b>Conclusione</b> .....	92
<b>Bibliografia</b> .....	96

# Abstract

---

L'utilizzo della luce per lo studio del cervello ha principalmente riguardato lo sviluppo di tecniche di imaging; ma, negli ultimi anni, la fotonica ed i suoi principi sono state utilizzati per manipolare, stimolare e studiare l'attività di cellule cerebrali.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di passare in rassegna in modo critico e più recenti risultati ottenuti nella modulazione ed attivazione di attività di cellule neurali attraverso tecniche che prevedono l'utilizzo della luce.

Generalmente, la stimolazione ed il monitoraggio consentono lo studio delle attività neurali che sono alla base dei controlli omeostatici fisiologici, della memoria e di tutti i comportamenti animali, quali aggressività, sonno e fame [1].

Si tratta di tecniche che in un futuro non molto lontano, potenzialmente, potrebbero sostituire o, combinandosi, migliorare quelle attuali, che si basano prevalentemente su fenomeni magnetici, come la risonanza magnetica MRI, su fenomeni acustici, come l'ecografia e su fenomeni elettrici, come la stimolazione transcranica a corrente diretta (tDCS) e l'elettroencefalogramma (EEG).

Inoltre, il presente studio ritiene che la stimolazione ottica possa diventare una valida alternativa alla stimolazione elettrica, anche perché il progresso di quest'ultima, nonostante abbia suscitato molto ottimismo nello sviluppo di interfacce brain-computer (BCIs), è ostacolato da difficoltà che difficilmente possono essere superate.

Innanzitutto, il cervello è una struttura tridimensionale, perciò, per raggiungere gli strati più profondi, sono necessari inserimenti di oggetti esterni, gli elettrodi appunto, piuttosto densi ed è ben noto che questi possono innescare risposte infiammatorie.

Gli elettrodi, poi, non sono in grado di stimolare neuroni specifici in una regione popolata da diversi tipi di neuroni ed altre cellule non nervose, come gli astrociti; infine, maggiore è l'intensità dello

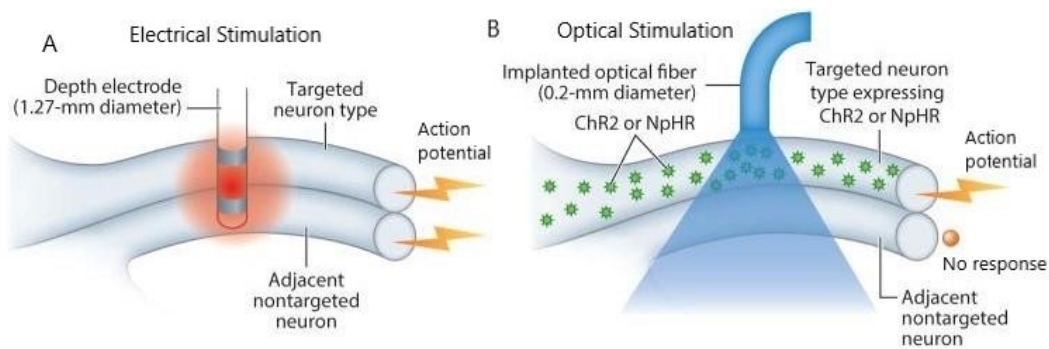


Figura 1

Journal of Neural Engineering - An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology

stimolo elettrico, maggiori sono i rischi di effetti indesiderati presso le cellule circostanti agli elettrodi [2] [3], perché quest'ultimi diffondono correnti in tutte le direzioni (Figura 1)Figura 1, riducendone drasticamente la risoluzione spaziale e, quindi, la qualità della risposta neurale.

Di contro, sfortunatamente, la maggior parte degli approcci basati sulla neurostimolazione ottica non ha, attualmente, la capacità di innescare o di inibire attività elettriche a frequenze superiori a 400 Hz, mentre quella elettrica è in grado di farlo anche oltre i 900 Hz, frequenze massime per cui i neuroni propagano APs consecutivamente.

Per esempio, lo studio [4] ha confrontato le risposte neurali a fronte di stimolazioni ottiche ed elettriche sui neuroni delle vie uditive di topi e ha rilevato che le prime, mediate da una serie di microlaser distribuiti in 3 aree del canale di Rosenthal, evidenziano prestazioni migliori in termini di risposta neurale, rispetto a quelle delle stimolazioni elettriche.

La stimolazione ottica, sfruttando i principi dei fotoni, offre la massima precisione in termini temporali e spaziali, in maniera meno invasiva rispetto a quella elettrica: in tal modo, è possibile focalizzare la stimolazione su strutture subcellulari, singole cellule o su più cellule simultaneamente, allo scopo di indagare quelle reti neurali che sono alla base di un determinato comportamento.

Il campo di ricerca delle neuroscienze, fin dagli albori delle prime scoperte che hanno portato alla comprensione di numerosi funzionamenti cerebrali, ha compreso le potenzialità della stimolazione ottica.

Infatti, già nel 1891, Arsonval [5] aveva osservato che la stimolazione ottica dei neuroni poteva avere luogo, mentre Arvanitaki e Chalazonitis [5] negli anni '60 dimostrarono che l'eccitazione e l'inibizione sono fortemente dipendenti da parametri ottici della radiazione, come la lunghezza d'onda e l'intensità; tuttavia, a quell'epoca, per motivi tecnici, non si era ancora in grado di manipolare questi parametri tanto cruciali per la neurostimolazione, che rimasero poco approfonditi fino agli enormi progressi tecnologici che permisero l'esplosione del successo di un nuovo approccio di studio.

L'avvento dei laser negli anni '70, poi, ha contribuito enormemente al successo delle neuroscienze, come mostrato dalla brevettazione di tale tecnica [6] e dai risultati di numerosi studi. Per esempio, lo studio [7] ha mostrato come la stimolazione ottica mediata dal laser stesso, agisca direttamente sulle cellule nervose nel mollusco *Aplysia*.

Si è dovuto, infine, attendere gli inizi degli anni '90 [8], con lo sviluppo della microelettronica e dell'optoelettronica e con le maggiori conoscenze conquistate nella biologia, per ottenere dispositivi e tecniche più economiche, versatili e soprattutto realizzabili.

Le tecniche di stimolazione o modulazione mediante luce più importanti sono: [9] [10] [11]: l'optogenetica, l'uso di molecole ingegnerizzate fotoattive [12] e l'uso della radiazione infrarossa.

La scelta della tecnica dipende primariamente dallo scopo dello studio che si vuole effettuare, perché ogni strumento ha i suoi vantaggi e le sue limitazioni [13].

L'optogenetica consiste nell'indurre modifiche genetiche in specifici neuroni tramite microiniezioni di vettori virali contenenti transgeni, i quali, una volta integrati nel genoma dei neuroni, andranno ad esprimere proteine fotosensibili.

La tecnica che utilizza molecole fotoattive consiste principalmente nell'iniettare neurotrasmettitori legati a molecole che li rendono attivi solo sottoesposizione luminosa.

La radiazione infrarossa, che attraverso protocolli di stimolazione a differenti frequenze è in grado di indurre depolarizzazioni o iperpolarizzazioni neuronali senza la necessità di modificare geneticamente o chimicamente le cellule, ma sfruttando il surriscaldamento transiente che avviene a livello della membrana cellulare [14].

Concludendo gli approcci descritti mostrano come la luce possa essere un metodo fisico innovativo non soltanto per l'imaging del cervello ma anche per la sua modulazione con elevata risoluzione spaziale e temporale, efficacia e versatilità e sicurezza. Tuttavia, l'assorbimento della luce può causare effetti di fotodanneggiamento o modulazione incontrollata delle cellule. D'altra parte, gli strumenti tecnologici che possano consentire di rilasciare la luce ai tessuti nervosi in modo controllato e guidato sono ancora limitati.

In questo senso, approcci ibridi di fotonica ed elettronica sono in fase di studio [15].

# CAPITOLO 1

---

## Introduzione

### La luce

In fisica la luce è la radiazione elettromagnetica (EM), ovvero la radiazione dell'energia nel campo elettromagnetico; essa esibisce proprietà caratteristiche sia delle onde che delle particelle, un concetto conosciuto come *dualismo onda-particella*.

Nel primo caso, la natura ondulatoria della luce consiste in un'onda composta di un campo elettrico e, perpendicolarmente a quest'ultimo, di un campo magnetico, entrambi oscillanti in fase nella direzione di propagazione. Questo comportamento è descrivibile attraverso le espressioni matematiche delle equazioni di Maxwell [16]. Se si considera la luce come onda, possono essere spiegati diversi fenomeni tipici delle onde come l'interferenza e l'indice di rifrazione.

Nel secondo caso, la natura corpuscolare della luce consiste di pacchetti di energia, o quanti, denominati anche come fotoni; questi, se posti nel vuoto, viaggiano alla velocità della luce stessa, velocità che nessun'altra particella dotata di massa può superare. Tale modello-particella può, invece, spiegare quei fenomeni tipici delle particelle, quali l'assorbimento e lo spettro ottico dell'emissione da parte degli atomi o molecole (noto come spettroscopia).

Inoltre, secondo il Modello Standard, il fotone è la particella associata all'interazione elettromagnetica, una delle quattro interazioni fondamentali che compongono la natura.

L'interazione della radiazione EM con la materia dipende fortemente dalla sua lunghezza d'onda, cui sono legate la frequenza<sup>1</sup> e l'energia<sup>2</sup> [17], nonché il profilo dell'impulso ottico sia nel senso spaziale che temporale: per esempio basse  $\lambda$  corrispondono ad alte frequenze e, di conseguenza, alte energie, che, se eccessive, possono distruggere i

---

<sup>1</sup>  $v = \frac{c}{\lambda}$   
<sup>2</sup>  $E = h\nu$

$\nu$ = frequenza [Hz]  
 $E$ = energia per fotone [J]

$c$ = velocità della luce nel vuoto = 299 792 458 m/s  
 $h$ = costante di Planck= 6.626 070 15E10<sup>-34</sup>J·s

tessuti biologici. Infatti, quando la luce incontra un mezzo assorbente, essa può perturbarlo in diversi modi: può rompere legami molecolari, comportarsi da catalizzatore per accelerare reazioni chimiche o creare onde d'urto/di pressione che attraversano i tessuti [16] [18] [19].



## L'interazione della luce con la materia vivente

I fenomeni in base ai quali la propagazione del fascio di luce varia quando esso attraversa una porzione di materia sono la riflessione, la rifrazione, l'assorbimento e lo scattering.

In ambito biomedicale, i primi due fenomeni sono piuttosto trascurabili e difficilmente calcolabili, in quanto i tessuti umani, ad eccezione quelli della cornea, sono opachi; la disomogeneità dei tessuti biologici, infatti, è la maggiore limitazione che rende complessa la scelta dei parametri.

Nell'ambito di uno studio che comporta l'uso dei laser, la lunghezza d'onda della luce è il principale parametro di riferimento, perché è proprio quello che determina i più evidenti effetti sui tessuti e da cui conseguono l'indice di rifrazione, il coefficiente d'estinzione, di assorbimento e di scattering.

### Riflessione e rifrazione

Se il fascio della radiazione EM è orientato di un certo angolo  $\theta_i$  (angolo di incidenza) rispetto alla normale della superficie, il fascio sarà riflesso di un angolo  $\theta'$  (angolo di riflessione), che è uguale a  $\theta$  per l'impatto con la superficie stessa; tale fenomeno è definito *riflessione*.

Si ha, invece, *riflessione totale* se  $\theta_i$  supera l'angolo limite<sup>3</sup>, situazione che si verifica quando la luce passa da un mezzo con indice di rifrazione maggiore ad uno con indice di rifrazione minore.

I vettori di entrambi i fasci e la normale della superficie giacciono sullo stesso piano, chiamato come piano di incidenza. La relazione  $\theta_i = \theta'$  (Figura 2) è valida solo se si assume che la superficie sia liscia (riflessione speculare), ovvero che la dimensione della rugosità sia trascurabile rispetto alla lunghezza d'onda; in caso

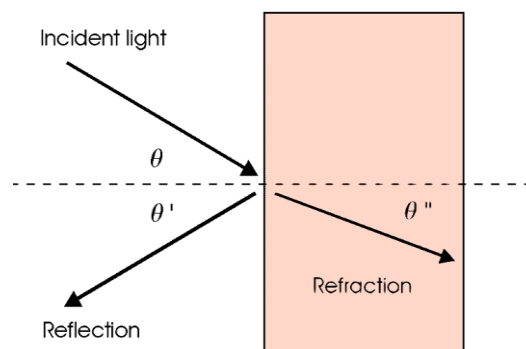


Figura 2

Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications

<sup>3</sup> Il valore massimo dell'angolo di rifrazione è  $90^\circ$ ; perciò, dalla legge di Snell si ha che l'angolo limite è  $\theta_l = \sin^{-1}(n_2/n_1)$ . Di conseguenza  $n_2 < n_1$

contrario, allora prevale la riflessione diffusa, che è chiaramente caratteristica di tutti i tessuti.

La *rifrazione*, invece, si ottiene quando la velocità della luce cambia al variare del materiale del mezzo di propagazione. La relazione matematica che descrive la rifrazione è conosciuta come la *legge di Snell* (Figura 2)

$$\frac{\sin \theta_i}{\sin \theta_r} = \frac{v_1}{v_2}$$

Dove  $v_1$  e  $v_2$  corrispondono alle velocità della luce nei due mezzi, rispettivamente prima e dopo la superficie riflettente;  $\theta_r$  è l'angolo rifrazione ( $\theta''$  in Figura 2)

Dall'indice di rifrazione di un certo materiale  $n = c/v$  si ottiene:

$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_r$$

La rifrazione e la riflessione sono fortemente legate tra loro attraverso le *leggi di Fresnel*.

### Assorbimento

In linea di principio, l'*assorbimento* ha luogo quando particelle cariche, come gli elettroni, vengono esposte al campo elettrico oscillante delle onde EM la cui frequenza è in risonanza<sup>4</sup> con quella della particella; quindi, essa acquisisce una energia quantizzata tale da passare ad un livello energetico superiore, impiegando circa 1 fs. Dopodiché, l'elettrone eccitato ritorna al livello energetico inferiore, rilasciando un fotone, in circa 1 ps.

L'assorbanza del mezzo è definita come il rapporto tra l'intensità assorbita ed intensità incidente: se più fotoni vengono assorbiti, l'intensità del fascio elettromagnetico si attenua sempre più attraverso il mezzo. La probabilità che il fotone venga assorbito è, poi, quantificata dal coefficiente di estinzione ( $\epsilon$  – unità di misura:  $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) di una molecola. Maggiore sarà  $\epsilon$ , maggiore sarà la probabilità che un fotone venga assorbito.

Chiaramente, la capacità di un mezzo di assorbire la radiazione EM dipende da una serie di fattori: primariamente, dalla costituzione

---

<sup>4</sup> La risonanza si verifica quando il gap di energia elettronica (differenza del livello di energia tra lo stato fondamentale e lo stato eccitato dell'elettrone) è uguale all'energia associata al fotone. In altre parole, quando si verifica che la frequenza dell'onda elettromagnetica uguaglia la frequenza naturale della particella colpita dal fotone stesso.

elettronica dei suoi atomi e delle sue molecole<sup>5</sup> e, quindi, dalla loro concentrazione, dalla lunghezza d'onda della radiazione stessa, dallo spessore dello strato assorbente e, infine, da parametri interni come la temperatura.

Due sono le leggi che misurano l'effettivo assorbimento della luce da

parte della materia e, quindi, del tessuto esposto alla luce: la *legge di Lambert* e la *legge di Beer*.

$$I(z) = I_0 \exp(-\mu_a z) \quad I(z) = I_0 \exp(-k' cz)$$

dove  $I(z)$  indica l'intensità alla distanza  $z$  indicante l'asse ottico,  $\mu_a$  è il coefficiente di assorbimento del mezzo,  $c$  è la concentrazione degli agenti assorbenti e  $k'$  è la variabile che dipende da parametri interni.

L'inverso del coefficiente di assorbimento corrisponde alla profondità di penetrazione ottica  $\delta_a = 1/\mu_a$ ; va detto che questa relazione non è affetto dallo scattering, il quale in realtà riduce maggiormente la profondità.

Poiché i tessuti sono composti da numerose e svariate molecole, come l'acqua, le proteine ed i pigmenti, ciascuna di esse assorbe i fotoni in maniera differente a seconda della lunghezza d'onda dei fotoni stessi.

Per esempio, l'acqua presenta dei picchi di assorbimento sparsi irregolarmente soprattutto tra le lunghezze d'onda dell'infrarosso. [20] (Figura 3).

### Scattering

Nel caso in cui la frequenza dell'onda EM incidente non sia in risonanza con quella della particella, quest'ultima assorbe, comunque, l'energia del fotone, ma la riemette in una direzione e con un'intensità differente. Ciò fa sì che i fotoni incidenti rallentino

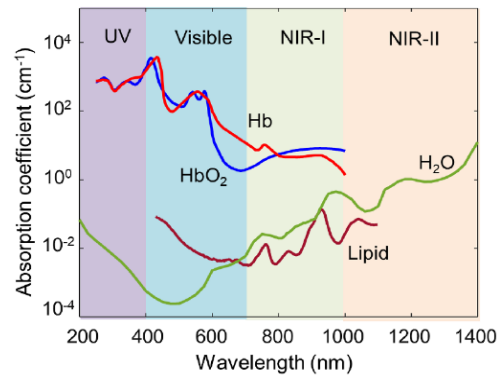


Figura 3  
Photoacoustic imaging in the second near-infrared window: a review

<sup>5</sup> Ogni atomo o molecola ha un proprio spettro elettromagnetico, quindi proprie frequenze naturali, corrispondenti ai picchi di assorbimento.

quando penetrano in un mezzo denso, dando origine al fenomeno della dispersione. In base alla conversione o meno di una parte dell'energia del fotone, si distingue tra scattering elastico ed anaelastico.

Nel presente lavoro non verranno descritti modelli di scattering anaelastico, tra i quali *scattering di Brillouin* e *scattering di Raman* risultano essere i più applicati.

Al contrario, si tratterà di scattering elastico, in cui le energie dei fotoni incidenti e deviati sono le stesse. La scelta tra i vari modelli esistenti dello scattering elastico dipende dalla dimensione della particella rispetto alla lunghezza d'onda.

Se la dimensione della particella o della molecola è sufficientemente piccola, prevale lo *scattering di Rayleigh*; l'intensità del fascio, simile a quella dell'assorbimento, è in funzione di  $z$  indicante l'asse di propagazione e del coefficiente di scattering  $\mu_s$ :

$$I(z) = I_0 \exp(-\mu_s z)$$

Attraverso opportuni calcoli di differenziazione e sostituzione, la *legge di Rayleigh* implica poi che l'intensità di scattering  $I_s$  sia fortemente dipendente da  $\lambda$ , infatti:  $I_s \sim \frac{1}{\lambda^4}$ .

Se, invece, la dimensione della particella è  $\sim \lambda$ , si ricorre allo *scattering di Mie*.

In realtà, nessuno dei due modelli è in grado di descrivere in maniera precisa lo scattering nei tessuti biologici; pertanto, si ricorre spesso alla funzione di probabilità  $p(\theta)$  di un fotone di essere deviato di un certo angolo  $\theta$ ; anche di tale funzione esistono vari modelli, ma il più utilizzato è quello conosciuto come *Henye-Greenstein*:

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{\frac{3}{2}}}$$

Dove  $g$  indica il coefficiente di anisotropia del mezzo in cui si propaga la luce.

Se  $g = -1$ , lo scattering è puramente diretto; se  $g = 1$ , invece prevale lo scattering a ritroso; infine, se  $g = 0$ , allora avviene lo scattering isotropico.

Gli autori dello studio [21] hanno, infatti, dimostrato che prevale lo scattering quasi diretto per tutti i tessuti esaminati, in particolare

quelli nervosi, con il coseno medio dell'angolo di scattering nell'intervallo 0,945-0,985.

Considerando sia lo scattering che l'assorbimento, la profondità di penetrazione ottica  $\delta$  sarà, ovviamente, inferiore rispetto al caso in cui si considera solo l'assorbimento [22], infatti:

$$\delta_{eff} = \frac{1}{\sqrt[3]{3\mu_a(\mu_s(1-g) + \mu_a)}}$$

Inoltre, se da un lato i tessuti nervosi condividono proprietà ottiche simili in funzione della lunghezza d'onda (Figura 4), dall'altro ci sono differenze nette tra la materia bianca (WM) e la materia grigia (GM) del cervello; per esempio, il coefficiente di estinzione  $\mu_t$  della prima è significativamente maggiore del suo complementare anatomico per l'intero range spettrale investigato<sup>6</sup> [21].

Lo stesso studio ha investigato anche come varia lo scattering in tessuti tumorali; poiché la struttura di questi tende ad essere macroscopicamente più disomogenea, infatti, i valori dei coefficienti di scattering ottenuti sono maggiori rispetto ai tessuti sani di materia grigia.

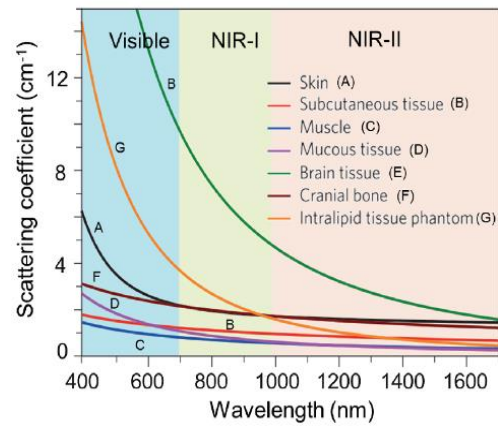


Figura 4  
Photoacoustic imaging in the second near-infrared window: a review

<sup>6</sup>  $\lambda = 800 \text{ nm}$ :  $\mu_{wmt} = 36.96 \text{ mm}^{-1}$   $\mu_{gmt} = 7.68 \text{ mm}^{-1}$

# CAPITOLO 2

---

## **Scopo della Ricerca: La luce e lo studio del cervello**

Negli ultimi anni, le tecnologie fotoniche hanno svolto un ruolo sempre più importante nel sostenere lo studio di organismi viventi (ad esempio cellule, piccoli animali e umani) in biologia e medicina. Le applicazioni biomediche come la spettroscopia e l'imaging dei tessuti biologici sono oggi un campo di applicazione principale per le tecnologie basate sulla luce e il termine biofotonica è comunemente usato. Più specificamente, i metodi e le applicazioni basati sull'uso della luce nelle neuroscienze per comprendere ulteriormente i fenomeni cerebrali stanno crescendo rapidamente e un nuovo termine - neurophotonics - è stato recentemente coniato per fare riferimento a tutte le discipline che lavorano attivamente e in sinergia con interfaccia tra ottica e neuroscienza. Questi metodi e applicazioni abbracciano una varietà di soluzioni e strumenti, come metodi microscopici e nanoscopici a super risoluzione, optogenetica e altri metodi ottici per manipolare il comportamento cellulare, l'uso di materiali sintetici e reporter ed attuatori ottici codificati geneticamente. Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di passare in rassegna in modo critico e più recenti risultati ottenuti nella modulazione ed attivazione di attività di cellule neurali attraverso tecniche che prevedono l'utilizzo della luce.

# CAPITOLO 3

---

## **I neuroni ed il loro principi funzionali**

### **Organizzazione del Sistema Nervoso**

Il Sistema Nervoso si divide in sistema nervoso centrale (CNS), in sistema nervoso periferico (PNS) ed in sistema nervoso enterico (ENS).

Il primo, che processa informazioni provenienti da altre parti del corpo e le rinvia ad esse, include cervello e corda spinale, entrambi protetti rispettivamente dal teschio e dalla colonna vertebrale. Il cervello è organizzato come una rete complessa ed intricata, in cui sono presenti anche vascolature ed altre cellule non nervose, come astrociti, cellule gliali e cellule endoteliali [36].

Invece, PNS include neuroni afferenti/sensoriali e neuroni efferenti. Quelli afferenti, organizzati perlopiù in “fasci”, ricevono informazioni dai recettori sensoriali posti nei tessuti periferici e negli organi e le trasmettono al CNS; i neuroni efferenti, invece, ricevono comandi dal CNS e li rinviano a specifici bersagli, per la maggior parte costituiti da muscoli o ghiandole. Sono neuroni efferenti anche quelli che determinano il sistema simpatico e parasimpatico.

ENS, infine, comprende i neuroni appartenenti all'apparato digerente, in grado di regolare la digestione comunicando con la flora intestinale.

## *I neuroni*

Sebbene ad oggi numerose evidenze indichino che non siano le uniche cellule che controllano la capacità di ricevere, di elaborare e di inviare segnali, i neuroni sono ad oggi ancora considerati l'unità funzionale del Sistema Nervoso [23]; essi sono capaci di ricevere una serie di segnali elettrici, noti come *potenziali d'azione* (APs), processarli e trasmetterli a neuroni adiacenti o ad altre cellule non nervose.

A livello morfologico o funzionale, esiste una grande varietà di neuroni, ma tutti condividono tre distinte regioni: il corpo cellulare, o *soma*, i dendriti ed un assone.

Il soma contiene il nucleo, i vari organuli necessari per l'attività cellulare ed un ampio citoscheletro, il quale si dirama verso i dendriti e gli assoni, fungendo da impalcatura cellulare e da mediatore di trasporto di vescicole contenenti proteine necessarie.

I dendriti hanno il ruolo primario di ricevere le informazioni in arrivo da altre cellule nervose e di trasmetterle verso il centro di integrazione, definito *zona trigger*.

Al contrario del soma e degli assoni, i dendriti determinano, in larga misura, la variabilità sia funzionale che morfologica dei neuroni: infatti, i neuroni afferenti del PNS possono avere un solo dendrite, mentre quelli del CNS possono avere complesse ramificazioni di dendriti.

Inoltre, sulla superficie di quest'ultimi possono essere presenti anche spine dendritiche, unità praticamente indipendenti, perché, oltre a ricevere il contatto sinaptico di altri neuroni, al loro interno spesso contengono i *poliribosomi*, enzimi in grado di sintetizzare proteine proprie.

Circa gli assoni, la maggioranza delle cellule nervose ne ha uno solo, che si estende da una zona specializzata del soma con lunghezze che possono variare da pochi mm fino a 1 m; APs avanzano lungo questa regione con una velocità che raggiunge i 100 m/s se adeguatamente rivestite da guaine mieliniche.



Va specificato che, nonostante l'assone sia fondamentalmente uno per ogni cellula nervosa, dalla sua superficie possono emergere ramificazioni collaterali.

È chiamata *sinapsi* la regione in cui il terminale assonico di un neurone presinaptico incontra una cellula bersaglio, o un dendrite in caso di neurone postsinaptico.

I neuroni, come tutte le altre cellule viventi, hanno un potenziale di membrana a riposo, che in media è di -70 mV. Esso è condizionato dall'ineguale distribuzione degli ioni ai capi della membrana e dalla differente permeabilità della membrana a tali ioni: se queste due caratteristiche vengono alterate, si modifica, conseguentemente, il potenziale di membrana.

Ad esempio, l'aggiunta di ioni  $\text{Na}^+$  nel citoplasma depolarizza la membrana cellulare, inducendo la cellula ad essere più positiva; mentre, con una perdita di ioni  $\text{K}^+$  o con un aumento di ioni  $\text{Cl}^-$ , la membrana si iperpolarizza, inducendo la cellula ad essere più negativa.

Se gli ioni principali che determinano la variazione di potenziale di membrana sono gli ioni  $\text{K}^+$ , più concentrati nel citoplasma, e gli ioni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , più concentrati nell'ambiente esterno, i mediatori degli spostamenti di tali ioni sono i canali ionici a cancello.

In genere esistono vari tipi di canali ionici a cancello, ma 3 di questi sono quelli maggiormente presenti nelle membrane di neuroni: i canali ionici regolati meccanicamente, che si trovano prevalentemente nei neuroni sensoriali e che si attivano in funzione di uno stimolo meccanico, come la pressione; i canali ionici regolati chimicamente, presenti pressochè in tutte le cellule nervose, e che si aprono, per esempio, quando ligandi come i neurotrasmettitori attivano tali canali; infine, i canali ionici voltaggio-dipendenti, che si aprono in presenza di cambiamenti localizzati di potenziali di membrana.

Tali potenziali di membrana sono classificati in potenziali graduati ed in potenziali d'azione.

## I potenziali graduati

I potenziali graduati, generalmente originati nei dendriti e nel soma, sono segnali di iperpolarizzazione o di depolarizzazione, con un'ampiezza proporzionale all'intensità dello stimolo. L'intensità di tali segnali si riduce all'aumentare della distanza dal punto di origine per dissipazione di corrente e per resistenza del citoplasma.

Successivamente, questi segnali raggiungono la zona trigger, nella quale sono presenti ad alte concentrazioni canali  $\text{Na}^+$  voltaggio-dipendenti sulla membrana, che, complessivamente, stabiliscono il livello soglia in termini temporali<sup>7</sup> o spaziali<sup>8</sup>, affinché si possa innescare un AP.

Va notato che questo tipo di organizzazione varia da neurone a neurone ed è ciò che contraddistingue la base del processamento delle informazioni nel sistema nervoso.

I potenziali graduati depolarizzanti sono considerati eccitatori se la loro intensità sono maggiori o uguali al livello soglia<sup>9</sup>; in tal caso, i canali  $\text{Na}^+$  in prossimità della zona trigger si aprono consentendo influssi di  $\text{Na}^+$ , con la conseguente ulteriore depolarizzazione di membrana dando origine ad un AP. Al contrario, i potenziali graduati iperpolarizzanti sono considerati inibitori, perchè riducono la somma delle intensità dei potenziali graduati depolarizzanti allontanandoli dal livello soglia.

## I potenziali d'azione

Una volta che un AP viene originato nella zona trigger, grazie all'influsso di  $\text{Na}^+$ , la sua propagazione non diminuisce di intensità, al contrario di quanto accade ai potenziali graduati.

Infatti, quando il potenziale di membrana da -60/-55 mV raggiunge i +30 mV per via dell'influsso di  $\text{Na}^+$ , contemporaneamente i canali  $\text{Na}^+$  si chiudono ed i canali  $\text{K}^+$  si aprono; attraverso questi, ioni  $\text{K}^+$  escono dalla cellula, ripolarizzando la membrana verso il potenziale di riposo.

---

<sup>7</sup> Numero minimo di segnali in un intervallo di tempo

<sup>8</sup> Numero minimo di segnali simultanei nella zona trigger

<sup>9</sup> Per i neuroni di mammiferi il livello soglia = -55 mV [23]

Durante il suddetto intervallo, definito come periodo refrattario assoluto, non si possono innescare ulteriori APs indipendentemente dall'intensità per circa 1-2

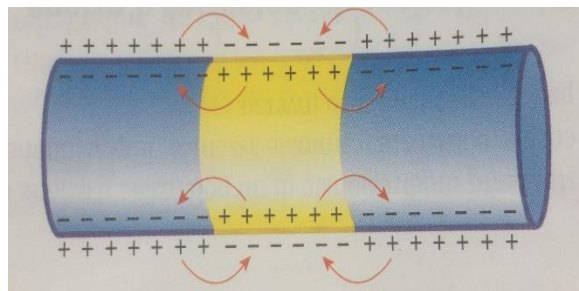


Figura 5  
Fisiologia umana. Un approccio integrato

ms; ciò fornisce ai canali dei canali  $\text{Na}^+$  tempo sufficiente per ritornare allo stato di riposo. Ne consegue che APs non possono sovrapporsi e propagarsi in senso inverso.

Al periodo refrattario assoluto, segue il periodo refrattario relativo, durante il quale non tutti i canali dei canali  $\text{Na}^+$  sono tornati alla posizione iniziale, mentre quelli dei canali  $\text{K}^+$  sono ancora aperti.

In questo lasso temporale, è possibile innescare un AP a patto che il potenziale graduato depolarizzante che lo provoca sia più intenso del normale, in quanto la membrana può essere iperpolarizzata fino a -90 mV.

La conduzione di un AP lungo l'assone è dovuta ai flussi locali di cariche della regione attiva, che provocano la depolarizzazione di nuove sezioni di membrana (Figura 5).

Infatti, le cariche positive, introdotte nel citoplasma attraverso la depolarizzazione di una sezione di assone, si diffondono in tutte le direzioni, poiché attratte dalla carica negativa del potenziale di membrana a riposo.

Quelle che si diffondono verso il terminale assonico, inducono all'apertura di canali  $\text{Na}^+$  delle sezioni successive della membrana, generando nuovi AP; mentre, quelle che si diffondono a ritroso, verso la zona trigger, non innescano alcuna depolarizzazione, perché i canali  $\text{Na}^+$  precedenti si trovano ancora allo stato refrattario assoluto e, quindi, inattivi.

Va notato che per la propagazione di potenziali graduati e di un AP, sono sufficienti concentrazioni di ioni  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  relativamente trascurabili rispetto a quelle relative all'interno ed all'esterno della cellula.

Nel momento in cui un AP arriva al terminale assonico, esso innesca l'apertura di canali  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio-dipendenti; attraverso tali canali, per gradiente chimico, nel citoplasma entrano ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , provocando l'esocitosi di vescicole contenenti una quantità costante di neurotrasmettitori o di neuromodulatori, che vengono rilasciati nello spazio sinaptico.

In base all'intensità dello stimolo iniziale, si determina la frequenza del treno di APs consecutivi e, conseguentemente, la quantità di neurotrasmettitori rilasciati.

Successivamente, tali molecole andranno a legarsi con specifici recettori di membrana della cellula postsinaptica determinando così specifiche risposte.

È importante notare che non si tratta di una comunicazione unilaterale; piuttosto di una comunicazione bilaterale, perchè le cellule postsinaptiche, a loro volta, possono inviare neuromodulatori ai neuroni presinaptici. Questa proprietà dei neuroni di regolare l'attività a livello delle sinapsi è definita *plasticità sinaptica*.

Se i neurotrasmettitori si legano a recettori accoppiati a proteine G, si attua un potenziale sinaptico lento; mentre, se si legano a canali ionici, provocandone l'apertura, si attua un potenziale sinaptico veloce, di tipo eccitatorio (EPSP) o di tipo inibitorio (IPSP).

# CAPITOLO 4

---

## Approcci e tecnologie fotoniche per lo studio delle cellule cerebrali

### Laser

L'introduzione dei laser nei laboratori di ricerca [8] ha permesso di indagare in maniera precisa e di porsi nuove domande negli studi.

Esistono due sistemi laser [24]: quello ad onde continue (CW), che consiste in laser a gas e, in casi rari, allo stato solido, e quello ad impulsi, che viene ampiamente utilizzato nei settori che coinvolgono tessuti biologici, in particolare nervosi; si tratta primariamente di laser allo stato solido e laser ad eccimeri.

Recentemente, in ambito medico, sono state ottenute ulteriori migliorie nelle tecnologie dei diodi laser, ora molto economici ed in grado di emettere radiazioni sia CW che ad impulsi, e dei laser ad elettroni liberi, attualmente estremamente precisi in quanto forniscono impulsi di durate che raggiungono l'ordine del femtosecondo.

Combinando ultrafast laser a stato solido, lenti ottici ad alta apertura numerica<sup>10</sup> (NA) ed altri componenti, si possono, inoltre, ottenere tecnologie come il laser Two-Photon Excitation Light (TPE- laser 2P), versione successiva del laser One-Photon Excitation Light (OPE) [25]. Questa strumentazione, pur essendo notevolmente dispendiosa e fortemente dipendente dalla lunghezza d'onda utilizzata, è stata progettata inizialmente come microscopio, per via della eccezionale capacità di fornire un imaging di un volume a pin-point di dimensioni simili a quelle di larghe spine dendritiche, in maniera altamente localizzata, sia *in vivo* che *in vitro*. Essa consente, inoltre, anche una maggiore penetrazione dei tessuti ed una ridotta fototossicità, data la sua natura di eccitazione non lineare, per cui, due fotoni, e non uno come nel caso di OPE, di lunghezze d'onda doppie rispetto alla

---

<sup>10</sup>  $NA = n \sin \theta$ ;  $n$  è l'indice di rifrazione;  $\theta$  è la divergenza del fascio. Se il profilo di un laser è di tipo gaussiano, Na può essere scritta in questo altro modo:  $NA \cong \frac{2\lambda_0}{\pi D}$ ;  $\lambda_0$  è la lunghezza d'onda nel vuoto della luce emessa e  $D$  è il diametro del fascio in uscita

versione OPE (Figura 6) vengono assorbiti simultaneamente via stadio virtuale.

Per questa ragione, tale tecnologia viene, successivamente, largamente applicata in photo-uncaging di molecole, in particolare i neurotrasmettitori photocaged, utilizzati nel settore neuroscientifico [26] [27].

Difatti, in questo modo si attivano quelle molecole solo nel piano focale, anziché liberare in prossimità delle spine dendritiche ed in massa i neurotrasmettitori lungo un'intera colonna, per via dell'eccitazione lineare.

In conclusione, i parametri fondamentali per la progettazione dei laser che verranno applicati poi sui tessuti biologici sono: la durata di esposizione, che determina gli effetti termici, generalmente secondo "la regola del 1 $\mu$ s", per cui con durate inferiori gli effetti termici possono essere considerati trascurabili se con frequenze di impulsi moderate; la lunghezza d'onda, che determina la profondità di penetrazione, dipendente da scattering ed assorbimento; la densità di energia ed, infine, l'intensità effettiva, nota come energia radiante.

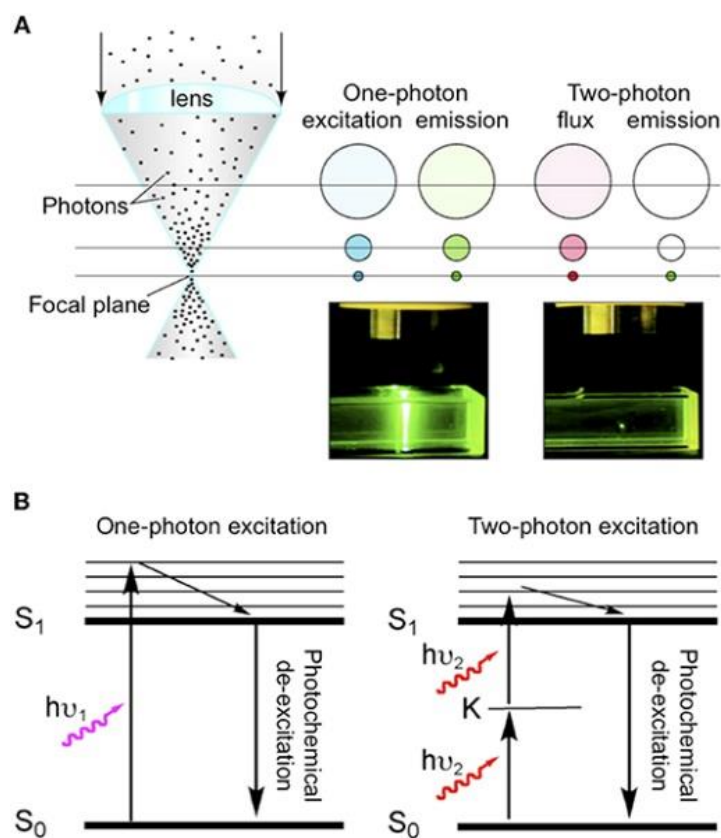


Figura 6

Frontiers in Synaptic Neuroscience - Two-Photon Uncaging of Glutamate

## *Fibra ottica*

Sviluppate ed innovate dai premi Nobel in Fisica 2009 Charles Kao, Willard Boyle, e George Smith, le fibre ottiche attualmente sono comunemente usate per numerose applicazioni e rappresentano una tipologia di guida d'onda<sup>11</sup> per le radiazioni EM.

Si compongono di un nucleo cilindrico centrale, il *core*, in genere fatto di silica ultra-pura, circondato da un mantello, il *cladding*; all'esterno della fibra è presente una guaina protettiva, il *jacket*, che isola la parte interna, proteggendola dall'ambiente esterno, da stress fisici e dalla corrosione. Se la luce entra nel nucleo con una certa angolazione, essa si propagherà lungo la fibra tramite una serie di riflessioni totali alla superficie di separazione fra i due materiali del nucleo e del mantello.

Infatti, l'indice di rifrazione del core è leggermente maggiore rispetto a quello del cladding.

Grazie alla economicità e alla versatilità delle fibre ottiche, ne esiste una grande varietà, sebbene con differenti parametri come il diametro del nucleo, da cui è possibile ricavare  $NA^{12}$ , gli indici di rifrazione, le caratteristiche del materiale e il drogaggio apportato nei materiali stessi del core e del cladding.

È importante precisare, in particolare nell'ambito medico, che non è possibile servirsi di fibre ottiche con diametri inferiori a  $4 \mu m$  per limitazioni fisiche; la propagazione di onde EM cessa, infatti, di essere efficace [14].

Tuttavia, ancora in ambito medico, è proprio grazie alla ridotta dimensione delle fibre ottiche ed alle proprietà che le determinano che si presenta il vantaggio più importante rispetto ai convenzionali fili che trasportano segnali elettrici [9]; ovvero, la possibilità che le fibre ottiche offrono di proiettare la radiazione luminosa su una porzione di tessuto molto piccola in maniera focale, al contrario della diffusione della corrente che si espande in tutte le direzioni.

---

<sup>11</sup> La guida d'onda è un tipo di mezzo di trasmissione, il quale consente la propagazione guidata di onde elettromagnetiche all'interno di una data struttura.

<sup>12</sup>  $NA = \sqrt{(n_1^2 - n_2^2)}$ ;  $n_1$  è l'indice di rifrazione del *core*;  $n_2$  è l'indice di rifrazione del *cladding*. Una elevata NA consente di proiettare la luce in maniera più focalizzata

## *Molecole Esogene Fotosensibili*

Una tecnica efficiente per alterare da remoto i comportamenti dei neuroni, utilizzando la luce<sup>13</sup>, consiste nell'uso di molecole che in qualche modo sono sensibili alla luce stessa e rispondono alterando le proprie funzioni e strutture.

Esse si suddividono in due categorie: molecole incapsulate in gabbie fotolabili [9] [13]<sup>14</sup> e piccole molecole foto-bistabili [13] [28].

I caged molecules sono una combinazione di differenti gruppi di molecole: elemento chiave è il gruppo protettivo fotolabile che, confinato entro una finestra spaziale e temporale ed esposto alla luce, libera il gruppo bioattivo contenuto in esso. Il gruppo bioattivo consiste in biomolecole che, legandosi a recettori metabotropici<sup>15</sup>, innescano depolarizzazioni inducendo APs in caso di neurotrasmettitori glutammato<sup>16</sup>, o iperpolarizzazioni in caso di neurotrasmettitori GABA.

In settori diversi dalle neuroscienze, il gruppo bioattivo include anche altre biomolecole, che influenzano le attività nervose e non, come buffers di calcio o di sodio, nucleotidi come ATP, peptidi e perfino mRNA e DNA<sup>17</sup> [29].

Per quanto riguarda il gruppo protettivo, le gabbie devono essere chimicamente e biologicamente inerti, ma difficilmente si è in grado di ottenere gabbie ideali e, per questa ragione, è in atto una forte ricerca che si dedica allo studio e alla progettazione di nuove gabbie, data l'enorme variabilità chimica. Va sottolineato che, in genere, la progettazione delle gabbie dipende dalla natura dei loro contenuti.

Le molecole bi-stabili, invece, fungono da foto-switch e ne esistono molteplici configurazioni, ciascuna delle quali si isomerizza in risposta a determinate lunghezze d'onda della luce. La maggior parte di queste molecole fotoisomerizzabili o fotoattivabili, però, richiede

---

<sup>13</sup> Illuminazione 2P e UV

<sup>14</sup> Per evitare ridondanze, in questo lavoro, la frase "molecole liberate/incapsulate in gabbie" verrà mantenuta nella sua traduzione originale "uncaged/caged molecules"

<sup>15</sup> Il recettore metabotropico è primariamente una proteina G che, una volta legatosi il ligando, innesca una cascata di risposte intracellulari [23]

<sup>16</sup> Il glutammato è un anione di acido glutammico, da non confondere con il glutammato monosodico

<sup>17</sup> Il presente lavoro tratterà prevalentemente dei neurotrasmettitori glutammato e GABA



una manipolazione genetica affinché vengano espresse eterologamente sui recettori ionotropici<sup>18</sup> dei siti di affinità [28] [30], dove le molecole in questione possono legarsi.

A differenza delle proteine utilizzate nell'optogenetica, la cui risposta nervosa è provocata dalla foto-attivazione principalmente di ChRs o HRs, la risposta nervosa è mediata dalla foto-isomerizzazione della molecola che funge da bottone a canali ionici come canali K<sup>+</sup>.

Si ricorre a questo approccio per indurre correnti depolarizzanti o iperpolarizzanti su specifici tipi di cellule o subregioni cellulari mirate. Comparato all'approccio non genetico del rilascio di ligandi, la stimolazione ottica avviene in maniera molto più accurata e specifica.

L'idea di approcciarsi all'utilizzo della luce per liberare molecole bioattive, a partire da precursori inerti, risale agli anni '80, quando si scoprì che gli esteri 2-nitrobenzyl (NB) legati ad ATP o a nucleotidi, venivano scissi sottoesposizione di luce ultravioletta (<340 nm) [31].

Tuttavia, essendo le molecole libere di NBs reattive biologicamente, fu necessario sviluppare approcci migliori.

Lo sviluppo di foto-switch e di gabbie è cresciuto, infatti, sempre più negli ultimi anni, per merito dei sostanziali progressi dei materiali, della chimica e della genetica, che hanno consentito un ampliamento delle potenzialità di drug-delivery ai neuroni, rendendolo un avanzato ed importante strumento per investigazioni neuroscientifiche [26] [28] [32], oncologiche e per la rigenerazione della vista [33].

In particolare, nelle neuroscienze tale metodo ha contribuito, tramite luce, alla comprensione di circuiti neurali a maggiori risoluzioni e della connettività funzionale dei neuroni, come il processamento di informazioni nervose e l'immagazzinamento e l'integrazione degli input eccitatori sinaptici [26] [28] in numerose aree cerebrali, principalmente le corteccie visive e sensoriali [9]. Nonostante ciò, ad oggi si rilevano limitazioni a causa di effetti indesiderati, quali il rilascio di biomolecole in maniera non

---

<sup>18</sup> Il recettore ionotropico, una volta legatosi il ligando, permette il flusso ionico attraverso la membrana [23]

totalmente precisa e controllata e la tossicità dei sottoprodotti. È bene precisare, inoltre, che l'uncaging di neurotrasmettitori è altamente efficace solo per guidare le singole attivazioni sinaptiche in spine dendritiche, rendendo questo approccio inutilizzabile per lo studio di risposte nervose in siti non sinaptici [26].

### **I composti “ingabbiati”**

Perché l'efficacia di un gruppo protettivo per neurotrasmettitori [29] [34] sia garantita, è necessario che la cinetica della reazione fotolitica si realizzi in un range di tempo del millisecondo, in modo che i neurotrasmettitori inneschino o inibiscano APs.

I sottoprodotti del gruppo protettivo che si ottengono da questa reazione fotolitica, devono rimanere il più possibile bioinerti e, successivamente, essere espulsi dal sito e dall'organismo attraverso la circolazione sanguigna.

Numerosi studi [13] [26] [29] [34] riportano che l'approccio migliore per innescare la reazione fotolitica del complesso gabbia-biomolecola, richiede l'utilizzo di un microscopio laser 2P; quest'ultimo agisce in una sezione trasversale più ristretta, nitida e profonda rispetto al laser 1P [31], che, oltretutto, richiede l'utilizzo di luce con lunghezze d'onda dell'UV, soggetta maggiormente a scattering e ad assorbimento, con possibili ingenti danni ai tessuti.

Per queste ragioni, si è cercato di progettare gabbie fotoattivabili con laser 2P, con lunghezze d'onda che arrivino fino a quelle dell'infrarosso, in modo da ridurre il più possibile lo scattering e rendere, quindi, possibile l'accesso alle aree più remote del cervello. Nelle Figura 7.B e Figura 7.C dello studio [26] viene mostrata la precisione del laser 2P (puntino rosso); infatti, il laser è in grado di fotoattivare solo le gabbie esposte in prossimità di una spina dendritica proveniente da una cultura di neuroni murini, rilasciando neurotrasmettitori di glutammato che andranno successivamente a legarsi ai recettori ionotropici AMPA.

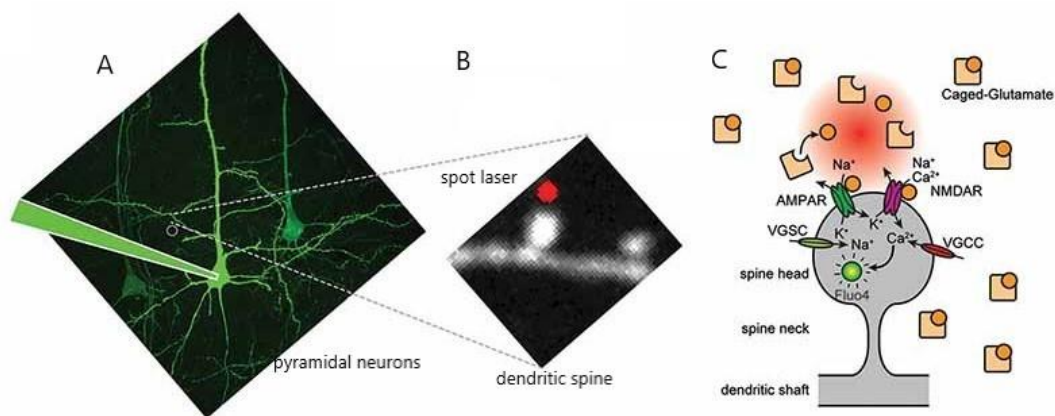


Figura 7

Frontiers in Synaptic Neuroscience - Probing Single Synapses via the Photolytic Release of Neurotransmitters

I neurotrasmettitori di glutammato sono tra i principali neurotrasmettitori nei tessuti nervosi di numerosi mammiferi<sup>19</sup>, motivo per cui i glutammato-caged sono largamente usati nei vari studi di neuroscienze.

Al contrario del glutammato, il neurotrasmettitore GABA è poco adeguato all'approccio delle gabbie, le quali vengono poco ingegnerizzate, perché vari studi [34] riportano che i GABA-caged hanno proprietà fotochimiche e farmacologiche sfavorevoli: per esempio, la maggior parte dei GABA-caged presenta un comportamento antagonista prima che avvenga la fotolisi tra la gabbia e il neurotrasmettitore in questione.

In realtà, il presente studio è rivolto ad un settore di ricerca ancora in fase di sviluppo, tant'è che i glutammato-caged ed i GABA-caged in grado di soddisfare tutti i requisiti necessari per il fotorilascio ottimale negli studi delle neuroscienze sono a tutt'oggi ancora pochi. Di seguito, ne vengono presentati alcuni.

### 2-nitrosobenzaldehyde (NB) - Ach

Le prime gabbie utilizzate, alla fine degli anni '80, erano a base di NB [31]; utilizzate per studiare, con i neurotrasmettitori Ach, la cinetica e l'attivazione dei recettori nicotinici.

Non esibivano, però, una buona sensibilità tramite laser 2P e si era costretti ad usare laser 1P, per fornire sufficiente energia utile a fotoattivare le gabbie NB. Ciò provocava danni ai tessuti e, inoltre,

<sup>19</sup> Nei tessuti nervosi umani, il glutammato costituisce oltre il 50% dei neurotrasmettitori [23]

la reazione fotolitica lasciava sottoprodotti piuttosto reattivi, che potevano compromettere lo studio delle funzioni sinaptiche.

### *$\alpha$ -carboxy-2-nitrobenzyl (CNB) –Glutammato&GABA*

Il CNB è tra le prime gabbie meglio realizzate. Una singola molecola di glutammato è ingabbiata tra due gruppi protettivi di CNB, i quali, con l'assorbimento di due fotoni emessi da una sorgente laser 2P, si separano rapidamente dal glutammato che, di seguito, attiverà recettori ionotropici con un andamento temporale normale (0.5 ms) [29] [34] .

Poco stabile, invece, risulta il fotorilascio del GABA, perchè il GABA-caged presenta comportamenti antagonisti [29].

### *4-methoxy-7-nitroindolinyll (MNI) - Glutammato*

I gruppi protettivi MNI evidenziano la più alta sensibilità con il laser 2P: infatti, possono essere fotolitizzati in un volume inferiore a 1  $\mu\text{m}^3$ , risoluzione spaziale minima che consente l'attivazione dei recettori per il glutammato a livello di singola spina dendritica.

Inoltre, il tasso di liberazione spontanea di glutammato in assenza di laser 2P è minimo, se non nullo, e i sottoprodotti della reazione fotolitica sono inerti e non alterano le funzioni neuronali [13] [34]. Nella situazione in cui si usi laser 2P con lunghezze d'onda dell'infrarosso (730 nm), è richiesta una concentrazione maggiore di MNI-glutammato, cosa che può interferire con lo studio delle reti neurali basate sulle cinetiche dei recettori ionotropici.

### *RuBi-GABA*

Basato sull'elemento atomico Rutenio, questo complesso inorganico offre la possibilità di utilizzare in maniera sicura e migliore il GABA, per l'assenza di comportamento antagonista prima della fotolisi.

Inoltre, le RuBi-GABA possono essere attivate con una rapida cinetica e con luce visibile, il che consente l'utilizzo di tale complesso a maggiore profondità nei tessuti nervosi rispetto ad altre GABA-caged [35].

## Hydrogel fotosensibile

L'utilizzo dell'idrogel fotosensibile è un approccio che sta recentemente attirando molta attenzione, soprattutto da parte di quei settori che si occupano di ingegneria tissutale e di drug-delivery. Il suo successo è dovuto alla elevata flessibilità e biocompatibilità, che caratterizza, comunque, tutti gli idrogel: infatti, l'idrogel può cambiare forma, avere un payload molto variabile e può essere degradato da parte dell'organismo senza che si attivino risposte infiammatorie. Combinando queste proprietà con quelle della luce, si ottiene un sistema di drug-delivery di molecole bioattive molto efficiente [32].

Le neuroscienze prevedono 2 approcci principali: idrogel fototermici ed idrogel photo-cleavable.

Il primo consiste nell'integrazione di nanoparticelle nell'idrogel, in grado di assorbire la luce e convertirla in calore; ciò induce cambiamenti della struttura dell'idrogel circostante e comporta il rilascio di neurotrasmettitori caricati nell'idrogel stesso [32] [36].

Il secondo, invece, consiste in idrogel che, in risposta alla luce, subiscono variazioni strutturali o degradazioni, con conseguente dispersione in sito del contenuto.

Rimangono problemi quali la fabbricazione e l'introduzione di questo tipo di gruppo protettivo nel sistema biologico, in particolare nel cervello, perché lo studio [36] ha riscontrato che gli hydrogel neurotransmitter-caged oltretappassano con difficoltà la barriera ematoencefalica.

## I photoswitches

I photoswitches, al contrario delle molecole caged, vengono utilizzati nel caso sia richiesta un'alta specificità tra ligando e recettore a livello di singola sinapsi ed un controllo spazio-temporale maggiore circa la diffusione e la separazione del ligando [28].

Le molecole che fungono da photoswitch, ovvero “bottoni” sensibili alla luce, in genere sono di natura sintetica e sono capaci di cambiare la propria struttura chimica in maniera reversibile assorbendo la luce; tale fenomeno, noto come fotoisomerizzazione, può innescare depolarizzazioni o iperpolarizzazioni in una scala temporale del picosecondo, tempi inferiori di diversi ordini di grandezza rispetto a quelli dei normali processi biologici.

Altre proprietà utili in ambienti fisiologici, includono la selettività a determinati spettri di assorbimento della luce, la solubilità in acqua, la stabilità in caso di eventi chimici quali idrolisi, ossidazione e riduzione, e, ovviamente, l'assenza di tossicità [33].  $h\nu_1$

Esistono numerosi e differenti photoswitches, ma la maggior parte di essi ha lo stesso gruppo chimico di partenza: si tratta di azobenzene<sup>20</sup>, una molecola che, scoperta nell' '800 ed impiegata nell'industria delle tinture, viene oggi molto utilizzata per applicazioni biologiche, in particolare nel settore delle neuroscienze [28] [37], grazie alle sue eccellenti proprietà e biocompatibilità.

L'azobenzene, allo stato di riposo, è un isomero con una conformazione trans ed è molto stabile rispetto all'isomero di alta energia che ha una conformazione cis. Infatti, in assenza di illuminazione ed allo stato di equilibrio, l'isomero trans-azobenzene si presenta nel 99.99% dei casi con una conformazione planare, come viene mostrato nella Figura 8.A e momento dipolare  $\sim 0$  D<sup>21</sup>. Se

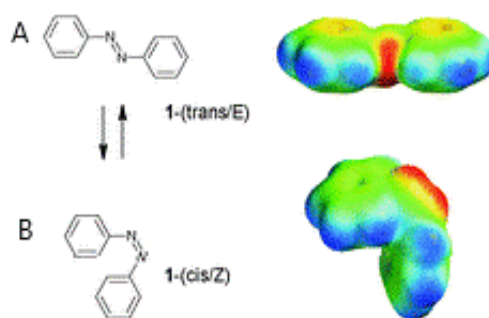


Figura 8

Chemical Society Review -Azobenzene photoswitches for biomolecules

<sup>20</sup> Ci sono altri gruppi chimici rilevanti come spiropyrans, diarylethenes, fulgides, naphthopyrans, e stilbenes; tuttavia, il seguente lavoro si incentrerà prevalentemente sull'azobenzene.

<sup>21</sup> Debye: Coulomb-metro

questo isomero viene irradiato con luce UV ( $\lambda \sim 340$  nm), esso subisce una conformazione e diventa cis-azobenzene, in cui un gruppo fenile ruota rispetto al suo gruppo azo di circa  $55^\circ$  (Figura 8.B) con un momento dipolare di 3 D [38]. Tale isomero ritorna allo stato di equilibrio per rilassamento termico se posto al buio o se viene irradiato con  $\lambda$  maggiori di 450nm.

Dal momento che il rilassamento termico del cis-azobenzene richiede diversi giorni a temperatura ambiente ed al buio [38], sono stati ingegnerizzate diverse e numerose varianti di azobenzene. Tali derivati possono isomerizzarsi in maniera differente rispetto all'originale [37] [39] ed a lunghezze d'onda più red-shifted, in modo da assorbire luce a profondità maggiori nei tessuti nervosi, senza apportare danni. Elemento chiave dell'azobenzene e dei suoi derivati è che essi non vengono modificati o degradati dal sistema biologico, sia *in vitro* che *in vivo*.

Infine, nell'ambito di studi neuroscientifici, queste varianti di azobenzene vengono applicate, da una estremità, a recettori, in genere canali ionici, e dall'altra, ad un neurotrasmettitore agonista/antagonista o poro bloccante.

Perciò, i derivati, in funzione della luce, assumono una certa posizione rispetto al recettore e, di conseguenza, sono in grado di controllare l'apertura dei canali ionici innescando depolarizzazioni o iperpolarizzazioni. In genere, tali ligandi funzionano molto bene se legati a canali voltaggio  $K^+$  ed a recettori glutammato [13].

Questi complessi di ligandi fotosensibili si possono dividere in due macrogruppi, in base alla necessità di una manipolazione genetica [33] [28]: ligandi liberamente diffusi (PCLs, Figura 9.A) e legati per affinità (PALs, Figura 9.B), e ligandi

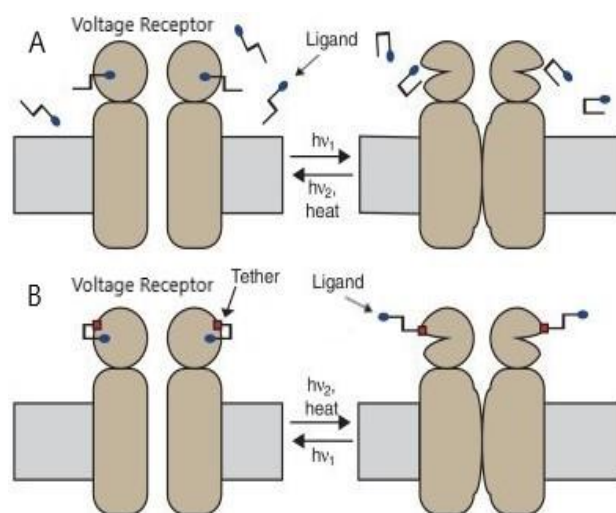


Figura 9

Current Opinion in Neurobiology - Precise modulation of neuronal activity with synthetic photoswitchable ligands

legati covalentemente ai siti di attacco desiderato, introdotti geneticamente nei recettori bersaglio, senza che vi siano alterazioni delle funzioni originarie (PTLs, Figura 9.B).

### *PhotoChromic Ligands (PCLs)*

I PCLs non richiedono una terapia genica, perché si tratta di ligandi liberamente circolanti che, una volta interagito con i recettori specifici, si dissociano da essi in funzione della luce.

I PCLs possono comportarsi sia come trans-bloccanti o cis-bloccanti: i primi inducono segnali nervosi se si fotoisomerizzano, mentre i secondi, in maniera inversa, inducono segnali nervosi in assenza di luce [33] [28] [40].

I PCLs, grazie alla semplicità e all'abbondanza chimica dell'azobenzene, sono stati i pionieri della fotostimolazione ottica nei primi studi neuroscientifici della fine degli anni '60 [41] [40]. Tali studi si riferivano al PCL bis-Q, un agonista photoswitch per il recettore acetilcolina. In seguito, sono stati progettati differenti PCLs in grado di controllare le attività neuronali tramite canali ionici voltaggio-dipendenti, incluso canali  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  e recettori glutammato come AMPA, NMDA e Kainate, principali recettori che mediano la neurotrasmissione eccitatoria [40].

Generalmente, però, i PCLs sono liberamente circolanti in ambiente fisiologico, perciò, possono diffondersi e legarsi a recettori di cellule o subregioni che non sono oggetti di studio.

### *Photoswitchable Tethered Ligands (PTLs)*

Allo scopo di minimizzare la possibilità di interazioni non desiderate ed aumentare la concentrazione locale del ligando, alternativamente ai PCLs, possono essere utilizzati i PTLs. Sviluppatisi parallelamente ai primi, i PTLs consentono di essere legati covalentemente ai recettori specifici, ma a patto che parte del gene che codifica tale recettore venga trattato eterologamente, per esprimere anche un sito di affinità al ligando specifico.

Il primo complesso recettore-ligando ingegnerizzato è stato SPARK<sup>22</sup> [31], un derivato dell'azobenzene a cui è legato il poro bloccante

---

<sup>22</sup> Synthetic Photoisomerizable Azobenzene-Regulated  $K^+$  - SPARK



(MAL-AZO-QA). Applicando un sito di affinità per mutazione al canale potassio voltaggio dipendente Shaker, SPARK è in grado di legarsi ad esso. Nella trans-configurazione, SPARK blocca il canale ionico e si fotoisomerizza rapidamente ( $<100\text{ms}$ ) con  $\lambda\sim 380\text{ nm}$ ; ciò comporta un incremento della conduttanza di ioni K intracellulari ed una conseguente iperpolarizzazione del neurone.

Dopodichè, SPARK ritorna allo stato di equilibrio: se posto al buio, il rilassamento termico può impiegare oltre 10 min; mentre, se viene esposto ad impulsi di luce visibile ( $\lambda\sim 500\text{ nm}$ ), il ritorno allo stato iniziale può essere accelerato fino a 2 min [31]. A causa delle elevate durate del rilassamento termico in entrambe le condizioni, assenza o presenza di luce, questo complesso non è, tuttavia, utilizzabile per controllare attività nervose.

Un complesso recettore-ligando che, invece, ha ricevuto molta attenzione soprattutto da parte delle neuroscienze, è il LiGluR [42] [43]: si tratta di un recettore ionotropico glutammato modificato (iGluR6) in una subunità specifica, al quale si lega il ligando azobenzene derivato MAG<sub>0</sub> (Figura 10.A), a sua volta agganciato al neurotrasmettitore glutammato.

La diretta fotoattivazione di tale complesso offre la possibilità di depolarizzare, tramite potenziali postsinaptici eccitatori glutamatergici, i neuroni *in vivo*<sup>23</sup> in maniera praticamente correlata al treno di impulsi luminosi, con frequenze fino a 50 Hz.

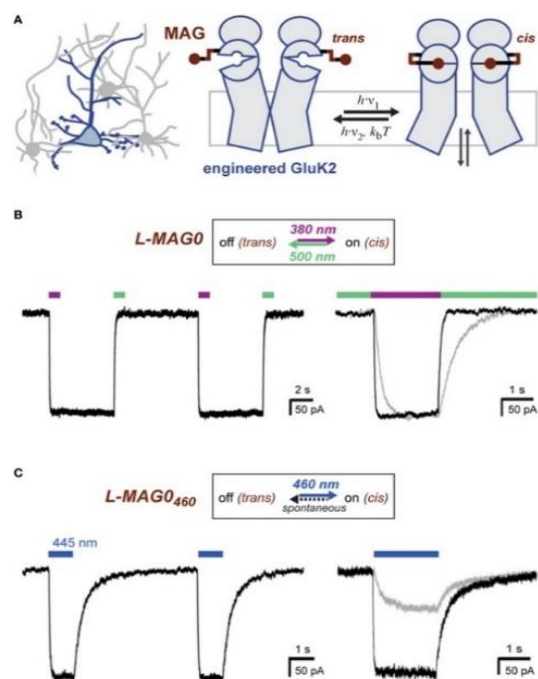


Figura 10

Frontiers in Molecular Neuroscience - A Toolkit for Orthogonal and *in vivo* Optical Manipulation of Ionotropic

<sup>23</sup> Gli studi [33] [42] riportano che su una coltura di neuroni ippocampali murini e su pesce zebra, la fotoattivazione di LiGluR innesca APs correttamente con treni di impulsi luminosi fino a 50 Hz; mentre lo studio [28], effettuato sulla corteccia V1 murina, riporta che impulsi luminosi guidano spikes con frequenze fino a 5 Hz.

Queste frequenze rientrano nella scala temporale fisiologica delle attivazioni dei recettori glutammato.

Grazie alla proprietà caratteristica bistabile dei derivati di azobenzene, illuminando il LiGluR a lunghezze d'onda differenti, è possibile aumentare o diminuire la conduttanza in maniera controllata; quindi, il tempo di eccitazione è precisamente definito in funzione degli impulsi luminosi.

Un'ulteriore caratteristica di LiGluR è la possibilità di innescare di un AP con un breve ma intenso impulso luminoso, seguito, da altri brevi ma deboli impulsi luminosi che innescano ulteriori APs, sfruttando il rilassamento termico piuttosto prolungato in prossimità delle spine dendritiche. Tutto ciò prosegue finché non si utilizzano impulsi a lunghezze d'onda maggiori o in attesa che si completi il rilassamento termico (~18 min). L'aspetto negativo di questo approccio tanto attraente, è che la versione dell'azobenzene MAG<sub>0</sub> (Figura 10.B) richiede un'irraggiamento UV (380 nm) per il passaggio trans-cis, e per il ritorno inverso luce visibile ( $\lambda_{\text{peak}} = 600 \text{ nm}$ ) o rilassamento termico di diversi minuti.

La versione MAG<sub>460</sub> (Figura 10.C), invece, richiede un irraggiamento più red-shifted ( $\lambda_{\text{peak}} = 460 \text{ nm}$ ) per il passaggio trans-cis e ritorna allo stato stabile trans solamente con rilassamento termico al buio di diverse centinaia di millisecondi [33] [28].

### *Photoswitchable Affinity Labels (PALs)*

I PALs sono molto simili ai PTLs, con l'unica differenza che sul recettore specifico, il sito di affinità per il complesso photoswitch-ligando specifico è endogeno e, quindi, non è necessaria alcuna modifica genetica [44]. La maggior parte dei PALs si lega covalentemente a specifici canali K<sup>+</sup>, ma questo approccio risulta utile anche per inibire attività neuronali tramite recettori GABA<sub>A</sub> [45] o studiare attività e cinetiche dei recettori GPCRs [46], recettori che presentano già siti di affinità ai PALs.

Tuttavia, questo approccio non è molto esplorato nelle neuroscienze, tanto che il presente lavoro non ha trovato altri studi neuroscientifici al riguardo.

## **Studi recenti: osservazioni ed innovazioni**

La fotochimica, che vanta un settore scientifico risalente all'epoca industriale e quindi pioniera di innumerevoli studi, è uno dei possibili approcci con cui si possono controllare, tramite la luce, le attività nervose. È, però, merito del progresso tecnologico degli ultimi decenni, soprattutto in relazione alla microscopia laser 2P [31], se la fotochimica ha guadagnato il riconoscimento di cui oggi gode nel campo della stimolazione ottica.

Essa, infatti, consente di alterare tramite luce, con una risoluzione spaziale mai raggiunta in passato, le strutture di molecole chimiche, che hanno dimensioni inferiori di diversi ordini di grandezza rispetto a quelle delle proteine o delle cellule.

Pochi sono gli studi relativi alle neuroscienze che fanno uso di questo approccio fotochimico ricorrendo ai complessi photoswitch-ligando; la maggior parte degli studi, invece, prevede il ricorso a neurotrasmettitori caged fotoattivabili per i diversi intrinseci aspetti vantaggiosi.

Innanzitutto, i caged fotoattivabili non richiedono alcuna espressione genica esogena e, quindi, nessuna terapia genica.

Nonostante ciò, consentono di studiare, mappare e manipolare le connessioni funzionali delle sinapsi con una precisione spaziale e temporale non paragonabile a quella degli altri approcci, optogenetica compresa; è possibile regolare i potenziali a livello di singola sinapsi da remoto anche dopo diverso tempo dall'introduzione dei neurotrasmettitori caged, per merito anche degli sviluppi della microscopia laser 2P. Grazie alla notevole modellabilità delle gabbie, la loro ingegnerizzazione è un settore in continuo rinnovamento ed ogni anno vengono pubblicati numerosi studi in merito. Per di più, l'avvento degli idrogel [36] ha permesso di ingegnerizzare gabbie biodegradabili e biocompatibili, il che ha reso questo settore di ricerca molto più attraente di quanto non lo fosse una decina di anni fa.

Un ulteriore motivo che giustifica questa continua ingegnerizzazione è l'interesse che essa suscita anche in altri settori di ricerca che si

occupano del drug-delivery, sia a livello universitario che di aziende farmaceutiche.

Bisogna considerare, però, che questa metodologia di approccio, pur meno invasiva rispetto alle altre proposte in questo lavoro, comporta conseguenze irreversibili del photo-uncaging; può produrre sottoprodotti da smaltire; in caso di fotolisi ripetute o prolungate, aumenta il rischio di esaurimento locale del glutammato caged e, quindi, la necessità di continue perfusioni di questi neurotrasmettitori.

In altre parole, questo approccio non è consigliabile se si devono applicare treni di impulsi luminosi ad alte frequenze [13], elementi chiave della neurostimolazione. Attualmente, le gabbie più utilizzate e commercializzate sono CNB- e MNI-caged, ma è noto che la loro sintesi è piuttosto impegnativa [29].

Inoltre, c'è da sottolineare che la maggior parte di queste gabbie contiene neurotrasmettitori glutammato. Diversi studi, infatti, evidenziano la difficoltà di ingegnerizzare gabbie che contengano neurotrasmettitori differenti dal glutammato, in particolare GABA, perché si presentano spesso instabilità chimiche e comportamenti antagonisti prima che avvenga la fotolisi della gabbia [34] [47].

In alternativa ai neurotrasmettitori caged, si possono coinvolgere i PTLs, che sotto certi aspetti sono vantaggiosi e meno invasivi rispetto alle pratiche optogenetiche. Sebbene quest'ultime offrano standard di sicurezza e di efficacia maggiori in caso di modifiche genetiche, i photoswitches, come LiGluR, Ziapin2 e NanoParticles (NPs), meritano comunque l'attenzione da parte della comunità scientifica, perché consentono di studiare reti neurali da un punto di vista differente rispetto a quello dell'optogenetica.

I LiGluRs, infatti, sono capaci di innescare APs ad alte frequenze [42] a partire da una singola sinapsi di una spina dendritica; ciò lascia presupporre a chi scrive che, potenzialmente, introducendo proteine voltaggio sensing, come i GEVIs, ci sia la possibilità di osservare e tracciare la propagazione di segnali nervosi in intere reti neurali:

dall'inizio, dove sono posti i photoswitches, alla fine con alta risoluzione temporale e spaziale.

Un recente studio [48] ha sviluppato un PAL piuttosto differente ed innovativo rispetto a quelli già esistenti ed ai PTLs: senza alcuna modifica genetica e da una versione ingegnerizzata dell'azobenzene, si è ottenuto un anfifilico<sup>24</sup> azobenzene photoswitch, denominato Ziapin2.

Questo si interpone tra le estremità della membrana cellulare (Figura 11A) e, fotoisomerizzandosi ( $\lambda_{\text{peak}} \sim 470 \text{ nm}$ ), si restringe (Figura 11B) provocando un distanziamento tra le estremità della membrana e, di conseguenza, riducendone la capacitance<sup>25</sup>.

Ciò comporta robuste variazioni di potenziali tra -60mV e -30mV in una scala temporale compresa tra il ps ed il ns; quindi, Ziapin2 induce rapidissime iperpolarizzazioni.

Per contro, un completo rilassamento termico al buio per ritornare dal cis-state allo trans-state, nel quale si ristabilisce la capacitance di membrana ai livelli pre-stimolo, impiega circa 108 s. Ziapin2 ha mostrato la stessa efficacia sia *in vitro*, in una cultura di neuroni ippocampali, che *in vivo*, nella corteccia somatosensoriale murino.

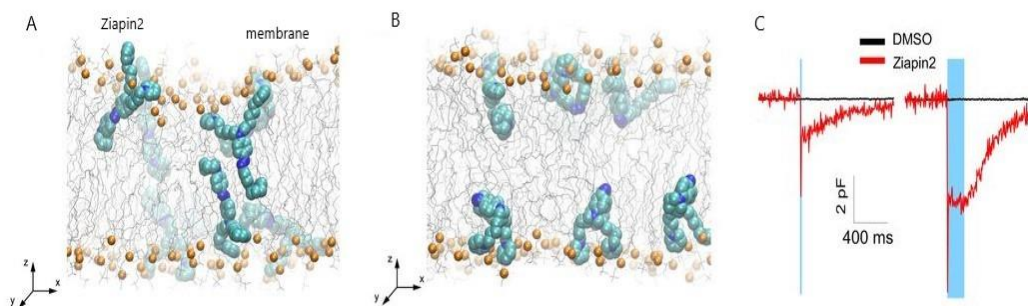


Figura 11

BioRxiv - A Membrane-Targeted Photoswitch Potently Modulates Neuronal Firing

<sup>24</sup> Una molecola anfifilica possiede sia un gruppo idrofilo sia uno idrofobo. Ne sono esempi i fosfolipidi [23].

<sup>25</sup> La capacitance di membrana è l'analogo elettrico della capacità. È espressa come  $\epsilon A/d$  [F];  $\epsilon$  = dielettricità del materiale contenuta tra le due superfici,  $A$  = area superficiale,  $d$  = distanza tra le due superfici

# Optogenetica

“The development of optogenetics cleanly splits neuroscience, and many other branches of science, into pre- and post-optogenetic eras.”

**Sheena A. Josselyn**

L'optogenetica è una tecnica scoperta nel 2002 da Miesenböck e dal suo team e considerata “Method of the year 2010” dalla rivista specializzata Nature Methods. [49]. Successivamente, altri scienziati di spicco come quelli del Deisseroth's lab, con i quali hanno collaborato anche Ed Boyden, Feng Zhang (uno degli inventori della tecnica CRISPR-Cas), Ernst Bamberg e Georg Nagel, hanno compreso le ulteriori potenzialità di questa tecnica, cui hanno dato il nome di “optogenetica” [50].

L'optogenetica, frutto di una interdisciplinarietà di studi di settore, quali la genetica, la biologia, l'optoelettronica e la bioingegneria, ha consentito un rapido sviluppo dell'imaging ottico e del targeting genetico di specifici tipi di cellule; in particolare, l'applicazione di questa tecnologia ai neuroni ha reso possibile visualizzare e manipolare circuiti neurali *in vivo*.

Tale tecnica consiste nell'introduzione di geni, solitamente di origine naturali a cui vengono poi apportate delle mutazioni, attraverso differenti approcci, che codificano opsine, proteine sensibili a determinate lunghezze d'onda della radiazione luminosa (in particolare a bande dello spettro del visibile) e proteine voltaggio-dipendenti fluorescenti, le quali, proprio grazie alla loro fluorescenza, permettono di essere individuate fornendo così informazioni circa l'intensità del potenziale di membrana.

L'optogenetica ha riscosso in breve tempo grande successo ed è, a tutt'oggi, un'indispensabile pratica in molti laboratori di ricerca, soprattutto delle neuroscienze; ciò è dovuto non tanto alla possibilità di stimolazione nervosa che offre, quanto alla possibilità di innescare o inibire potenziali d'azione nei neuroni con una risoluzione spaziale pari a quella cellulare e con scale temporali dell'ordine del

millisecondo<sup>26</sup> [51], consentendo la comprensione della funzione di numerosi circuiti neurali *in vivo* e di fenomeni patologici, oltre a dimostrare inesattezze di precedenti teorie neuroscientifiche, come la confutazione del ruolo svolto dall'area MPA [52]

[1] La pubblicazione di eminenti articoli relativi agli studi di optogenetica ha consentito:

- la comprensione del fatto che stati comportamentali complessi, come ansietà e depressione, emergono da piccoli tratti di stati individuali fisiologici<sup>27</sup> e dai circuiti neurali ad essi sottostanti. [53]
- l'identificazione di gruppi di engrammi<sup>28</sup>, in particolare dell'ippocampo [54], e lo stretto rapporto che intercorre tra loro e l'attività mnemonica in quegli stessi neuroni; gli engrammi sono, infatti, in grado di controllare l'integrazione e la separazione delle memorie [55]
- una maggiore comprensione del ruolo dei ritmi theta<sup>29</sup> nell'ippocampo, responsabili della codifica e decodifica della memoria [56];
- la dimostrazione dell'esistenza di specifici circuiti neurali su cui si basa la sopravvivenza dell'individuo: sonno, fame, sete, respirazione, ritmo circadiano, bilancio energetico ed istinto di difesa sono regolati proprio da specifiche mappe neurali [57];
- la determinazione di pattern di azioni motorie controllate da specifiche cellule e circuiti neurali, i quali ne regolano il funzionamento o il disfunzionamento, favorendo la comprensione di alcune malattie neurodegenerative come il Parkinson [58];
- la scoperta dei circuiti neurali della ricompensa nell'area ventrale tegmentale (VTA) : sono stati individuati, infatti, nel mesencefalo i neuroni responsabili del rilascio di dopamina che

---

<sup>26</sup> Sono tempi necessari ai neuroni per elaborare e scambiare informazioni con altri neuroni

<sup>27</sup> Per esempio cambiamento del ritmo respiratorio, temperatura corporea, pressione sanguigna, etc.

<sup>28</sup> Mappe neurali o tracce mnemoniche neurobiologiche che si "depositano" nel sistema nervoso sotto forma di variazioni biochimiche e biofisiche a seguito di apprendimento e di esperienze.

<sup>29</sup> Fluttuazioni dell'attività elettrica del cervello con frequenze comprese tra 5 e 12 Hz.

determinano il segnale di ricompensa, a partire dal semplice condizionamento di Pavlov [59], fino alle più complesse strategie di apprendimento [60];

- l'individuazione delle precise mappe neurali che regolano i comportamenti sociali animali, compresi l'accoppiamento e l'aggressività; tali mappe erano molto difficili da individuare, perché collocate nelle profondità del cervello [61].



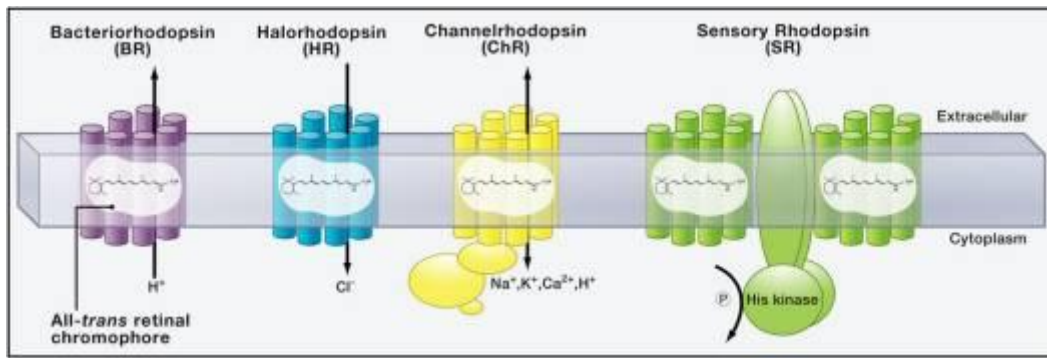


Figura 12 Cell - The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools

## Le opsine

La maggioranza dei geni utilizzati nell'optogenetica è di origine microbale; si tratta di opsine che codificano proteine fotosensibili che sono state trovate principalmente negli archea e nei batteri.

Ogni proteina opsina richiede l'incorporazione di un retinale, o aldeide della vitamina A, una delle tante varianti di vitamina A, che varia da specie a specie; è un importante cromoforo, che fornisce poi al complesso opsina-retinale la sensibilità alla luce; tale complesso costituisce la base chimica della vista ed è nominato rodopsina.

Quando la rodopsina assorbe un impulso di luce di una determinata lunghezza d'onda, il retinale cromoforo isomerizza l'intero complesso ed attua una serie di cambiamenti strutturali che guidano il trasporto ionico, l'apertura dei canali o le interazioni con proteine trasduttori di segnali [62].

I geni delle opsine sono divisi in due superfamiglie, molto differenti nelle sequenze genetiche, nel meccanismo e nelle funzionalità: opsine microbali (type I) ed opsine animali (type II). [63]

I geni delle opsine Type I sono stati trovati in procarioti, alghe e funghi e controllano diverse funzioni tra le quali il movimento fototattico, il deposito di energia, lo sviluppo e la biosintesi di retinali [64]. Quando i retinali vengono attivati dalla luce, essi rimangono associati con le opsine con un legame covalente ed invertono termicamente gli stati all-trans; questo fenomeno è, però, perfettamente reversibile ed è anche molto rapido<sup>30</sup>.

<sup>30</sup> Per tale ragione, queste rodopsine sono considerate potenti strumenti largamente usati nell'optogenetica, in particolare nel campo delle neuroscienze, proprio per modulare le attività nervose ad alte frequenze [175] [51].

Invece, le opsine type II si trovano solo negli eucarioti e sono responsabili della visione. Inoltre, una piccola parte di esse svolge importanti ruoli nel ritmo circadiano e nella regolazione dei pigmenti [65].

Le opsine type II consistono fondamentalmente in recettori accoppiati alle proteine G (GPCRs), perciò, quando vengono illuminate, si realizzano delle isomerizzazioni ed interazioni tra proteine che provocano una cascata di molecole messaggere; queste ultime trasmettono segnali biochimici, che andranno a trasdurre altre proteine.

Al contrario dei retinali delle rodopsine type I, questi retinali si dissociano dalle opsine II dopo l'isomerizzazione provocata dalla luce; perciò si tratta di un processo irreversibile e, a causa delle cascate di molecole messaggere, gli effetti cellulari cambiano con una cinetica più lenta rispetto alla cinetica che caratterizza le rodopsine type I<sup>31</sup>.

Le opsine microbiali (type I) rimangono, comunque, le più utilizzate per le seguenti ragioni: dipendono da un unico gene compatto (e quindi facile da introdurre nel genoma cellulare) responsabile della loro sensibilità alla luce e dei relativi effetti; in assenza di luce, non vi è risposta alcuna; le risposte avvengono con intensità e con lunghezze d'onda della luce ben tollerate e con scale temporali del millisecondo.

Le funzioni svolte dalle opsine usate nell'optogenetica sono: depolarizzazione ed iperpolarizzazione in presenza di luce, photosensing, fluorescenza in presenza di potenziali di membrana. Queste opsine comprendono:

### *Bacteriorhodopsins (BRs) - inibizione*

Consistono in pompe protoniche individuate nel *Halobacterium halobium* [66] e sono tra le prime ad essere state osservate e studiate. Vengono altamente espresse sulle membrane in

---

<sup>31</sup> Nonostante lo scarso utilizzo di queste rodopsine (type II) nell'optogenetica, a partire da quest'ultime, molti laboratori si dedicano allo sviluppo di opsine sintetiche e chimeriche, come le OptoXRs che servono per controllare complessi segnali biochimici nell'ambito di specifici eventi dipendenti dalla luce [176].

condizioni di basso ossigeno e, in presenza della luce, per mantenere un corretto gradiente di protoni sulla membrana cellulare ed una corretta produzione di ATP, traslocano protoni dal citoplasma al mezzo extracellulare [67].

### *Proteorhodopsins (PRs)- inibizione*

Opsine simili alle BRs in quanto pompe protoniche trovate in diversi proteobatteri marini con un fotociclo simile a quello delle BRs [68]. È stato osservato che le PRs tra le specie presenti a diverse latitudini, presentano una varianza di assorbimento tra le lunghezze d'onda del blu e del verde in funzione di un singolo residuo aminoacido. Al momento, i meccanismi interni di queste PRs sono poco conosciuti, per cui scarsa è la loro applicabilità nell'optogenetica.

### *Sensory Rhodopsins (SRIs - SRIIs) - photosensing*

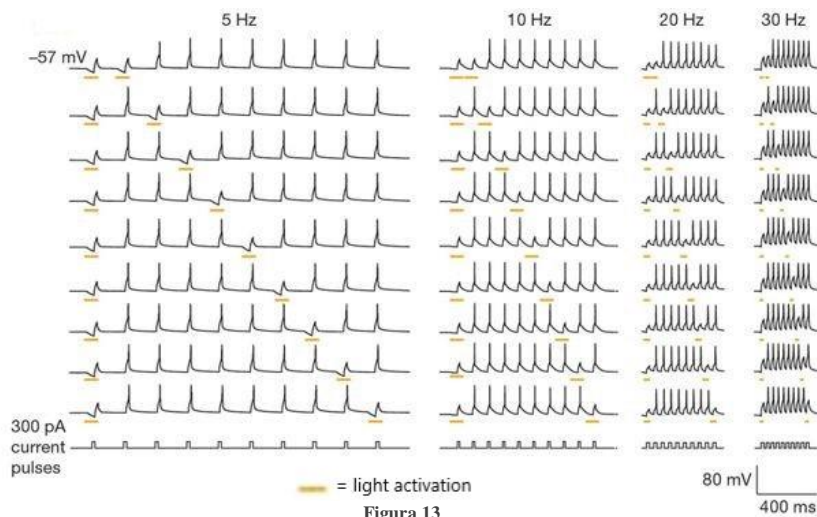
Identificate in *Halobacterium salinarum*, al quale permettono di essere fototattico. Il fotociclo di tali rodopsine è simile a quelle delle BRs con analogo trasporto interno di protoni [69]; nel caso in cui il batterio è stimolato dalla luce, le rodopsine subiscono delle variazioni strutturali, che, di conseguenza, innescano una cascata di fosforillazioni<sup>32</sup>.

### *Halorhodopsins (HRs)-inibizione*

Consistono in pompe cloruro, scoperte in diversi archeobatteri [70], tra cui il menzionato *Halobacterium halobium*. Il loro meccanismo è simile a quello delle BRs, con la differenza che le HRs pompano ioni cloruri dal mezzo extracellulare al citoplasma [71] [72]. La HR proveniente dal *Natronomonas pharaonis* (NpHR) è largamente utilizzata, perché capace di iperpolarizzare ad alte frequenze; se esposta agli impulsi di luce con lunghezza d'onda del giallo ( $\lambda_{\max}=570\text{nm}$ ), tale capacità consente di inibire il singolo spike di potenziale d'azione, a fronte di un treno di

---

<sup>32</sup> A seguito di queste, si determina nel batterio il movimento dei flagelli che, se la luce è giallo-verde (SRI, picco assorbimento: 587 nm), guidano l'organismo verso la fonte luminosa; al contrario, se la luce è blu, lo allontanano dalla sorgente (SRII, picco assorbimento: 487 nm) [177].



Nature - Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry

spikes (precisione temporale minore o uguale a 30 Hz), con una probabilità pari o superiore al 95% [73] [74], mentre, il flusso dei cloruri si interrompe rapidamente appena il fascio luminoso cessa. La Figura 13 mostra l'inibizione, tramite luce, a diverse frequenze di spikes innescati con impulsi di corrente indotta a 300 pA.

### Channelrhodopsins (ChRs)- eccitazione

Sono delle opsine uniche nel loro genere, scoperte nel 2002 (ChR1) [75] e nel 2003 (ChR2) [76] dal team di Nagel nell'alga verde *Chlamydomonas*, che le consentono di essere fototattica. Queste rodopsine fanno parte della categoria delle GPCRs<sup>33</sup>; esse conducono, in intervalli temporali dell'ordine del millisecondo, in maniera non selettiva cationi sia che bivalenti ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , e  $Ca^{2+}$ ); si precisa che esistono, comunque, delle ChRs che conducono selettivamente certi cationi e la conduttanza degli ioni nei ChRs (ed anche nelle ACRs che verranno menzionati successivamente) potrebbe dipendere dalla valenza complessiva della determinata ChR/ACRs e dalla distribuzione di residui carichi all'interno del poro.

Il ChR2 naturale può essere attivato rapidamente ( $\tau_{ON} < 250 \mu s$ ,  $\tau_{OFF} = 9.5 \pm 2.8 \text{ ms}$ ) in risposta ad un impulso di luce visibile ( $\lambda_{peak} \sim 470-490 \text{ nm}$  - blu) [51] [76] [77]. Quindi, questi canali, si aprono rapidamente dopo l'assorbimento di un fotone, depolarizzando la zona circostante per l'alta conduttanza di

<sup>33</sup> 7  $\alpha$ -eliche (7TM receptors) transmembrana

cationi e, se esposti in maniera continua alla luce o con una frequenza superiore a 20 Hz, si desensibilizzano con una bassa ma stabile conduttanza ( $\sim 0.25$  nA). Al cessare dell'illuminazione, la chiusura del ChR2 può essere accelerata dalla presenza di ioni  $H^+$  intracellulari.

I due aspetti maggiormente negativi di questa rodopsina sono che, primariamente, è necessaria una elevata espressione ChR2 perché la conduttanza di uno essi è di diversi ordini di grandezza inferiore (40fS) rispetto ai tipici ed endogeni canali ionici che controllano gli spikes nervosi (5-240pS) e ciò comporta un minimo di rischio che possano insorgere molteplici spikes in risposta ad un unico impulso luminoso, oppure possono insorgere spikes senza che ci sia alcuno stimolo luminoso, provocando implicazioni tra diversi potenziali in caso di interazioni nervose (Figura 14); secondariamente, molte cellule dotate di ChR2s non riescono ad innescare spikes correttamente, in risposta ad un treno di impulsi con frequenze maggiori di 40 Hz [51] [78].

Perciò, ancora oggi, in base alle esigenze dell'optogenetica, queste rodopsine, dette anche “bi-stable switches”, vengono continuamente ingegnerizzate per migliorarne le performances, quali il tempo di chiusura del canale, il flusso degli ioni e la selettività a determinate lunghezze d'onda ed ad ioni [79] [80], in considerazione del fatto che queste ChR sono state modellate dalla natura nel corso di miliardi di anni perché altamente flessibili. Nel campo delle neuroscienze [81], infatti, si cerca di ingegnerizzare una ChR che abbia un  $\tau_{OFF}$  nell'ordine del nanosecondo [82], in modo da manipolare arbitrariamente e selettivamente singoli neuroni prima che arrivino informazioni da neuroni adiacenti.

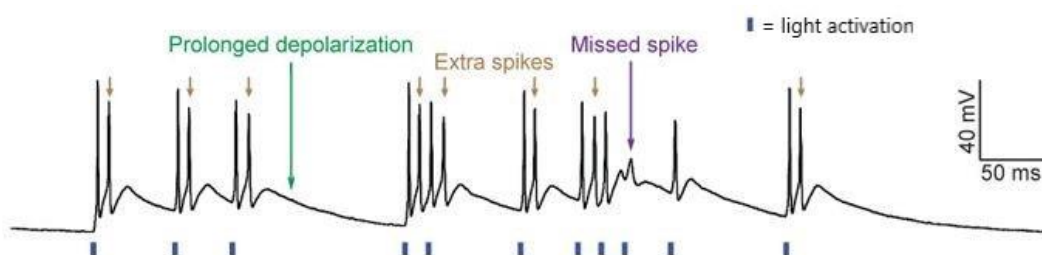


Figura 14

Nature Neuroscience - Ultrafast optogenetic control

Principali ChRs ingegnerizzate sono mostrate nella Figura 15<sup>34,35</sup> e quelli che ne vale la pena citare sono:

### VChR1

-naturale -  $\tau_{\text{off}} = 119.7 \pm 9.7$  ms

È la prima rodopsina scoperta che presenta una fotocorrente, seppur bassa (<100 pA), nonostante la sostanziale redshift (>560 nm) della luce, cosa che nel ChR naturale è pressochè nulla [83] [77];

### Famiglia di C1V1- ChR

-naturale

Ha consentito per la prima volta l'optogenetica combinatoria: queste rodopsine, infatti, rispondono indipendentemente a due differenti lunghezze d'onda (blu e rossa), entrambe espresse sulla membrana di una stessa cellula senza che le loro caratteristiche si alterino tra di loro [84] [77];

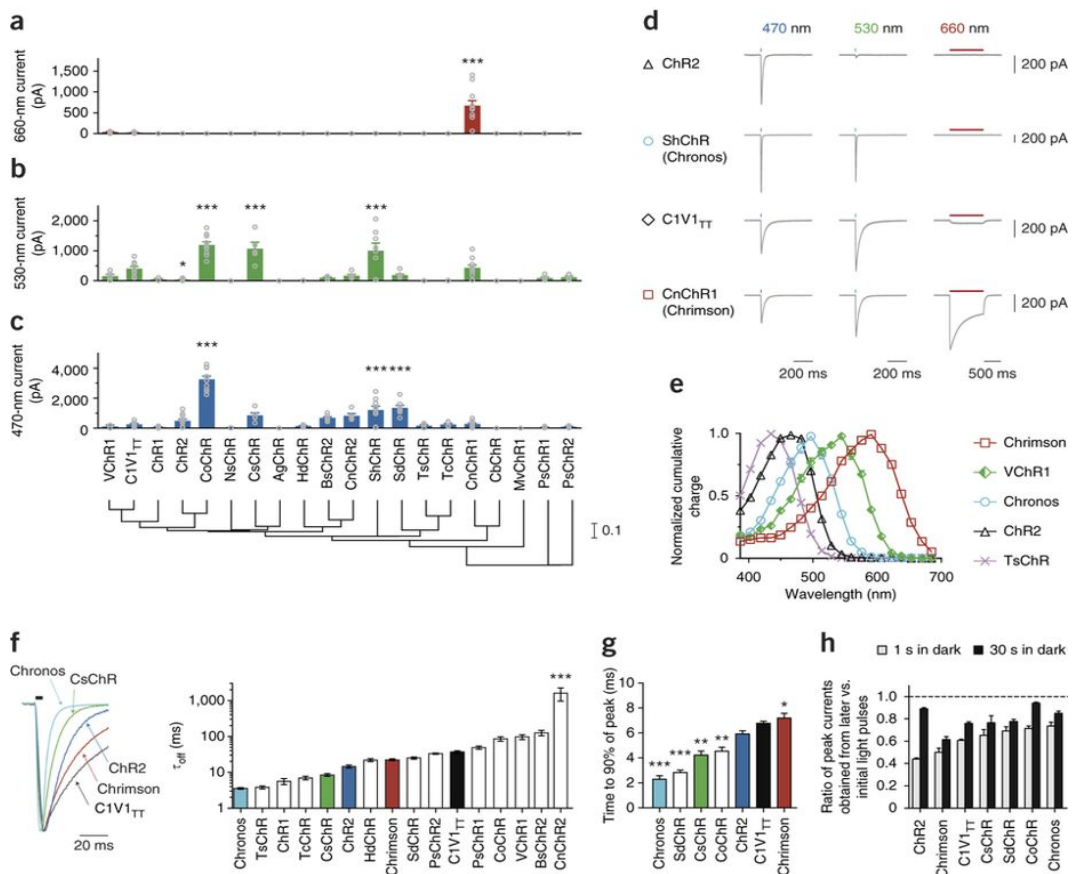


Figura 15

Nature Methods - Independent optical excitation of distinct neural populations

<sup>34</sup> Nella Figura 15 non vengono mostrati le prestazioni di CheTa, CatCh e ReaChR

<sup>35</sup> Fig.5: Proprietà delle cinetiche di diverse Channelrhodopsin in culture di neuroni. a-c) Fotocorrenti massime e) action spectra. f) Off-kinetics under the conditions in a-c. g) on-cinetica. h) cinetica di recovery

## ReaChR

-naturale -  $\tau_{\text{off}} = 361.0 \pm 75.8$  ms

È tra le prime ChRs che possono essere attivate in maniera ottimale con la luce arancione-rosso ( $\lambda \sim 590-630$  nm) ed offrire miglioramenti nella fotocorrente e cinetiche migliori rispetto ai precedenti red-shifted ChRs. Considerando che la luce rossa subisce meno scattering quando attraversa i tessuti ed è meno assorbita dal sangue rispetto alle lunghezze d'onda del blu/verde, è lecito che questo tipo di rodopsine abbiano un importante ruolo in moltissimi settori dell'optogenetica. Nel caso delle neuroscienze, sarebbe, infatti, possibile studiare anche zone remote del cervello quali diencefalo o tronco encefalico, grazie all'attivazione delle ReaChRs poste in queste zone, senza il ricorso ad operazioni chirurgiche transcraniche, come l'introduzione di fibre ottiche [85] [77];

## Catch

-naturale

Si tratta di una ChR molto simile al ChR2, ma con una maggiore permeabilità al calcio e conseguente alta intensità di corrente [77] [82] [86];

## CheTa

-mutante -  $\tau_{\text{off}} = 4.4$  ms

È la rodopsina che per prima ha permesso il raggiungimento di importanti traguardi nel settore delle neuroscienze: caratterizzata, infatti, da una rapida ripresa dall'inattivazione del canale, da una maggiore stazionarietà temporale e da una lieve red-shift di 20 nm rispetto al ChR2 naturale ( $\lambda=470$  nm), ad alte frequenze di treni di impulsi luminosi (50-200 Hz) la riduzione di eventi spuri di extra spikes e di artefatti da plateaux di potenziali risulta notevole. Ciononostante, CheTA presenta una lieve riduzione del picco di corrente [78] e, per frequenze minori a 50 Hz, le sue prestazioni diminuiscono drasticamente, tanto da rendere più conveniente il ricorso alle ChR2s;

## Chronos

-mutante -  $\tau_{off} = 3.6$  ms

presenta un'alta precisione temporale ed una cinetica maggiore rispetto alle varianti ChRs; è una opsina ultra-light-sensitive blue che viene largamente usata per le sue eccellenti proprietà a fronte di un uso generico di channelrhodopsin [87];

## Chrimson

-naturale -  $\tau_{off} = 24.6 \pm 0.9$  ms;

-mutante K176R/Y261F/S267M

(vf-Chrimson)

$\tau_{off} = 2.7 \pm 0.3$  ms;

-mutante Y261F/S267M (f-Chrimson)

$\tau_{off} = 5.7 \pm 0.5$  ms.

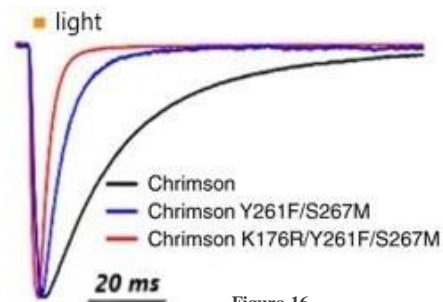


Figura 16

Nature Methods - High frequency neural spiking and auditory signaling by ultrafast red-shifted

Sono le ChRs di ultima generazione, sono caratterizzate da una maggiore dipendenza lineare del voltaggio della fotocorrente e presentano un red-shift maggiore rispetto a tutte le precedenti ChRs conosciute ( $\lambda = 594$  nm), che consente una maggiore penetrazione nei tessuti.

In particolare poi, le versioni mutanti, rispetto a quella naturale, presentano un'alta espressione di membrana ed una accelerata cinetica di chiusura (Figura 16), consentendo un'elevata e stabile precisione di risposta a livello temporale [77] [82] [87].

Lo studio [77] fa notare che, in una popolazione di neuroni ippocampali di ratto ad una temperatura di  $34^{\circ}\text{C}$ , f-Chrimson presenta  $\tau_{off} = 3.2 \pm 0.2$  ms, mentre vf-Chrimson presenta  $\tau_{off} = 1.6 \pm 0.1$  ms.

Per tale ragione, data l'elevatissima cinetica di queste ChRs mutanti, esse sono dei potenziali mezzi che in principio possono attivare una fotostimolazione neurale per un range di frequenze che arriva ai 600 Hz. Lo studio, inoltre, riporta risultati promettenti riguardo l'utilizzo del f-Chrimson in topi affetti da sordità, perché, al contrario della vf-Chrimson, f-Chrimson può essere stimolata con impulsi luminosi a bassa intensità ( $0.65 \pm 0.31$  mW/mm<sup>2</sup> per f-Chrimson;  $1.25 \pm 1.02$  mW/mm<sup>2</sup> per vf-Chrimson) con una probabilità che si avvicina al 100% di innesco di uno spike per ogni impulso; mentre nel caso di vf-Chrimson si possono innescare extra



spikes a frequenze di 80 e 100 Hz con un 28% di probabilità, valori che possono compromettere sostanzialmente la fedeltà della fotostimolazione neurale. Per tale ragione, f-Chrimson, chi scrive ritiene che questa ChR potrebbe risultare promettente per quanto riguarda la durata delle batterie necessarie all'emissione di impulsi luminosi originati da microlaser.

### *Anion-conducting channelrhodopsins (ACRs – inibizione)*

Le prime ACRs [82] [88], chloride-conducting channelrhodopsins (ChloCs) sono state ottenute da un'ingegnerizzazione della ChR2 [89], con la rimozione di aminoacidi carichi negativamente dal poro del canale. In questo modo, in risposta all'impulso luminoso, c'è un maggiore influsso nel citoplasma di cariche negative (ioni cloro), inducendone una iperpolarizzazione nelle prossimità della rodopsina. Per via della natura generale dei cloruri, l'uso delle ACRs come strumento di silenziamento rimane fortemente dipendente dai cloruri stessi in maniera locale, per poter manovrare (“shunting”) la depolarizzazione di membrana o inibire l'eccitazione [90].

Successive modifiche e scoperte di ulteriori rodopsine in altri organismi, che funzionalmente svolgono lo stesso ruolo del ChloCs, hanno consentito l'impiego di nACRs/dACRs (rispettivamente naturale e sintetico) con caratteristiche differenti in base alle esigenze della optogenetica; vale la pena citarne almeno un paio:

- *GtACR1* [88]: di origine naturale, proveniente dall'alga *Guillardia theta*, presenta una elevata selettività agli anioni;
- *FLASH* [88]: una delle versioni mutate di *GtACR1* più promettenti, presenta una rapida risposta alla soppressione di singoli spikes (con un treno di impulsi fino a 40 Hz), una elevata tollerabilità ed efficacia a livello di espressione su membrana, una  $V_{rev}$ <sup>36</sup> di iperpolarizzazione dovuta dall'alta selettività agli anioni (infatti la superficie extracellulare del *FLASH* è maggiormente elettropositiva rispetto a quella della

---

<sup>36</sup> Potenziale di reversione

versione naturale) e, infine, una rapida off-cinetica ( $\tau_{\text{off}} \sim 14\text{ms}$ ).

### Genetically encoded voltage indicator (GEVI)

Si tratta di una tipologia di proteina ingegnerizzata<sup>37</sup> che può rilevare attività elettrofisiologiche [91], ovvero il potenziale di membrana in una determinata cellula, ed emettere tale segnale sottoforma di segnale luminoso fluorescente. Con i GEVIs è possibile registrare simultaneamente e distintamente gruppi di oltre 500 neuroni [91] in uno spazio tridimensionale attraverso diverse modalità di scansione multiphoton laser, il tutto in animali svegli e preservando le strutture cellulari. Una delle caratteristiche che ha permesso la larga utilizzazione di questa tipologia di proteina, è che può essere introdotta in maniera mirata a qualunque stadio di sviluppo di un organismo ed in specifiche regioni cerebrali, in determinati tipi di cellule o in precisi compartimenti subcellulari [92].

Inoltre, usare queste proteine permetterebbe di evitare l'uso convenzionale di tecniche quali patch clamp<sup>38</sup> o array di microelettrodi (MEAs<sup>39</sup>), perché possono alterare la struttura e sono piuttosto invasivi *in vivo*.

La prima generazione di GEVIs<sup>40,41</sup> era caratterizzata, però, da una bassa risposta ottica a fronte di potenziali d'azione ( $\sim 1\% \Delta F/F$ <sup>42</sup>) e da una cinetica voltage-sensing molto lenta ( $>20\text{ ms}$ ) e, quindi, non rispondeva correttamente né ai singoli potenziali d'azioni, né ai potenziali sottosoglia, innescati da un treno di impulsi a medie frequenze. Uno studio [93] riporta anche casi di fototossicità e fotobleaching per ottenere un rapporto SNR comparabile ai GECIs (Genetically encoded calcium indicator), perché è stato impiegato un

---

<sup>37</sup> Va sottolineato che in natura, fino ad ora, non è stato scoperto nessun organismo con una proteina che svolge una funzione del genere

<sup>38</sup> Gli elettrodi patch possono misurare sia i potenziali d'azione che sottosoglia, ma ne tracciano solo in piccolo numero di neuroni per volta.

<sup>39</sup> Tracciano i potenziali di centinaia di neuroni simultaneamente, consentendo un'alta risoluzione spaziale ma i segnali rilevati non sono spesso chiari, perciò sono necessari ulteriori strumenti, come algoritmi, per decodificare i segnali nervosi.

<sup>40</sup> La prima generazione usava proteine voltaggio dipendenti, cioè i voltage-sensing domain (VSD).

<sup>41</sup> Il primo GEVI, nominato FlaSh<sup>41</sup> ( $\Delta F/F: <5\%$ ), consisteva in una fusione tra un canale voltage-sensitive  $K^+$  (Shaker), che si comporta come un trasduttore elettromeccanico, ed un green fluorescent protein (GFP), che fungono da trasduttori optomeccanici [91].

<sup>42</sup> Rapporto di variazione fluorescenza rispetto allo stato di riferimento

imaging a potenze di eccitazione maggiori di diversi ordini di grandezza, compromettendone l'intero imaging ottico.

Per tale ragione, fino alla fine degli anni '90, si utilizzavano maggiormente i GECIs: queste sono proteine offrono prestazioni migliori, come l'accuratezza temporale, rispetto ai primi GEVIs, ma, per contro, misurano solo gli eventi associati a flussi di ioni calcio, che non sempre tracciano le iperpolarizzazioni o depolarizzazioni sottosoglia; per di più, sono limitate da una lenta cinetica di ripresa e, quindi, non rispondono in maniera precisa a rapidi treni di spikes AP [94].

La Figura 17 mostra le cinetiche dei segnali di GEVIs (sinistra) e dei GECIs (destra), registrate *in vivo* in diverse regioni subcellulari di un *Drosophila* interneurone visivo; l'imaging è effettuato con microscopio two-photon [95].

Perciò, ancora oggi, visto che non sono stati scoperti in natura modelli di riferimento naturali di GEVIs, c'è una forte competizione in quest'area di ricerca, che sfrutta i finanziamenti anche della DARPA [93], tesa ad ingegnerizzare GEVIs affinché presentino da una parte

performances quali la luminosità, la fotostabilità, la sensibilità, la cinetica e la risposta lineare e dall'altra compatibilità quali la tossicità, la localizzazione su membrana e l'adattabilità all'imaging deep-tissue. Perciò, lo scopo è sviluppare GEVIs che abbiano un SNR<sup>43</sup> più elevato possibile, cioè che il segnale utile possa essere più robusto possibile e facilmente individuabile dai microscopi ottici.

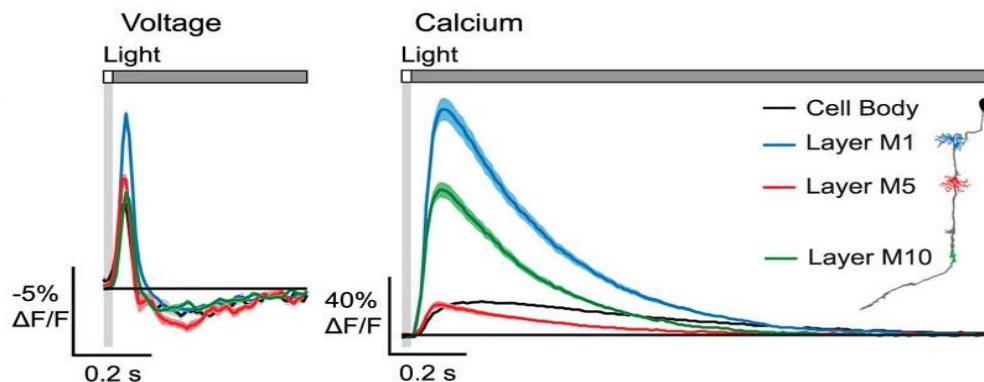


Figura 17

The Journal of Neuroscience - Genetically Encoded Voltage Indicators:  
Opportunities and Challenges

<sup>43</sup> Signal-to-noise ratio

A partire dagli anni 2010, sono state create uno dopo l'altro promettenti GEVIs di una nuova classe: *fluorescence resonance energy transfer opsin* (FRET-opsin) ed indicatori elettrocromici-FRET [96]. Entrambi sono costituiti, come elemento sensibile al voltaggio di membrana, da una rodopsina che attribuisce al complesso una rapida cinetica [91], ma la differenza sta che, come marcatore, la prima usa una proteina fluorescente (FP) mentre la seconda un fluoroforo<sup>44</sup>. Questa classe di GEVIs mostra delle capacità mai raggiunte prima.

Tra le attuali GEVI con le migliori prestazioni ci sono:

### Ace2N-2AA-mNeon<sup>45</sup> – FRET-opsin-based

Lo studio [93] ha riportato che questa proteina detiene un picco di  $\Delta F/F$  % del -3% per AP in neuroni corticali visivi murini: seppur la sensibilità non sia modesta, tale proteina gode, in compenso, di una cinetica *in vivo* superiore a tutti i GEVIs conosciuti, infatti, la sua accuratezza temporale è molto elevata è ( $0.24 \pm 0.01$  ms).

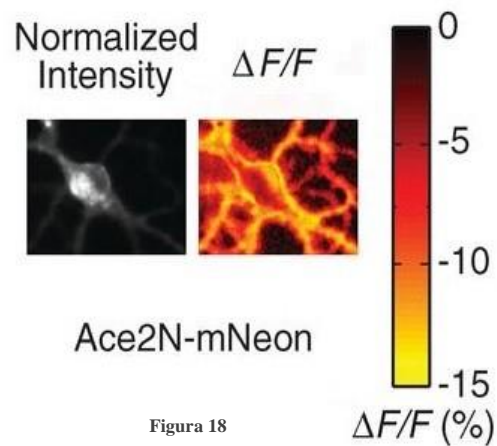


Figura 18  
Science - High-speed recording of neural spikes in awake mice and flies with a fluorescent voltage sensor

Inoltre, con opportune modifiche di filtraggio imaging, Ace2N-2AA-mNeon mostra un'ampiezza normalizzata massima del 20% SNR, corrispondente in larga parte al soma, (Figura 18). Grazie a queste peculiarità, è possibile tracciare *in vivo* (in moscerini della frutta e topi) rapide dinamiche dei potenziali neurali<sup>46</sup>, potenziali sottosoglia, potenziali dendritici sensory-evoked e back-propagating e le propagazioni dei potenziali appena citati. Ciò ha permesso la

<sup>44</sup> I fluorofori, o fluorocromo, sono dei composti che possono agire anche da soli, ma in generale sono spesso legati covalentemente a macromolecole, fungendo da marcatore per affine (tintura) o per reagenti bioattivi (anticorpi, peptidi o acidi nucleici).

<sup>45</sup> mNeon è una GFP, mentre Ace è una rodopsina proveniente dall'alga *Acetabularia acetabulum*

<sup>46</sup> Lo stesso studio riporta il corretto funzionamento a fronte di un treno di impulsi con frequenze che raggiungono i 75 Hz [93]

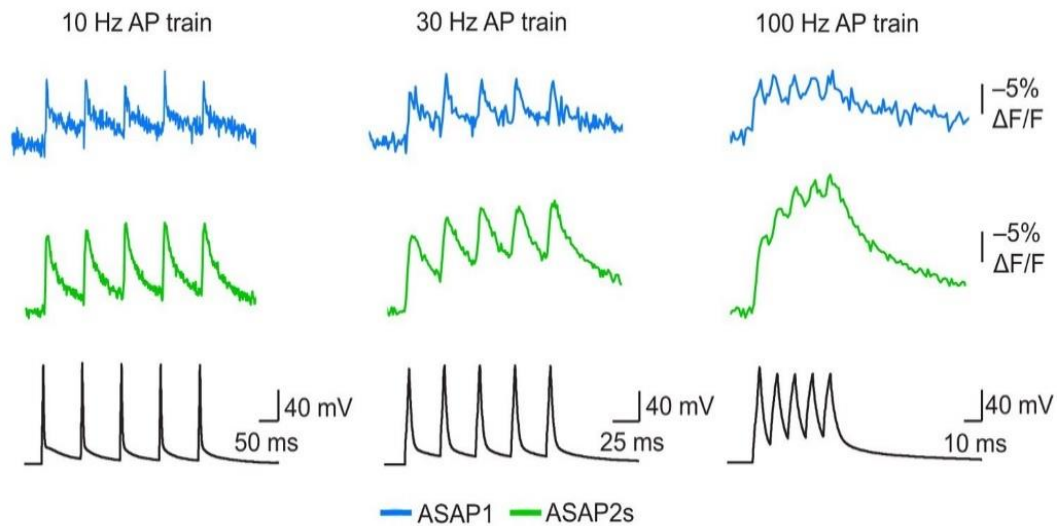


Figura 19

eLife - Fast two-photon imaging of subcellular voltage dynamics in neuronal tissue with genetically encoded indicators

possibilità di una diretta visualizzazione di fenomeni temporali molto complessi come la plasticità, la codifica di informazioni e i tracciati neurali.

### ASAP2s - VSD-based

Versione migliorata della proteina ASAP1<sup>47</sup>, ASAP2s presenta un picco  $\Delta F/F_0$  di -38% a fronte di un AP [97], ma si riscontra un calo della cinetica, a causa della mutazione indotta, da 2.9 di ASAP1 a 5.2 ms; perciò, sotto treno di impulsi di spikes AP ad alte frequenze, la proteina non è in grado di tracciare linearmente il potenziale di membrana, come si evince dalla Figura 19.

Lo studio [97] ha dimostrato anche l'ottimo funzionamento di ASAP2s sotto scansione di un microscopio two-photon con una velocità di acquisizione fino a 1kHz, il che permette di tracciare attività neurali dell'ordine del millisecondo e con una risoluzione spaziale ottima per un imaging subcellulare, senza che avvenga il fotobleaching, situazione che si riscontra durante un imaging one-photon.

### FlareFRET - eFRET-opsin-based

Questa classe di proteine, classificate come fluorophore ligation-assisted rhodopsin eFRET (FlareFRET), consiste nell'impiego di differenti tinture sensibili a diverse lunghezze d'onda e soggette a

<sup>47</sup> ASAP1 fa parte della prima generazione VSD-based GEVI, ha un picco  $\Delta F/F_0$  di -23% a fronte di un AP.

rapide cinetiche. Lo studio [98] è partito da una fusione (Ace-L1) di un ligando accettore peptide (LAP) nel primo loop della rodopsina Ace, esposta all'ambiente extracellulare; poiché i reagenti (le tinture) non sono permeabili alla membrana cellulare, essi permettono un imaging della sola superficie cellulare. Tra le diverse combinazioni di tinture ed Ace, la proteina Ace-L1-Cy3 (Figura 20.A) si è dimostrata la più performante a fronte di impulsi ottici ( $\lambda = 561 \text{ nm}$ ) in termini di variazione di fluorescenza ( $\Delta F/F$ :  $-35.9 \pm 0.8 \%$ ) ed accuratezza temporale ( $\tau = 0.92 \pm 0.03 \text{ ms}$  per depolarizzazione;  $\tau = 1.41 \pm 0.04 \text{ ms}$  per iperpolarizzazione), rispetto alle altre alternative GEVIs (Ace2N-2AA-mNeon in Figura 20.B)

Questi risultati, però, sono stati effettuati su una coltura di neuroni, perciò si dovrà attendere che il team di tale studio utilizzi queste proteine *in vivo*.

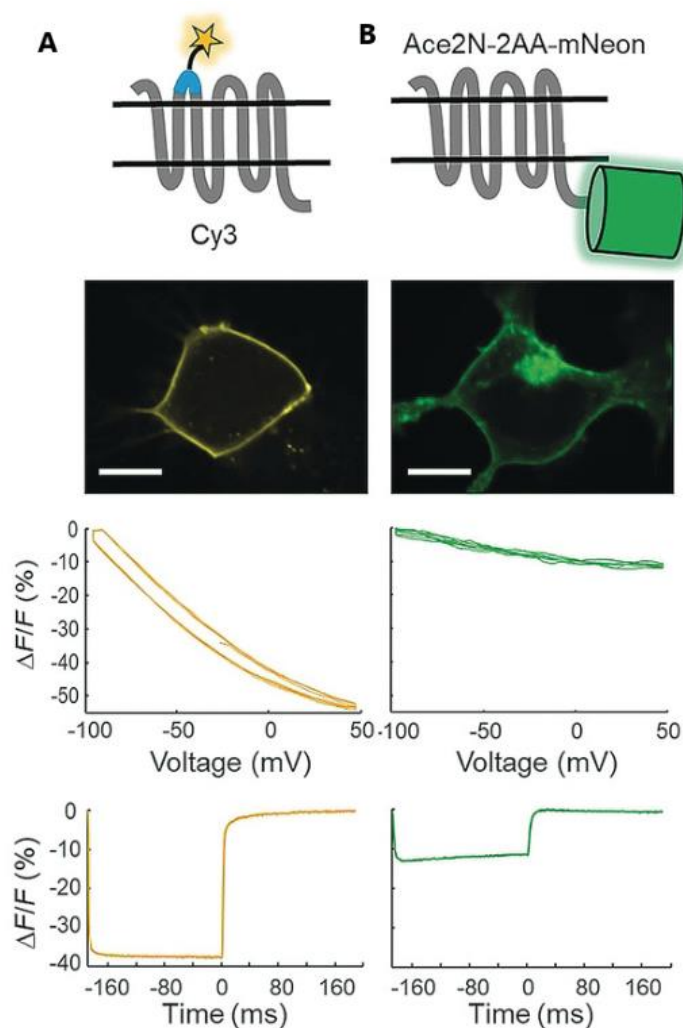


Figura 20

## *I mezzi utilizzati*

Esistono diversi approcci per inserire i geni che codificano le proteine precedentemente elencate, ma la scelta dell'approccio dipende fortemente dalla funzione che dovrà svolgere la determinata proteina espressa nella cellula.

I fattori che influenzano l'efficacia dell'espressione transgenica sono il numero di copie di transgeni per cellula, la scelta del promotore o la sequenza di inserzione, l'uso del codone, la presenza/assenza di introni e se la proteina che il gene deve esprimere è di membrana o è solubile [99]. Tali fattori sono cruciali per il tipo di gene da introdurre e ciascuno di essi richiede differenti livelli di espressione per ottenere gli effetti desiderati.

Per esempio, nel caso di ChRs, canali ionici in genere a bassa conduttanza, è necessario un gran numero di queste proteine espresse sulla membrana per poter propagare in maniera contigua la stimolazione indotta dall'impulso luminoso; perciò servono vettori virali che introducano copie multiple di tale transgene; contrariamente, in caso di un enzima che è attivo in basse concentrazioni e che singolarmente può alterare l'intero funzionamento della cellula, deve essere espressa in maniera di gran lunga minore.

Gli approcci generalmente utilizzati per la transgenesi sono: il gene-delivering, ovvero l'uso di vettori virali e non virali in caso di approccio chimico; elettroporazione, fotoporazione, microiniezioni e magnetofezione per un approccio fisico [99]. Quelli più utilizzati nel campo dell'optogenetica sono [100]:

### *Elettroporazione*

Tramite una lieve scarica elettrica operata in una cuvetta, la membrana plasmatica si apre simultaneamente in numerosi punti, permettendo alle molecole ed al materiale genetico di penetrare. Solitamente, in optogenetica, questa tecnica viene applicata solo nella fase embrionale di piccoli mammiferi come i topi [100], nei cui cervelli vengono introdotti plasmidi<sup>48</sup> quando sono ancora in utero e

---

<sup>48</sup> DNA senza capsid

che, di seguito, vengono guidati tramite stimolazioni elettriche. Questa tecnica ha il vantaggio di essere rapida, semplice ed economica; inoltre, consente di usare plasmidi con un payload di materiale genetico quantitativamente maggiore rispetto ai vettori virali convenzionali.

È bene sottolineare, però, che non tutte le zone anatomiche sono indagabili con questa tecnica e, considerando che i plasmidi non si integrano nel DNA ospite, essi si perdono durante la divisione mitotica; perciò i neuroni formatasi al momento dell'elettroporazione conterranno i plasmidi per tutto il ciclo vitale, mentre gli altri no.

### Vettori virali

Esistono due categorie di vettori virali, ovvero vettori virali RNA-based e DNA-based; la scelta dell'uno o dell'altro dipende dallo studio che si vuole affrontare. Mentre i primi risultano utili per un uso temporaneo, in quanto espressi rapidamente perché già pronti all'uso come se fossero dei farmaci, i secondi si integrano nel genoma dell'ospite in maniera permanente e stabile, come se fossero dei geni già presenti prima dell'applicazione. Tra quest'ultimi, i più utilizzati includono gli adeno-associati virus (AAV): potenti mezzi per espressione di transgenesi che, in assenza di virus helper co-infettanti (AdenoVirus), sono difettivi, cioè non sono in grado di replicarsi. Grazie a questa peculiarità, non si realizzano successive infezioni indesiderate e, grazie all'azione di proteine ricombinasi Rep, gli AAV si integrano nel genoma dell'ospite in maniera sito specifica. Alcuni limiti associati a questo approccio sono i rischi, seppur minimi, di carcinogenicità, di tropismo<sup>49</sup> e di immunogenicità [100]. Inoltre, per le ridotte dimensioni dei vettori virali, i loro payload sono piuttosto inferiori rispetto a quelli non virali e la loro produzione risente di difficoltà tecniche legate ai tempi di fabbricazione. Nonostante ciò, i virus, essendo frutto dell'evoluzione di miliardi di anni, sono estremamente efficienti per quanto riguarda il gene-delivering in mirati organismi e sono oggetti di continue ricerche per aumentarne la sicurezza e selezionarne le specificità; a

---

<sup>49</sup> movimento di vettori in zone non desiderate



dimostrazione di ciò, sono già attivi trial clinici su terapie geniche, che coinvolgono l'uso di vettori virali, in particolare AAVs [101].

### Vettori sintetici

Esistono numerosi vettori non virali che negli ultimi anni hanno dimostrato di possedere enormi potenziali per il gene-delivering e di costituire valide alternative ai vettori virali, ove quest'ultimi non possono essere applicabili [102]. Tra questi vettori, risultano degni di nota i liposomi, i polimeri e le nanoparticelle. Queste ultime sono sempre più ingegnerizzate, al punto da essere nominate intelligent NPs (Figura 21), per via della sinergia che si instaura tra la parte inorganica (come nanoparticelle di oro, ossidi di ferro e quantum dots (QDs) che forniscono proprietà ottiche, elettriche e magnetiche) e quella organica (come catene polimeriche, a cui si legano recettori e plasmidi) [12]. Tendenzialmente, i NPs hanno minore immunogenicità, maggiore payload e sono più economici e semplici da fabbricare. Tuttavia, la loro efficacia non è sempre paragonabile a quella dei vettori virali; persistono ancora, infatti, diverse difficoltà tecniche, quali la degradazione del materiale genetico da parte di agenti esterni, come macrofagi o eritrociti nel mezzo extracellulare [100], e la compromissione del flusso sanguigno dovuta alla presenza dei vettori stessi, che può indurre inibizione nei siti in cui quei vettori dovrebbero andare a legarsi per rilasciare materiale genetico.

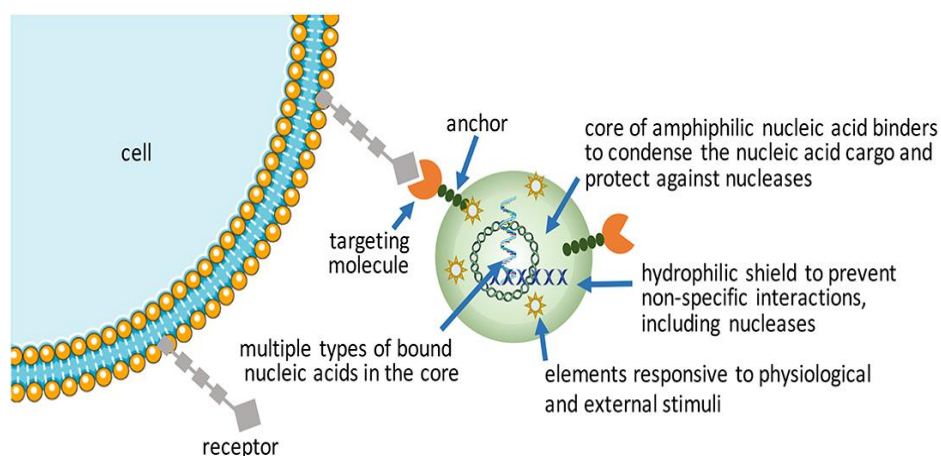


Figura 21

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology - At the Intersection of Biomaterials and Gene Therapy: Progress in Non-viral Delivery of Nucleic Acids

## **Risultati ottenuti con l'optogenetica**

Gli enormi sviluppi dell'optogenetica hanno sostenuto e sosterranno ancora numerosi settori di ricerca, come la rigenerazione dei tessuti e lo sviluppo di impianti bionici ottici, che possono ripristinare funzioni sensoriali come la vista [103] e l'udito; hanno rivoluzionato gli approcci di studio, in particolare nelle neuroscienze, perché offrono la possibilità di studiare sistemi complessi come il cervello mammifero con una precisione spaziale e temporale mai raggiunta prima, sia *in vitro* che *in vivo*; inoltre, gli sviluppi nell'optogenetica consentono di evitare l'uso di agenti farmacologici come GABA recettori agonisti e bloccanti canali sodio-potassio, che possono avere pesanti ricadute ed effetti collaterali, e l'uso di quelle tecniche imprecise ed invasive come il raffreddamento locale e l'inserimento di elettrodi/pipette.

Per esempio, il fatto che si possono introdurre nelle cellule vettori virali contenenti geni che codificano sia ChRs che NpHR, ha reso più facile lo studio di determinati circuiti neurali, dal momento che riescono a coesistere in maniera perfettamente stabile e a rispondere a lunghezze d'onda differenti, formando un sistema completo multimodale, ad alta velocità e geneticamente mirato [74]. Uno studio [73] ha riportato che, tramite questo approccio, è possibile controllare la locomozione bidirezionale dei muscoli e dei motoneuroni colinergici del verme *Caenorhabditis elegans*, attivando anche contemporaneamente sia NpHRs che ChR2s<sup>50</sup>. Altri studi fanno ricorso a simili approcci, utilizzando modelli animali come topi o moscerini della frutta *Drosophila* [104] per lo studio dei neuroni che guidano la fame o l'apprendimento avversivo.

Uno studio [52] effettuato sui topi, il cui video è diventato rapidamente virale, ha mostrato l'efficacia della sinergia tra la tecnologia elettronica-informatica e l'optogenetica; tale sinergia ha permesso di contraddire diverse ipotesi riguardo un'area cerebrale

---

<sup>50</sup>Quando ci sono impulsi con lunghezza d'onda del blu, si attivano ChR2s provocandone depolarizzazioni e di conseguenza APs; mentre, quando ci sono impulsi con lunghezza d'onda del giallo, si attivano NpHRs provocandone depolarizzazioni. Nel caso ci fossero impulsi di entrambe le lunghezze d'onda, non si innescano APs.

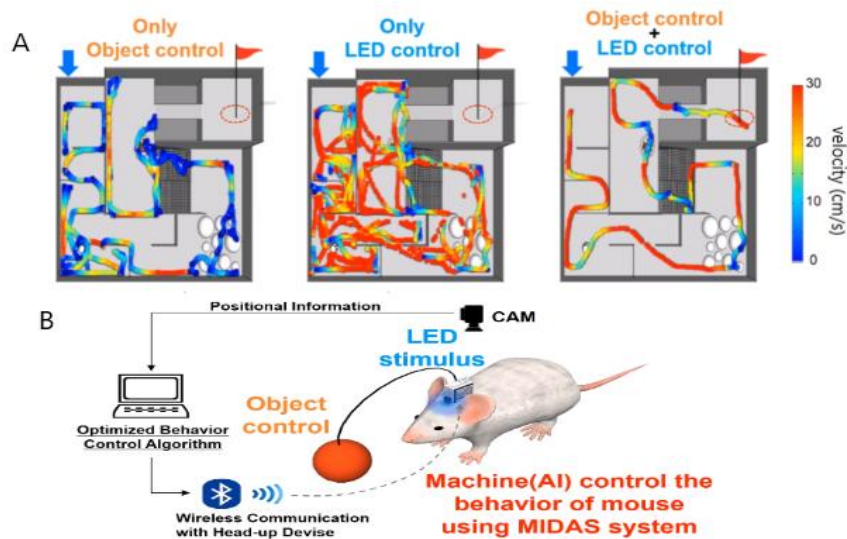


Figura 22

Nature Neuroscience - Medial preoptic circuit induces hunting-like actions to target objects and prey

ritenuta responsabile del comportamento sessuale; indagando tali circuiti neurali (medial preoptic area MPA) che si proiettano poi su ventral periaqueductal gray (vPAG), si è rilevato che in realtà essi sono implicati nel comportamento predatorio/ludico e non in quello sessuale. Nel topo vengono introdotti AAVs contenenti le ChR2s con relativi promotori, mirati ai neuroni del MPA; sulla sua testa viene, inoltre, installato un microcontrollore dotato di dispositivo bluetooth e di fibra ottica per stimolare i neuroni, controllati da remoto; al microcontrollore è collegato anche un servomotore che controlla una pallina che funge da obiettivo/preda (Figura 22.B). Il topo, sotto stimolazione indotta, riesce ad oltrepassare tutti gli ostacoli incontrati inseguendo la preda-pallina guidata dall'algoritmo-operatore esterno, in un intervallo temporale nettamente inferiore rispetto a quello che impiegherebbe nella stessa situazione ma in assenza di stimolazione indotta<sup>51</sup> (Figura 22.A).

L'analisi di rapidi treni di spikes in risposta a impulsi luminosi mediati dalla proteina f-Chrimson, svolta nell'ambito di un altro importante studio [77], ha riscontrato che il controllo remoto ottico attiva gli interneuroni posti nelle cortecce cerebrali; tali neuroni sono caratterizzati da notevole rapidità nei loro fisiologici limiti intrinseci.

<sup>51</sup> Object only: 00;07;45      Object+LED: 00;00;46      (hh;min;sec)

Lo stesso team dello studio [77] ha proseguito introducendo f-Chrimson in topi affetti da sordità acuta tramite microiniezioni di AAVs in scala tympani e ha rilevato per 9 mesi dall'iniezione una elevata ed omogenea espressione di f-Chrimson sui neuroni nel 80% del SGNs (Spiral Ganglion Neurons) dell'orecchio trattato; nell'orecchio non trattato, invece, l'espressione della stessa proteina si è presentata in meno del 5% del SGNs, molto probabilmente a causa della diffusione dei vettori virali attraverso il liquido cerebrospinale. Per ridurre tale percentuale, in futuro saranno richieste ottimizzazioni nei protocolli di iniezione di vettori virali. Infine, il team ha stimolato, tramite fibra ottica a singolo canale, le vie uditive di topi sia sani che sordi, osservando che tutti rispondevano agli impulsi emessi fino a 1kHz.

In conclusione, lo studio non ha rilevato evidenze di effetti collaterali, tuttavia, ci si aspetta un minimo di fototossicità dovuto allo spettro red-shift richiesto dalla f-Chrimson. Pertanto, f-Chrimson è ad oggi ritenuta una candidata molto promettente per le future terapie cliniche optogenetiche, come quella per il ripristino di funzioni sensoriali.

Ulteriori studi [4] [77] [87] [105], effettuati su popolazioni di neuroni delle vie uditive dei topi, confermano e promuovono l'uso della stimolazione nervosa mediata dall'optogenetica, speculando la fabbricazione di potenziali impianti cocleari ottici (oCIs). Questi dovrebbero essere costituiti da una serie di centinaia/migliaia di microlaser posti nel canale di Rosenthal, ognuno dei quali andrebbe a stimolare tonotopicamente un range molto più ridotto di neuroni uditivi, rispetto a quanto fanno i convenzionali impianti cocleari elettrici, che con 8-20 elettrodi stimolano interi gruppi di neuroni, riducendone esponenzialmente la qualità sonora.

Tuttavia, nonostante che abbia permesso il raggiungimento di grandi traguardi, l'optogenetica non manca di qualche aspetto negativo: lo studio [106], infatti, fa notare che la foto-eccitazione di sottopopolazioni di neuroni contenenti ChRs, può interferire con le attività di altri neuroni adiacenti, i quali potrebbero portare ad effetti inaspettatamente indesiderati.

È stato, ad esempio, osservato in macachi V1 che le dinamiche sinaptiche dei neuroni fotostimolati possono influenzare fortemente i profili della risposta on-set laser, che comprendono la latenza e il rapporto transitorio-mantenimento, e i profili della risposta off-set laser, che comprendono la off-cinetica e gli effetti soppressivi post-stimolazione.

L'optogenetica ha offerto molte strade a numerosi settori di ricerca, ma ciò è stato possibile anche grazie ai sostanziali sviluppi apportati alle tecnologie necessarie per una corretta applicazione dell'optogenetica, come le fibre ottiche per fotostimolazione e la microscopia ottica high-speed per il detecting [50] [107].

Combinando stimolazione ottica con microscopi impiantabili o a fibra ottica, si potrebbe giungere allo sviluppo di interfacce neurali ottiche, le quali potrebbero sia ricevere informazioni afferenti-sensoriali tramite fotostimolazione di ChRs, che inviare informazioni efferenti-motorie tramite fluorescenza di GEVIs, rilevate dai microscopi posti in dispositivi bionici [11].

Va sottolineato, infatti, che le prestazioni delle proteine fotosensibili non dipendono solo da esse stesse, ma anche dalla tecnologia utilizzata dal detecting/stimulating.

Nuovi vettori virali potranno ridurre le risposte immunitarie, migliorare la selettività e mantenere una espressione transgenica nelle cellule a lungo termine.

Nuove proteine optogenetiche potranno possedere una maggiore gamma dei colori, diminuendo la sovrapposizione spettrale e migliorare la cinetica e il rapporto segnale-rumore (SNR).

Nuovi microscopi, in particolare i microscopi optical sectioning, potranno migliorare flessibilità, stabilità e risoluzione-profondità di imaging, individuare molti più fotoni emessi per fluorescenza ed essere di dimensioni così ridotte da divenire portabili.

Questi sono gli elementi chiave per apportare ulteriori migliorie e sviluppi nell'optogenetica, per raggiungere i quali sono necessari nuovi studi, ricerche ed investimenti.

## **Radiazione Infrarossa**

La neurostimolazione mediata dalla luce infrarossa (INS) è un approccio che viene praticato da diverso tempo come alternativa agli approcci precedentemente descritti: sviluppata da Duco Jansen [108] e da Jonathan Wells [109] in parallelo al progresso dell'optogenetica di cui non ha riscosso, però, gli stessi successi [2], IR comprende una larga porzione della radiazione elettromagnetica con un range di  $\lambda$  compresa tra 780 nm e 1000  $\mu\text{m}$ .

Secondo lo standard ISO 20473:2007 Optics and photonics – Spectral bands [110], la banda della radiazione infrarossa può essere divisa in tre sottocategorie: la banda del Near-IR (0.78–3.0  $\mu\text{m}$ ), del Middle-IR (3.0–50.0  $\mu\text{m}$ ) e del Far-IR (50.0–1000.0  $\mu\text{m}$ ).

Va specificato che tali sottocategorie vanno ben distinte, perchè, per esempio, tra il NIR e il FIR ci sono differenze assai significative in quanto lo spettro di assorbimento da parte dei tessuti (acqua, lipidi, proteine, aminoacidi, etc) varia in funzione della struttura del tessuto stesso. Di conseguenza, gli effetti sui tessuti possono variare considerevolmente in funzione della lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica, motivo per cui le caratteristiche ottiche non possono essere definite in egual misura. Tuttavia, va considerato anche che in generale le molecole assorbono tali radiazioni e le riemettono a lunghezze d'onda differenti dalla sorgente iniziale.

Proprio perché la maggioranza di queste molecole è pressochè presente in tutte le cellule, queste sono sensibili ad ampi spettri della radiazione infrarossa, facendo di quest'ultima una applicazione con una precisione e risoluzione spaziale più elevata rispetto a tutti gli altri

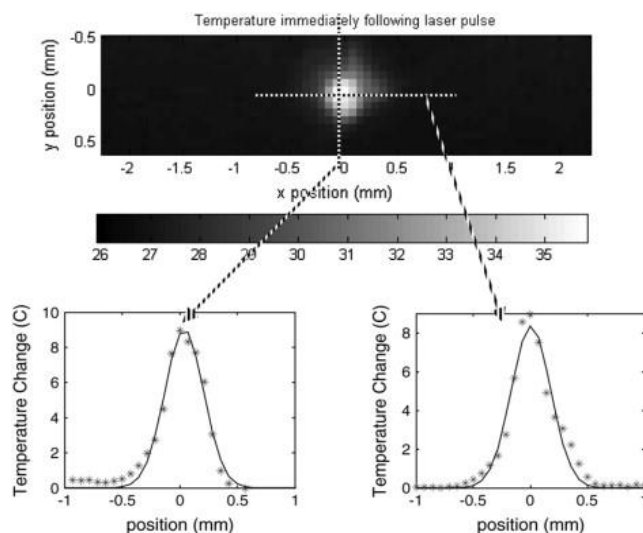


Figura 23

Biophysical Journal - Biophysical Mechanisms of Transient Optical Stimulation of Peripheral Nerve

approcci precedentemente trattati.

Infatti, il gruppo di Wells, che è stato tra i primi ad investigare in maniera scrupolosa le potenzialità di quest'applicazione, ha evidenziato che il profilo della temperatura segue una distribuzione Gaussiana nello spazio bidimensionale del tessuto esposto all'IR (Figura 23) utilizzando una fibra ottica di diametro 600  $\mu\text{m}$  (distanza fibra-tessuto 0.5 mm) [14]. Da questa curva, si evince che gran parte dell'energia dell'esposizione radiante è confinata in un'area del tessuto di diametro  $\sim 200 \mu\text{m}$ .

Wells fa notare che, se si usassero fibre ottiche dai diametri inferiori, pur mantenendo un'intensità dell'energia radiante tale da stimolare i neuroni, si potrebbe ottenere una precisione spaziale ancora maggiore<sup>52</sup> e che il responsabile della generazione di APs a fronte di impulsi IR potrebbe essere il gradiente di temperatura.

Per quanto riguarda la precisione temporale, invece, tramite brevi (che può essere dell'ordine dal femtosecondo al microsecondo) impulsi di luce infrarossa, i neuroni possono depolarizzarsi o iperpolarizzarsi istantaneamente, anche se, in quest'ultimo caso, sono necessari ulteriori studi visto che si tratta di un traguardo per anni ritenuto incompreso ed irrealizzabile, ma riscoperto solo recentemente [111].

Contrariamente all'optogenetica o all'introduzione di materiale esogeno, come NPs o array di elettrodi, INS non richiede alcuna operazione invasiva e ciò la rende un ottimo candidato per la neurostimolazione, perché non esige un contatto diretto tra la sorgente INS ed il tessuto nervoso, pur mantenendo elevata la risoluzione spaziale tipica<sup>53</sup> della neurostimolazione ottica [2].

A ciò si aggiunge che INS presenta anche altri aspetti molto vantaggiosi: è economica e, soprattutto, eccezionalmente flessibile, al punto che si possono usare simultaneamente INS e recording EEG/MRI senza che la prima generi artefatti [2] [112] [113] durante la registrazione, contrariamente a quanto succede nel caso di elettrodi

---

<sup>52</sup> Per limitazioni fisici e tecnici, non è possibile utilizzare fibre ottiche dal diametro inferiore a 4  $\mu\text{m}$

<sup>53</sup> Spot di illuminazione 100-400 microns in diametro

che, invece, interferiscono con le attività elettrofisiologiche e, di conseguenza, con la registrazione.

Ciò che innesca INS sui neuroni è un fenomeno che opera a livelli più bassi rispetto alle sue alternative; la conseguenza più evidente è il rilascio di calore in un lasso di tempo molto breve, il gradiente termico, che viene poi rapidamente assorbito e disperso nell'ambiente circostante e, considerando che l'ambiente extracellulare è caratterizzato da un continuo ricircolo di fluidi e rimodellamento della matrice extracellulare, tale dispersione è ancora più veloce, con un rischio minimo di danni alle cellule derivante da accumulo eccessivo di calore.

Tuttavia, si deve fare attenzione a non utilizzare impulsi IR dai gradienti termici che inducano alle cellule di avere temperature vicine a quella della denaturazione proteica (55-56 °C); in genere, dagli studi si osservano aumenti di temperatura fino a 10°C dalla temperatura baseline per avere una stimolazione efficace; mentre primi danni termici si osservano ad aumenti tra 18°C e 20°C.

Numerosi sono i parametri che permettono una buona e corretta efficacia del INS [111]: primariamente, l'irradianza, e, a seguire, l'intervallo di tempo, la modalità di trasmissione (ad onde continue o ad impulsi), la lunghezza d'onda della radiazione infrarossa coinvolta e la frequenza di impulsi.

Quest'ultimo è un parametro critico, perchè si possono indurre effetti molto differenti; infatti impulsi a basse frequenze consentono INS; in quanto il calore risultante indotto nei tessuti dagli impulsi stessi, si disperde in tempi adeguati via conduzione termica. Al contrario, gli effetti provocati dagli impulsi ad alte frequenze si sovrappongono, aumentandone la temperatura complessiva, incrementando, di conseguenza, il rischio di apportare danni termici; in questo modo, anziché stimolare neuroni, si tende ad inibirli; tale variante di INS è definita come Infrared Neural Inhibition (INI).

Un numero sempre maggiore di studi riporta che, proprio grazie a tali parametri, IR trova spazi di applicazione in vari settori scientifici, quali l'ingegneria tissutale o l'oncologia; la capacità di aumentare la temperatura in sedi specifiche accelera, ad esempio, il processo di



rigenerazione cellulare [114] da ferite e coadiuva i trattamenti contro varie forme di cancro [115] [116] ed in caso di malattie neurodegenerative come il Parkinson [117].

Altri studi riportano che IR è in grado di prevenire ed alleviare dolori, rigidità, stanchezza da artrite reumatoide e spondilite anchilosante, di trattare disordini oftalmici, neurologici [118] [119] [120] e psichiatrici, di stimolare la proliferazione di cellule staminali mesenchimali e cardiache e, infine, di potenziare le terapie fotodinamiche [121] [111].

Con ulteriori estensioni ed opportune rifiniture tecniche, INS ha la possibilità di diventare un potente e versatile strumento per la ricerca di base tanto quanto per le applicazioni cliniche.

Sebbene l'uso del IR sia promettente in numerose applicazioni, questo approccio non è esente da alcune limitazioni, che sono perlopiù associate all'interazione laser-tessuto.

Infatti, alcune bande IR, a dosaggi energetici eccessivi, possono essere assorbite dal sangue, in particolare da emoglobina, e da molecole dell'acqua [21], pressoché onnipresenti in tutti gli organismi. Ciò fa sì che, con l'aumentare della temperatura interna della cellula, accresca anche il rischio che questa si danneggi o esploda [2].

Un'altra limitazione è la forte dipendenza che intercorre tra la profondità spaziale e le proprietà dell'assorbimento IR dei tessuti [122].

Perciò, se da un lato INS si presenta come un approccio versatile, dall'altro risulta potenzialmente dannosa e, quindi, esige di un'attenzione minuziosa circa la scelta dei parametri, in particolare se la stimolazione è diretta al cervello. In genere, per la neurostimolazione ottica si scelgono lunghezze d'onda con coefficiente d'assorbimento dell'acqua minimo; ciò permette di ottenere una conversione energia laser-calore efficiente, purchè vengano generati APs, come affermato dallo studio [109] e, successivamente, dallo studio [108], entrambi effettuati con rapide transizioni di calore in un nervo sciatico di ratto.

Infatti, per un coefficiente d'assorbimento dell'acqua di  $\sim 115 \text{ cm}^{-1}$ , corrispondente a  $\lambda \sim 1.94 \mu\text{m}$ , la profondità di penetrazione è di circa  $\sim 85 \mu\text{m}$ ; mentre, per coefficienti d'assorbimento di  $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$  corrispondenti a  $\lambda \sim 1.85 \mu\text{m}$ , la luce può arrivare fino a  $\sim 1000 \mu\text{m}$  [123].

Lo stesso studio riporta anche il valore di soglia dell'energia di esposizione ( $\sim 0.3 \text{ J/cm}^2$ ) per cui si generano APs senza che ci siano danni di natura termica, a seguito di impulsi con intervalli di tempo compresi tra 0.25 ms e pochi millisecondi.

Si può concludere che bisogna rispettare un confinamento termico temporale ( $500 \text{ ns} < t_{\text{pulse}} < 200 \text{ ms}$ ) e spaziale, affinché l'energia ottica-termica di un impulso si accumuli nel tessuto irradiato prima che questa si dissipi attraverso la conduzione o la convezione, in modo da generare efficacemente APs [14].

Sebbene alcune strategie di stimolazione ottica siano mediate da interazioni fotochimiche, gli impulsi emessi da sorgenti laser IR non sono in grado di fare altrettanto, anche perché l'energia di un singolo fotone emesso da una tipica sorgente IR è significativamente inferiore di diversi ordini di grandezza rispetto alle energie richieste per spostare un elettrone ad uno stato energetico superiore, come succede nelle reazioni fotochimiche.

Per esempio, l'energia di un singolo fotone emessa dalla sorgente Ho:YAG è di 0.58 eV, valore che corrisponde ad una energia di legame di 52 kJ/mol. D'altra parte, le energie di legame tipiche di uno ione hanno un range di valori compresi tra 100 e 1000 kJ/mol [5].

## *Meccanismi proposti che sottendono INS*

I fenomeni che si celano dietro questa stimolazione non sono del tutto noti e sono state proposte diverse teorie [2] [5] [111]; ma, comunque, la diretta conseguenza dell'uso del IR rimane sempre il concetto di una rapida variazione di temperatura che perturba il potenziale di membrana al punto da generare APs.

### *Teoria della capacità*

Proposto da Shapiro et al. [124], lo studio ha misurato le variazioni di capacità di membrana tramite tecniche voltage-clamp in cellule di diversi animali (oociti *Xenopus* e cellule renali embrionali umani) e ha associato, quindi, le depolarizzazioni dei neuroni all'eccitazione delle molecole dell'acqua via IR.

Gli autori hanno mostrato che le variazioni di potenziali di membrana possono essere paragonate ad un modello Gouy–Chapman–Stern di doppio condensatore<sup>54</sup>, che lega la carica la carica capacitiva transmembrana alla temperatura; inoltre hanno dimostrato l'inefficacia del INS ad onde continue nel generare APs

### *Teoria della conduttanza dei canali ionici*

Un'altra teoria sugli effetti del INS [111] [125], complementare a quella precedente, sostiene che la variazione di temperatura cambia la conduttanza di vari canali ionici. È noto che molti di questi sono sensibili alla temperatura, ma quello che merita attenzione è la classe dei canali TRPV, per via della loro termosensibilità. È molto probabile, infatti, che INS abbia effetti eccitatori sui lipidi della membrana e sulle molecole d'acqua le quali acquisiscono un'energia radiante significativa e, di conseguenza, vanno ad influenzare in maniera marcata le attività dei canali TRPV e di altri componenti cellulari termosensibili.

Lo studio [126] riflette l'importanza del ruolo di questi canali TRPV nella neurostimolazione, perché, infatti, topi TRPV knock-out, a

---

<sup>54</sup> I doppi condensatori appartengono alla classe dei supercondensatori, le quali sono caratterizzati da due doppi strati elettrici (ciascuno si compone di un interfaccia tra un elettrodo ed un elettrolita allo stato liquido, separati un sottile strato che fa da dielettrico). Questo sistema può essere paragonato ad una serie di due condensatori.

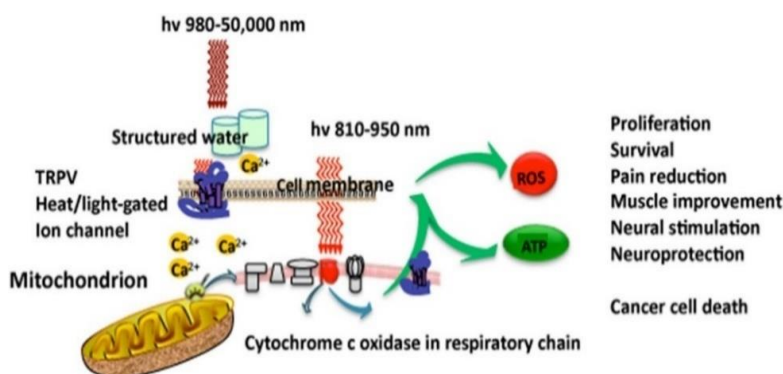


Figura 24

Journal of Photochemistry and Photobiology - Biological effects and medical applications of infrared radiation

fronte di impulsi IR ( $\lambda = 1.85-1.87 \mu\text{m}$ ), non mostrano risposte nervose.

Un'altra teoria sempre più accreditata e supportata da numerosi studi, sostiene che INS stimoli principalmente cromofori mitocondriali (cytochrome c oxidase), poiché essi subiscono cambiamenti termici anche a temperature inferiori a  $43^\circ\text{C}$ ; queste proteine, sensibili in particolar modo al NIR ( $\lambda = 810 \text{ nm}$ ), sono interposte nelle membrane dei mitocondri e vengono stimulate con la conseguente generazione di specie reattive ossigeno (ROS), come il monossido di azoto<sup>55</sup> (NO) [127] [128] [129] (Figura 24).

A loro volta, vanno ad influenzare interi processi biologici [110] [111] [130], come la produzione di ATP, la riorganizzazione citoscheletrica, l'omeostasi e la proliferazione e la differenziazione. Va specificato che le dosi di radicali liberi e ROS devono essere mantenute basse, per evitare il danneggiamento di organelli e cellule ed il conseguente photoaging e photocarcinogenesis [111].

In base a tutto ciò, quindi, è possibile sostenere che, in generale, l'effetto primario dell'irraggiamento con cui si realizza INS, è l'eccitazione delle molecole dell'acqua, in particolare quelle intracellulari, che acquisiscono accelerati moti vibrazionali che vanno ad influire sulle conformazioni di enzimi, canali ionici ed altre proteine. Inoltre, elevati gradienti termici risultano essere elementi chiave nella neurostimolazione IR [14].

In aggiunta, conoscendo queste caratteristiche, oltre alla teoria fisica della luce, è possibile ricorrere a modelli matematici per descrivere

<sup>55</sup> In biologia, è un importante neurotrasmettitore con effetto vasodilatante

il comportamento dei fotoni che interagiscono con i tessuti; essi possono, infatti, essere assorbiti o deviati sia elasticamente che anelasticamente. Modelli di INS ricorrono spesso all'uso del metodo Monte Carlo, che consente capace di simulare processi fisici in maniera stocastica e che permette di determinare la distribuzione spaziale della luce assorbita nei tessuti, grazie alla quale è possibile investigare il comportamento temporale del flusso di calore, in funzione dell'energia di esposizione radiante, la dimensione della fibra, la lunghezza d'onda, la geometria del bersaglio ed altri parametri [122] [131] [132]. Questi modelli ad elementi finiti permetterebbero di risolvere equazioni del calore e fornire analisi dettagliate in maniera precisa usando impulsi ms o  $\mu$ s, in molti dei tessuti nervosi oggetti di studio. Un esempio è il modello transport in multi-layered tissues (MCML) [133], che approfondisce le interazioni tessuto-radiazione.

## *Stimolazione*

La neurostimolazione ottica mediata da radiazione infrarossa dipende innanzitutto dal tipo di tessuto nervoso che si sta considerando: i tessuti corticali, ad esempio, presentano profonde differenze sia anatomiche che funzionali rispetto ai tessuti nervosi periferici, e, quindi, l'uso del IR può avere effetti assai diversificati su questi due tessuti.

Sono stati ottenuti numerosi risultati nel corso degli anni, ma la neurostimolazione ottica applicata alle vie uditive, o meglio, ai neuroni SGNs rimane quella che ha mostrato esiti più soddisfacenti [134]; in più è stato riscontrato che in questi siti si innescano APs tramite impulsi dell'ordine del nanosecondo senza un minimo di effetti collaterali [135].

È chiaro, quindi, che la stimolazione ed i suoi effetti sui tessuti dipendono fortemente dai parametri stessi della radiazione elettromagnetica e questi sono ottimizzati in funzione di cosa si va a stimolare. Per esempio, parametri IR che consentono la stimolazione di motoneuroni molto probabilmente non potrebbero essere altrettanto validi parametri per la stimolazione di neuroni appartenenti alle cortecce sensoriali, visive e così via. Quindi è molto importante iniziare un lavoro mantenendo l'attenzione sul tipo di neurone che si vuole studiare e, comunque, gli studi effettuati sono ancora carenti, se si pensa che con lunghezze d'onda differenti, si potrebbero ottenere effetti completamente opposti.

È stato riscontrato, infatti, in numerosi studi che esporre i neuroni con radiazioni elettromagnetiche con lunghezze d'onda inferiori a quella del rosso ( $\lambda < 600$  nm), aumenta la soglia di stimolazione e riduce maggiormente intensità e frequenza dei potenziali [5] [123].

D'altra parte, anche una banda ristretta del NIR intorno ai 1000-1100 nm, provoca una diminuzione di intensità delle risposte nervose nei tessuti sia del SNC che del SNP; anzi, all'aumentare delle energie emesse, l'ampiezza del potenziale d'azione composto (CAP) diminuisce e, contemporaneamente la temperatura delle cellule raggiunge i 60°C, con evidenti danni.

Quindi gli autori di questi studi hanno concluso che lungo lo spettro elettromagnetico, ci sono diversi picchi in cui la radiazione è in grado di bloccare la propagazione di APs attraverso l'area irradiata del nervo mammifero [5] [136].

Infine, il range ottimale e sicuro per una neurostimolazione efficiente è 1450-1880 nm, in particolare le due  $\lambda = 1450\text{nm}$  e  $1875\text{nm}$  [9] [137], per la cui stimolazione sono sufficienti basse soglie. Ma la scelta del  $\lambda$  da usare precisamente dipende sempre dal tipo di neurone, dalla dimensione spot e, in particolare dall'energia radiante coinvolta.

Oltre a ciò, esami istologici hanno evidenziato che i valori dell'energia radiante affinché i tessuti si danneggino, devono essere maggiori di diversi ordini di grandezza rispetto ai valori soglia della neurostimolazione.

Ciò è valido anche per l'esposizione radiante [138], per la quale la probabilità di provocare danni è  $<1\%$  con valori di  $0.66\text{--}0.70\text{ J/cm}^2$ , valori significativamente superiori rispetto a quelli richiesti per una stimolazione affidabile ( $0.34\text{--}0.48\text{ J/cm}^2$ ).

Infatti, è stato definito che l'intensità dei danni dipende fortemente dalla lunghezza d'onda, poiché il coefficiente d'assorbimento è in funzione di essa; [113] all'aumentare del coefficiente di assorbimento, è necessaria minore energia per la stimolazione, tuttavia, alti coefficienti di assorbimento si associano a maggiori rischi di provocare danni e fenomeni di ablazione dei tessuti.

Dall'altra parte, a fronte di una bassa probabilità di danni, usare impulsi con bassi coefficienti di assorbimento determina che i neuroni, per depolarizzarsi, necessitano di maggiori quantità di energie.

Quindi, attraverso prove sperimentali iterative, si è dimostrato che lunghezze d'onda con minimi coefficienti di assorbimento dell'acqua ( $\mu_a \sim 3\text{ mm}^{-1}$ ) sono quelle che hanno il miglior rapporto, in termini di sicurezza, tra l'energia richiesta per la stimolazione e la soglia dei danni [9] [109].

Dunque, molti autori ritengono che l'energia radiante sia il parametro principale per la neurostimolazione basata sugli infrarossi: tanto è

vero che, già i primi studi guidati da Wells nel 2005, avevano constatato l'importanza primaria di tale parametro [109].

Va precisato che l'energia radiante e l'esposizione radiante sono due variabili molto differenti e la letteratura scientifica non un valido criterio sulla quale basare la scelta tra le due variabili.

L'energia radiante, in linea di principio, è il valore corrispondente alla punta della fibra ottica esposta all'aria e, ovviamente, non è lo stesso valore che si riscontra sul bersaglio, di cui assorbe e devia i fotoni, riducendone il valore dell'energia radiante. Per calcolare l'effettivo valore, è necessario conoscere il coefficiente d'estinzione e la distanza tra l'obiettivo e la punta della fibra ottica, ottenibile mediante microtomografia computerizzata a raggi X (microCT).

Alternativamente, si può invece ricorrere all'esposizione radiante, sebbene, rispetto al precedente, sia più complesso conoscerne il valore: difatti, si tratta del rapporto tra l'energia radiante e l'area irradiata, o dimensione spot, difficilmente calcolabile *in vivo*. In teoria, dal diametro del nucleo della fibra ottica, calcolata dall'apertura della fibra ottica in aria o nei fluidi, si riporta il valore della dimensione spot tramite un imaging dotata di una fotocamera sensibile a infrarossi oppure in base a variazioni di temperatura riflesse dall'irradiazione di inchiostro termocromico disciolto in agar. [18]

Per valori dell'energia radiante o esposizione radiante inferiori a quelli di soglia, si riteneva che non si presentasse alcun fenomeno, in quanto non si constatava alcuna variazione nelle risposte neurali. In realtà, un recente studio [139] è stato in grado di mettere in chiaro la relazione tra INS e le attività sinaptiche, focalizzando l'attenzione sulla corrente di membrana su fette di neuroni provenienti dal tronco cerebrale murino. Infatti, tale studio ha dimostrato per la prima volta che, nonostante non siano stati riscontrati alcun APs nei neuroni, INS è in grado comunque di generare risposte sinaptiche. In passato era stato osservato lo stesso fenomeno soltanto su *C.elegans* [140] ma si riteneva che lo stesso potesse non verificarsi anche su neuroni mammiferi. Inoltre, lo studio [139] ha utilizzato fibre ottiche di diametro ridotto (14  $\mu\text{m}$ ) e questo comporta che le superfici dei



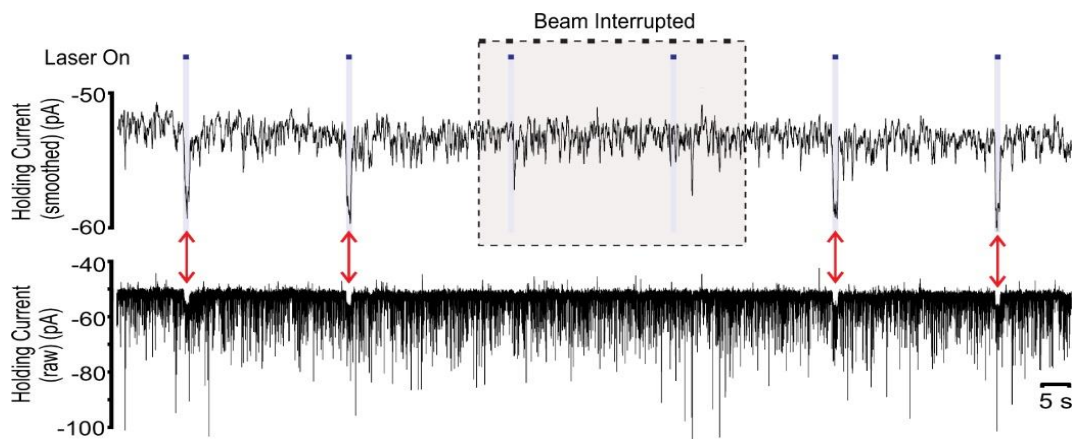


Figura 25

Biomedical Optics Express - In vitro neuronal depolarization and increased synaptic activity induced by infrared neural stimulation

neuroni esposti subiscono un'energia radiante molto elevata ( $261 \frac{J}{s \cdot cm^2}$  a fronte della massima potenza laser utilizzata: 7.8 mW con  $\lambda \sim 1.89 \mu m$ ).

Contemporaneamente, è stata misurata la corrente sui neuroni tramite strumenti di misura elettrofisiologica voltage clamp ed è stato rilevato che INS depolarizza costantemente i neuroni (anche per tempi di esposizione prolungati ed alla massima potenza), con valori medi di potenziale di membrana di  $+4.15 mV \pm 2.55 mV$  e con valori medi di flusso di corrente  $10.0 pA \pm 7.9 pA$  (Figura 25).

Si riporta che la frequenza con cui si presentano eventi sinaptici, dipende significativamente dalla potenza laser utilizzata. In nessun caso, INS ha innescato APs.

Questi risultati evidenziano che, oltre a non provocare alcun danno, l'esperimento è reversibile; si ipotizza, infine, che INS possa influenzare la probabilità di rilascio di neurotrasmettitori, indipendentemente dalla presenza o meno di APs.

Confrontando, invece, i primi lavori apportati su tessuti nervosi appartenenti al CNS, come quello del gruppo di Cayce [113], ed al PNS, come quello del gruppo di Wells [109], si è riscontrato che il primo, per evocare APs, richiede una soglia di esposizione radiante minore rispetto a quella del secondo per la maggior parte delle lunghezze d'onda.

Le ragioni sono piuttosto prevedibili, in quanto l'anatomia dei due tessuti è alquanto differente: innanzitutto, i tessuti del CNS che sono

composti sia da materia grigia<sup>56</sup> che materia bianca<sup>57</sup>, mentre i tessuti del PNS sono composti primariamente da assoni, i cui sono circondati da tessuti connettivi, che assorbono molta radiazione IR.

Quindi, affinché si inneschino risposte nervose, i secondi richiedono una quantità di energia maggiore dei primi e questo spiega il motivo per cui i tessuti del CNS hanno una soglia di stimolazione inferiore.

### *INS nel cervello*

Nonostante rimangono relativo alla stimolazione di tessuti corticali tramite la radiazione infrarossa, quello condotto dal gruppo di Cayce [113], è lo studio che funge da riferimento per tutti gli studi posteriori, perché è stato il primo studio valido in questo ambito di ricerca che ha utilizzando il modello talamocorticale della fetta del cervello murino. Si tratta di un modello ben studiato, riproducibile e comunemente utilizzato nel settore delle neuroscienze [141], perché riproduce attività nervose molto simili a quelle riscontrate negli studi *in vivo*.

Nello studio di Cayce [113], sono stati confrontati impulsi di differenti lunghezze d'onda (2.51, 3.65, 4.00, 4.40 e 5.30  $\mu\text{m}$ ), ciascuna con un'energia radiante variabile al fine di determinare la soglia di stimolazione. Nonostante che nel CNS i normali processi neurali siano eseguiti a frequenze molto elevate, in questo studio, per motivi tecnici, si è ricorso fino ai 30 Hz e si è, comunque, osservato che, aumentando le frequenze di impulsi laser IR, la soglia di energia radiante richiesta per la stimolazione diminuiva. Si ritiene che, con l'aumentare della frequenza, i neuroni accumulino maggiori quantità di energia, ovvero che all'arrivo degli impulsi successivi, rimangono delle quantità di calore residue che vanno a concentrarsi nel corpo cellulare.

Di conseguenza, ciò ridurrebbe l'intensità dell'energia necessaria per stimolare i neuroni a fronte degli impulsi successivi. Infatti, si è stimato che i neuroni del CNS hanno una durata del rilassamento termico inferiore a 1120 ms per le tipiche lunghezze d'onda a basse frequenze (<5 Hz) [138] [113] [142]; al contrario, per frequenze

---

<sup>56</sup> Corpi cellulari e dendriti

<sup>57</sup> Assoni dotati di guaina mielinica

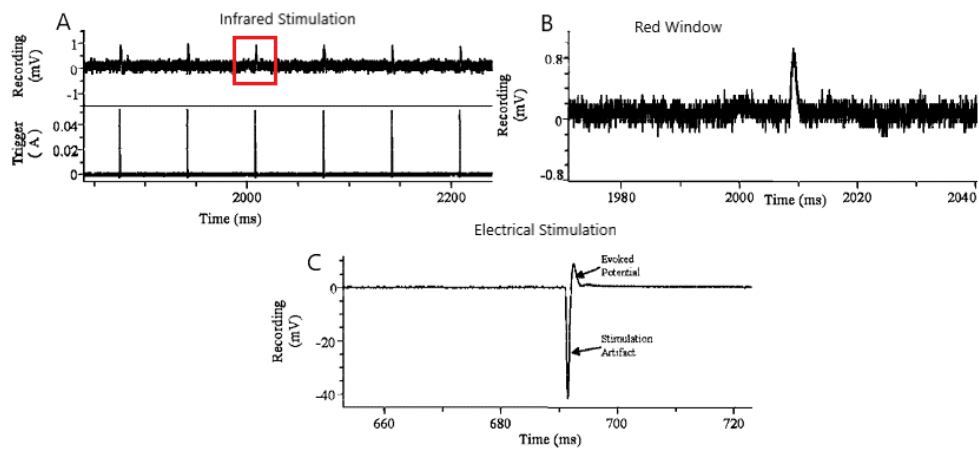


Figura 26

IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics Infrared Neural Stimulation of Thalamocortical Brain Slices

tipiche dei processamenti neurali e se si mantengono le stesse ampiezze dell'energia radiante, la durata per ritornare alla temperatura baseline può raggiungere i 4.5 s.

Inoltre, questo studio [113] ha messo in luce due importanti caratteristiche tipiche del INS: la capacità di stimolare in maniera costante ed istantanea a frequenza fissata (Figura 26.A) e la mancanza di artefatti (Figura 26.B). Essi, individuati mediante elettrodi di registrazione, sono, infatti, associati ai segnali elettrici emessi da elettrodi di stimolazione (Figura 26.C); perciò, da questo punto di vista, INS è una applicazione vantaggiosa rispetto alla convenzionale stimolazione elettrica.

Successivamente, in altri lavori condotti dallo stesso Cayce [143] [144] (entrambi con  $\lambda=1.875 \mu\text{m}$ ) e da altri autori [142] ( $\lambda=980 \text{ nm}$ ), che si sono avvalsi del INS su topi e su primati non umani *in vivo*, sono stati ottenuti risultati piuttosto differenti rispetto alla situazione *in vitro*.

Mentre in tutti gli studi *in vitro* o *ex vivo* la stimolazione infrarossa ha indotto i neuroni ad innescare APs, questi studi, al contrario, hanno determinato che INS induce invece all'inibizione nei tessuti nervosi del CNS per un periodo piuttosto prolungato (1- 4.5 s).

Da un primo studio di Cayce effettuato su topi *in vivo* [143], viene riportato infatti che successivamente ad ogni impulso IR, si verifica un calo significativo di APs rilevati: nella Figura 27.C si utilizza solo IR, mentre nella Figura 27.D IR e stimoli sensoriali che vengono percepiti ma subito soppressi.

Si ritiene che l'origine degli effetti inibitori sia dovuto all'attivazione stessa di quei neuroni inibitori, in particolare i dendriti delle cellule piramidali apicali, che sono maggiormente presenti negli strati più esterni della corteccia esposta alla radiazione, rispetto a quelli eccitatori, che invece

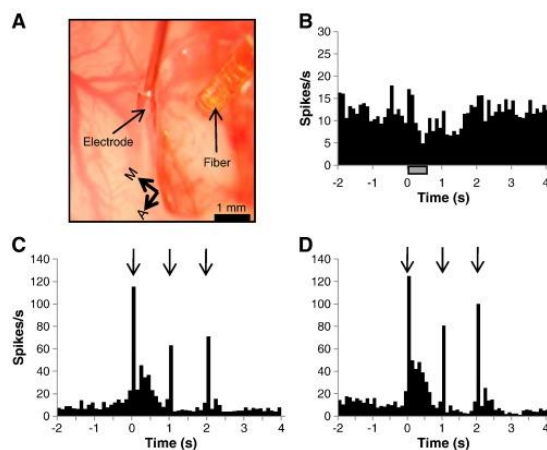


Figura 27

NeuroImage- Pulsed infrared light alters neural activity in rat somatosensory cortex in vivo

sono più presenti negli strati più profondi del cervello. Inoltre, gli strati superiori includono elevate concentrazioni di cellule gliali, astrociti, oligodendrociti e microglia. Diversi autori ritengono che l'attivazione di queste ultime cellule, inducono cambiamenti strutturali, ad esempio, dei vasi sanguigni che alterano, di conseguenza, l'emodinamica, di cui è noto che è strettamente correlata con le attività neurali.

A dimostrazione di quanto detto, uno studio [145] ha investigato le dinamiche di calcio intracellulare *in vivo* mediata dalla microscopia two-photon in risposta degli impulsi IR ( $\lambda = 1.875 \mu\text{m}$ ): tali segnali mostravano diverse componenti, suggerendo che sono coinvolte diverse cellule e non solo i neuroni. La componente lenta del segnale calcio era in realtà quella che si propagava attraverso la rete degli astrociti, mentre la componente veloce ed istantanea era quella che si propagava tra i neuropili<sup>58</sup>.

Sapendo dalla legge di Beer che la penetrazione della radiazione elettromagnetica è in funzione della lunghezza d'onda, la stragrande maggioranza della radiazione usata nel INS viene assorbita dagli strati corticali I e II, nei quali sono ben presenti gli astrociti, caratterizzati da onde lente di segnali calcio, e dendriti apicali [146]. Inoltre, era già noto da precedenti studi che gli astrociti sono fotosensibili a lunghezze d'onda tipiche del NIR (800 nm) e che mostrano simili onde lente [147].

<sup>58</sup> Regione che include le connessioni sinaptiche tra le ramificazioni assoniche e i dendriti

D'altra parte, questi studi affermano sempre più fortemente che rapidi segnali calcio propagantisi lungo i dendriti apicali indotti da INS, influenzano il flusso dei neurotrasmettitori glutammato e GABA e, quindi, rispettivamente l'attivazione di neuroni inibitori o la soppressione di quelli eccitatori, più presenti negli strati superficiali delle cortecce rispetto a quelli eccitatori.

Per di più, questi risultati sono stati riscontrati anche in quegli studi che hanno stimolato elettricamente quei stessi circuiti neurali inibitori, i cui effetti soppressivi aumentavano all'incrementare dell'intensità delle correnti elettriche; ciò rinforza le ipotesi precedentemente descritte [142]

Nonostante tutto ciò, INS applicato *in vivo* ha evidenziato, comunque, una risoluzione spaziale elevata, riscontrata sia in PNS che tessuti corticali *in vitro*, e che le intensità delle risposte intrinseche sono dipendenti dall'energia radiante, dalla frequenza degli impulsi e, soprattutto, dalle dimensioni della fibra ottica. Quest'ultimo è un parametro assai rilevante, perché riducendo la dimensione spot effettiva, è più probabile che si vada a coinvolgere specifici neuroni eccitatori; infatti, con dimensioni maggiori, vengono esposte anche quei circuiti neurali degli strati corticali superiori che inducono all'inibizione delle risposte nervose.

A prova di ciò, esistono diversi gruppi di ricerca che hanno condotto la stimolazione mediante IR su diverse aree corticali visive di scimmie macachi anestetizzate [144] [148], osservando che tale tipo di neurostimolazione produce rapide risposte tipiche dei segnali visivi intrinseci al variare di diversi parametri, in particolare della dimensione spot della fibra ottica.

Infatti, lo studio condotto da Cayce [144], il primo studio ad effettuare INS su primati non umani, ha dimostrato ancora una volta la capacità di INS modulare risposte nervose e di innescarle con caratteristiche temporali e spaziali simili alla normale stimolazione visiva, ritenendo che la dimensione spot di irraggiamento sia un fattore molto importante, oltre all'intensità dell'energia radiante. Anche perché numerose aree cerebrali, in particolare quelle della

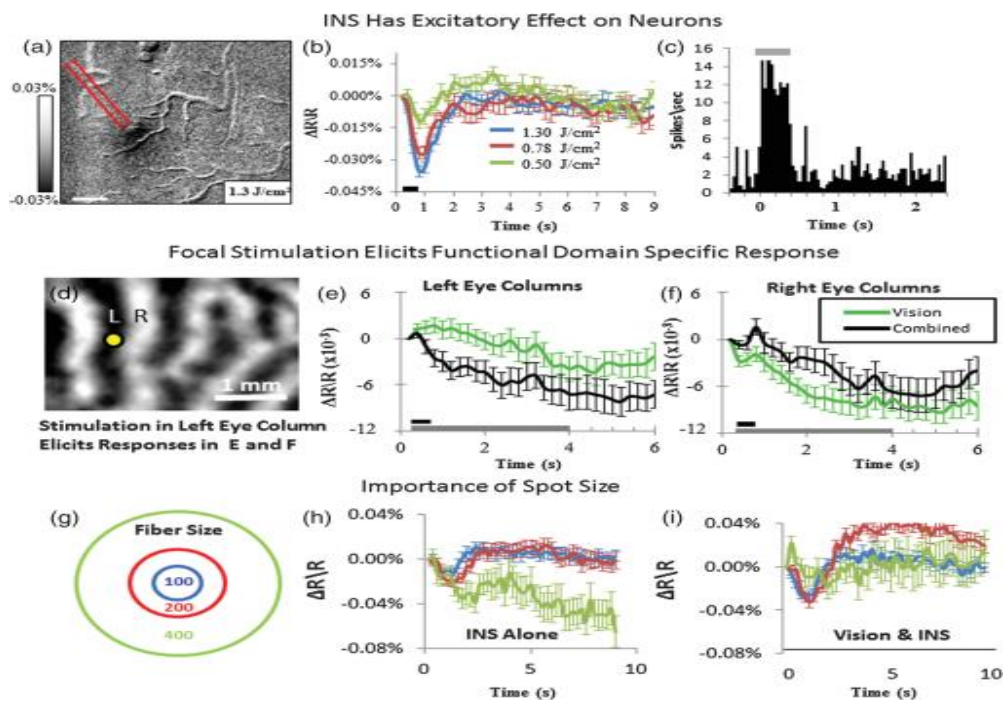


Figura 28

NeuroImage - Infrared neural stimulation of primary visual cortex in non-human primates

corteccia visiva, sono organizzate in colonne di dominanza oculari, ognuna delle quali rappresenta specifiche informazioni visive provenienti da ciascun occhio, come i colori e l'orientamento.

A dimostrazione di ciò, in tale studio, sono state stimulate singole colonne dell'area V1 tramite IR ( $\lambda \sim 1.875 \mu\text{m}$ ) variando i parametri di volta in volta: se si usavano valori di esposizione radiante eccessivi ( $>1 \text{ J/cm}^2$ ), o elevate frequenze ( $>100 \text{ Hz}$ ), o fibre di diametro troppo grandi al punto da illuminare contemporaneamente più colonne di dominanza, queste ultime tendevano a rispondere con effetti push-pull tra loro.

In altri termini, l'attivazione di colonne adiacenti provocava maggiori effetti inibitori sui segnali visivi provenienti dall'occhio opposto (Figura 28-e, Figura 28-f).

Infine, combinando la stimolazione IR (con le fibre ottiche più piccole in modo da aumentare la precisione ed illuminare solo singole colonne) con i segnali visivi naturali, si evidenziavano potenziamenti delle risposte di tali immagini più intense nelle vie neurali successive alle colonne.

Oltre alla stimolazione mediata da impulsi IR, è possibile sfruttare i principi della luce infrarossa anche per effettuare imaging: le tecniche imaging che si basano su questi principi hanno il vantaggio

di non richiedere agenti di contrasto e consentono il tracciamento di un'area abbastanza piccola con una elevata risoluzione spaziale dell'ordine del micro.

Un esempio di questo tipo di imaging è il functional tract tracing: mediante risonanza magnetica funzionale, tale tecnica consente di tracciare le risposte emodinamiche BOLD<sup>59</sup> (blood-oxygen-level dependent) non solo nei vasi sanguigni esposti all'IR, ma anche nei vasi ad essi collegati (white dots, Figura 29) Tale tecnica (fNIRS) si è rivelata molto vantaggiosa, anche perché è possibile

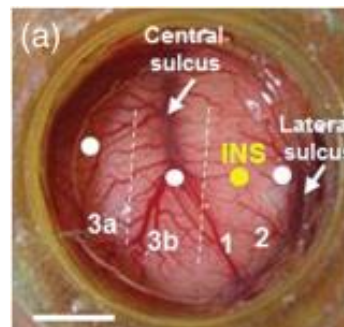


Figura 29

NeuroPhotronics - Infrared neural stimulation: a new stimulation tool for central nervous system applications

usarla anche *in vivo*, come mostrato dai risultati dello studio che ha coinvolto scimmie macachi [149] e scimmie scoiattolo sveglie [2] [150] . Gli studi citati, inoltre, sono importanti perché hanno riportato una scoperta interessante che ha confutato diverse ipotesi riguardo la capacità di INS di influenzare significativamente le attività nervose nei tessuti più profondi, impossibili da osservare se non con la MRI. Hanno, infatti, rilevato segnali BOLD negli strati corticali più profondi presso il sito di stimolazione.

### INS nel sistema nervoso periferico

Gli studi del INS effettuati sul PNS sono più consistenti rispetto a quelli effettuati sul CNS, ma le ragioni di questo divario sono dovute alla semplicità della disposizione tridimensionale dei neuroni afferenti ed efferenti. Quest'ultimi, infatti, sono organizzati in fibre di assoni e le loro attivazioni mediante IR sono maggiormente evidenti, in quanto la maggior parte di essi corrisponde a neuroni motori e, quindi, le risposte sono visibili direttamente nei movimenti muscolari, che possono essere misurati quantitativamente attraverso elettromiografia (EMG).

È proprio per questa caratteristica anatomica che il gruppo guidato da Wells è riuscito a provare su nervi sciatici di ratto *in vivo* per la prima volta nel 2005 [108] che la radiazione infrarossa è in grado di

<sup>59</sup> I segnali BOLD sono proporzionali all'intensità del INS

stimolare e modulare risposte nervose nei neuroni, senza che vi siano danni tissutali. Successivamente, il medesimo gruppo ha approfondito i valori minimi dell'energia radiante per ciascuna lunghezza d'onda necessari affinché si evocassero APs, determinando così i valori di soglia di stimolazione e confermando una relazione lineare tra questa e le risposte CNAPs [138].

Questi iniziali studi avevano messo in luce l'importanza di questo approccio di stimolazione anche per merito dell'assenza artefatti durante una registrazione elettrofisiologica, tipicamente presenti durante la stimolazione elettrica, come precedentemente spiegato.

Un ulteriore osservazione che è stata fatta, a dimostrazione dell'elevata precisione spaziale del INS, è che i valori rilevati elettrofisiologicamente sono quattro volte inferiori rispetto al caso in cui si è fatto ricorso agli elettrodi. La ragione di ciò è dovuta dal fatto che meno neuroni sono coinvolti nella stimolazione e minore è risposta nervosa individuata. [9]

Un ulteriore studio [151], utilizzando un differente modello animale, il coniglio, di cui i nervi periferici, in particolare quelli motori, hanno dimensioni maggiori in diametro rispetto ai modelli animali murini, ha dimostrato che INS (1875 nm) mantiene l'elevata precisione spaziale anche in animali differenti. Per contro, però, è stato riscontrato che sono

pochi i muscoli che mostrano risposte motorie a fronte di una stimolazione a singolo canale sui nervi motori a cui sono congiunti tali muscoli. Va specificato che si tratta di una INS extraneurale<sup>60</sup> applicata su un nervo periferico multi-

fascicolare, perciò solo quei nervi superficiali subiscono energie di esposizione radiante sufficienti ad innescare risposte motorie.

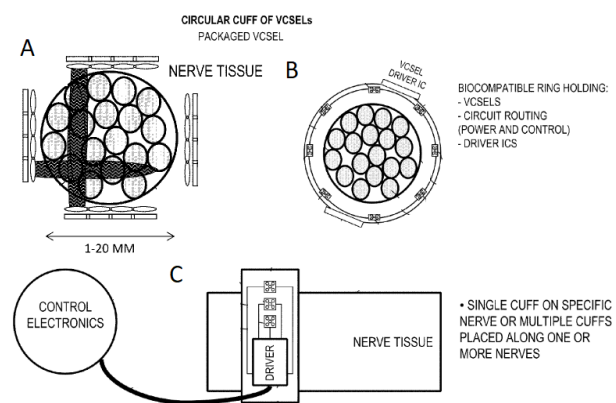


Figura 30  
Implantable infrared nerve stimulation devices for peripheral and cranial nerve interfaces

<sup>60</sup> INS extraneurale consiste di stimolare selettivamente i neuroni senza che la fibra ottica penetri nel tessuto: nel caso del nervo motorio, non c'è la penetrazione nel epineurio o perineurio.



Tuttavia, ciò suggerisce che, per una INS progettata a possedere più canali di stimolazione che circonda una parte del nervo motorio, si possono evocare risposte motorie con maggiore efficacia e controllo. A riguardo di ciò, Wells stesso, insieme ad altri coinventori, ha brevettato questo tipo di INS multicanali (Figura 30) [152]: potenzialmente potrebbe essere usato sia per far recuperare funzioni motorie in pazienti affetti da paralisi delle arti che come dispositivo per interfacce brain-computer (BCIs).

Come ci si può aspettare, le lunghezze d'onda tipiche per una stimolazione dei neuroni periferici, non sono le stesse dei neuroni appartenenti ai tessuti corticali: gran parte dell'energia radiante viene assorbita dalle guaine mieliniche che circondano gli assoni dei neuroni periferici in molte delle lunghezze d'onda tipiche del CNS. Perciò, non solo sono necessari maggiori quantità energia, ma si è costretti anche ad utilizzare radiazioni con lunghezze d'onda che vengono in gran misura assorbite da molecole ben presenti nelle cellule come l'acqua, aumentandone, di conseguenza, i rischi associati ai danni dovuti per ablazione termica.

Come nel caso del CNS, attraverso prove iterative sperimentali effettuate *in vitro*, si è constatato che la lunghezza d'onda con il rapporto tra la soglia stimolazione e la soglia dei danni più sicuro è di  $2.12 \mu\text{m}$  [5] [138].

Tuttavia, altri studi hanno investigato differenti lunghezze d'onda per comprendere ulteriormente i meccanismi che sono alla base del INS, anche se la maggior parte di essi hanno mostrato una durata della depolarizzazione di membrana significativamente prolungata che varia da 100 ms ad alcuni secondi.

Considerevoli sono i risultati ottenuti nello studio di Katz [153]: attraverso la stimolazione ( $\lambda = 1889 \text{ nm}$ ) applicata su differenti neuroni somatosensoriali *in vitro* provenienti da ratti, ovvero neuroni del ganglio della radice dorsale (DRG) e neuroni del ganglio nodosum (NG), si è potuto osservare che le risposte nervose ad essa derivata sono simili, nonostante le differenti funzionalità dei neuroni (meccanosensibile e nocicettivo rispettivamente) e le dimensioni del loro soma. Questo fa dedurre che i meccanismi del INS avvengono a

livello non cellulare ma subcellulare e che non sono mediate da specifici rilasci di neurotrasmettitori. Inoltre, un'altra importante osservazione, che in parte va a confutare l'ipotesi dell'attivazione di quei canali cationici fotosensibili, in particolare quelli appartenenti alla famiglia del TRP [126], è che quest'ultima potrebbe non essere in realtà il principale responsabile dell'innescò di APs a fronte di impulsi IR; infatti, ad esempio, meno del 38% dei neuroni NG e del 32% dei neuroni DRG esprimono il TRPV1.

Per quanto riguarda INS applicata su PNS di pazienti umani, sono molto carenti gli studi condotti su di essi, nonostante l'ormai dimostrata sicurezza di questa tecnologia; d'altronde, solo recentemente, sono stati ottenuti per la prima volta risultati da pazienti umani affetti da paralisi cerebrale, sottoposti a rizotomia dorsale selettiva (SDR) per il trattamento della spasticità refrattaria [154].

Le radici dorsali umani sono dimensionalmente simili a quelle dei nervi sciatici murini e le proprietà ottiche tra questi due tipi di nervi non varia significativamente, perciò possono essere ritenuti un buon modello per cui dimostrare le caratteristiche tipiche del INS, quali la precisione spaziale, sicurezza e la mancanza di artefatti anche su tessuti nervosi umani.

Dopo aver eseguito il protocollo del SDR<sup>61</sup> (ES: 1-10 mA, 100  $\mu$ s durata impulso, 20 Hz) e prima della rimozione delle radici dorsali, varie regioni di quest'ultime vengono sottoposte ad INS clinica ( $\lambda=2.12\mu\text{m}$ ) ad energie di esposizione radiante variabili; con opportune modifiche tecniche, il laser viene portato ad un output con un'energia di esposizione radiante che va da 0 a 2.5 J/cm<sup>2</sup> e con frequenze a 2 Hz.

I risultati EMG mettono in luce che INS mantiene i suoi tipici vantaggi anche su questi tessuti nervosi: ES (Figura 31.A) attiva molteplici gruppi muscolari ed anche alcuni dei controlaterali, a

---

<sup>61</sup> L'intervento normalmente prevede l'esecuzione di una laminectomia della colonna lombare, l'apertura della dura sovrastante delle radici del nervo spinale lombare e l'identificazione fisiologica delle radici del nervo spinale dorsale coinvolte nel riflesso spastico mediante tecniche di stimolazione elettrica standard.

fronte di singole scariche ed allo stesso tempo si presentano artefatti che oscurano i segnali fisiologici rilevati durante la registrazione EMG; mentre INS (Figura 31.B), non solo attiva pochi gruppi muscolari, supportando la grande precisione spaziale di cui è tipica, ma le risposte nervose ad essa derivata sono ben distinguibili e bloccate alla frequenza impostata (2 Hz).

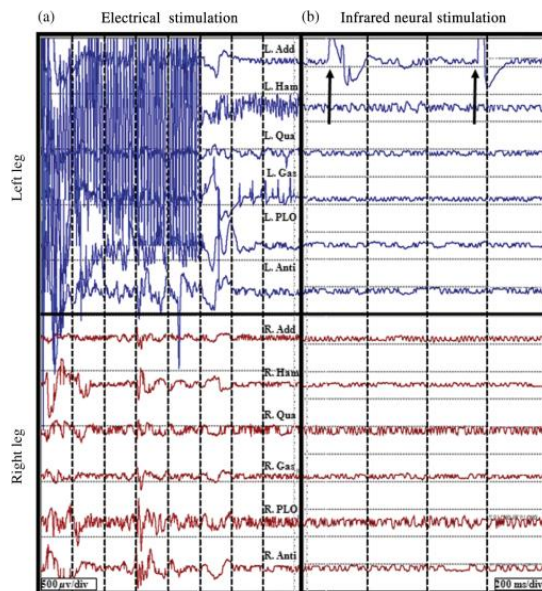


Figura 31

NeuroPhotonics - Infrared neural stimulation of human spinal nerve roots in vivo

Dopodichè, una volta asportate, le radici dorsali vengono sottoposti ad esami istologici al fine di osservare danni arrecati da INS in funzione dell'esposizione radiante: con energie  $< 1.09 \text{ J/cm}^2$  non sono stati individuati danni dovuti dall'ablazione termica, mentre la soglia di stimolazione può essere imposta a  $0.50\text{-}0.53 \text{ J/cm}^2$ . Questi valori definiscono il tipico rapporto tra la soglia di stimolazione e la soglia dei danni osservati anche in altri animali [138] a 2:1. Nonostante gli ottimi risultati di questo studio [154], si pensa siano, comunque, necessari ulteriori studi, perché i tessuti umani dello studio preso in esame sono in uno stato di condizione patologica; i risultati INS potrebbero essere differenti su tessuti umani sani.

Altri studi che hanno accresciuto l'interesse verso INS sono quelli condotti sul cuore: i primi studi di Jenkins [155] [156] fatti su animali murini *in vivo* avevano, infatti, dimostrato che le cellule miocardiche sono a tutti gli effetti sensibili alla radiazione infrarossa.

Impulsi a  $\lambda = 1851$  e  $1.875 \mu\text{m}$  possono innescare l'inizio di un ciclo cardiaco ed anche regolare le frequenze cardiache alle stesse frequenze degli impulsi laser, alterando così le sollecitazioni e la segnalazione meccanicamente trasdotta, senza che vi siano danni alle cellule esposte.

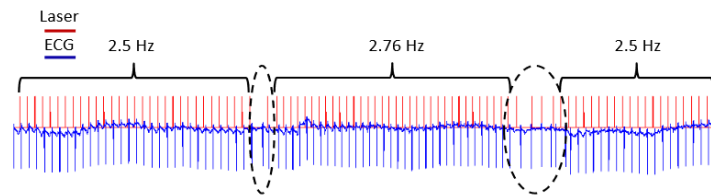


Figura 32

Biomedical Optical Express - Optical pacing of the adult rabbit heart

A prova di ciò, sono i complessi QRS della registrazione ECG che seguono accuratamente gli impulsi laser (Figura 32) applicati su vari parti dell'atrio destro o sinistro di diversi cuori ex vivo di coniglio adulto [156]. Va specificato che si osservano lievi differenze nella soglia di stimolazione tra i diversi atri, dovute, con alta probabilità, alla struttura anatomica individuale di ciascun cuore.

Era, però, già noto dagli anni '70 che la stimolazione ottica, sia con lunghezze d'onda del visibile e dell'ultravioletto, fosse capace di influenzare l'eccitabilità delle cellule miocardiche [7] [157]; tuttavia, sono stati sempre riportati danni a tali cellule perché la luce a lunghezze d'onda inferiori a quelle dell'infrarosso produceva specie ossigeno reattive (ROS), perciò tale tecnica fu subito abbandonata. I meccanismi per i quali si innescano battiti cardiaci a fronte di impulsi IR non sono del tutto noti e sono state avanzate diverse ipotesi. Jenkins e colleghi, ritengono che il meccanismo responsabile della generazione di APs e, di conseguenza, delle contrazioni meccaniche, sia lo stesso dedotto da Wells e colleghi, ovvero il gradiente termico [109] [155].

Al contrario, autori di un altro studio [158] ritengono che il meccanismo principale sia costituito dalle risposte dei segnali di  $Ca^{2+}$  mitocondriali, le quali regolano i metabolismi ossidativi dei mitocondri, perché hanno riscontrato che esse, a fronte di impulsi IR, sono simili a quelle osservate in altri studi [127] [128] [129]; tuttavia, è difficoltoso estrapolare risultati diretti dai mitocondri data la natura altamente dinamica dei cardiomiociti.

Per quanto riguarda la soglia di stimolazione, i valori sono piuttosto differenti a seconda che si tratti di nervi afferenti/efferenti e di neuroni corticali: non solo la durata minima di un impulso affinché si generino APs nelle cellule miocardiche varia da 2.5 ms a 12 ms, ma l'energia di esposizione radiante ha un range di 6-11.8 J/cm<sup>2</sup>

[156], valori ben superiori rispetto a tutti quelli riscontrati in altri studi del INS che non hanno coinvolto queste cellule. Tuttavia, sono stati osservati danni delle pareti cellulari con esposizione radiante pari o superiore a  $7.9 \text{ J/cm}^2$ . Dall'altra parte, però, rimane la caratteristica tipica del INS, ovvero che all'aumentare delle frequenze degli impulsi, la soglia di stimolazione diminuisce.

I risultati ottenuti dalla stimolazione ottica sul cuore sono stati valutati tra i più promettenti nel campo della biologia e medicina rigenerativa; la stimolazione ottica consentirebbe, infatti, di sviluppare nuove metodologie per la comprensione, fin dalla fase embrionale, di quegli stessi fenomeni naturali delle attivazioni elettriche e meccanotrasduttori, ritenuti difficili da studiare. Infatti, la stimolazione elettrica di un cuore embrionale è invasiva e spesso non porta a risultati senza che si presentino danni ai suoi tessuti.

### *INS nella coclea*

La ragione per cui sono diffusi gli studi sulla stimolazione dei SGNs, oltre per interessi clinici, risiede proprio nella struttura stessa della coclea, nella quale i neuroni sono confinati all'interno di uno spazio ben definito e sono organizzati in modo che rende molto semplice la loro stimolazione tramite IR.

I neuroni del SGNs che si trovano alla base della coclea percepiscono i toni ad alte frequenze, i suoni acuti, mentre quelli posti all'apice, i toni a basse frequenze, i suoni gravi; tale distribuzione è detto tonotopicità.

INS, oltre che dal sottile strato in cui risiedono i neuroni uditivi, è favorita anche dal denso strato osseo che trattiene gran parte della radiazione infrarossa non assorbita: ciò evita che la stimolazione arrivi a neuroni o ad altre cellule poste al di là di questi strati ossei.

Per la stessa ragione, anche la stimolazione elettrica attuata sugli stessi neuroni suscitò grande ottimismo in passato: non a caso, gli impianti cocleari elettrici sono i dispositivi bionici che hanno avuto più successo tra tutti quei dispositivi in grado di stimolare neuroni elettricamente, consentendo ad oltre 600'000 pazienti di recuperare l'udito [159] [123] [9].

Nonostante ciò, numerose sono controversie, nella letteratura scientifica, relative ai meccanismi principali di INS applicata alla coclea: ci sono studi che sostengono che l'attivazione dei neuroni sia direttamente correlata agli impulsi IR [123] [134] [160], quindi un'attivazione mediante elevato gradiente termico sui neuroni, ed altri in base ai quali l'origine delle attivazioni sarebbe dovuta ad effetti fotoacustici o fotomeccanici [18] [160] [19].

Tali effetti avvengono quando un piccolo volume allo stato liquido viene rapidamente surriscaldato dagli impulsi laser IR creando delle onde di pressione che, di conseguenza, colpiscono meccanicamente le cellule ciliate, le quali, attivandosi, rilasciano neurotrasmettitori che andranno a stimolare i neuroni sottostanti, innescando così un AP. Tuttavia, è stato osservato che INS evoca risposte nervose, in particolare CAPs, solo in animali con un udito totale o residuo [135], mentre in animali a cui sono stati somministrati alte concentrazioni di sostanze ototossiche<sup>62</sup> si ottengono risultati contrastanti: ci sono studi in cui sono stati rilevati risposte CAPs a fronte di impulsi IR, come gli studi iniziali di Izzo [161] ed altri in cui non ne sono stati riscontrati [135] [162].

Data la discordanza di tali risultati, sono necessari ulteriori studi: probabilmente le sostanze ototossiche, utilizzate in modelli animali per riprodurre la situazione di ipoacusia, potrebbero alterare la funzionalità delle cellule ciliate in modo da impedire ai neuroni uditivi di evocare un AP per insufficienza di energia ottica.

Se, invece, come suggerisce Thompson [163], le cellule ciliate presentassero le mutazioni che determinano la sordità ai mammiferi e fossero, comunque, eccitabili all'esposizione infrarossa innescando risposte nervose, si potrebbe chiarire meglio il meccanismo ed ipotizzare lo sviluppo di un nuovo tipo di impianto cocleare che si baserebbe sulla stimolazione di queste cellule, anziché dei neuroni.

Un'altra caratteristica peculiare del INS applicata nella coclea riguarda i valori soglia della stimolazione IR: questi valori sono considerevolmente inferiori se comparati a quelli corrispondenti ai

---

<sup>62</sup> Le sostanze ototossiche maggiormente utilizzate sono la neomicina, kanamicina ed acido etacrino: queste vengono impiegate per portare alla morte o disfunzione delle cellule ciliate, in modo da rappresentare una situazione di totale o parziale sordità.

modelli periferici o corticali [122]; infatti, vari modelli matematici riportano che è sufficiente un cambiamento di temperatura del  $0.1^{\circ}\text{C}$ , a volte perfino  $0.01^{\circ}\text{C}$ , affinché si inneschi un AP nei SGNs, contrariamente alla variazione di  $1-10^{\circ}\text{C}$  riferito dai modelli INS applicati ai neuroni periferici e corticali [163].

A confermare questi modelli, sono le soglie di stimolazione espresse in energia radiante che sono anch'essi notevolmente inferiori rispetto a quelle dei neuroni periferici o dei tessuti corticali: si individuano singole risposte nervose nel collicolo inferiore<sup>63</sup> (ICC) con impulsi di energia radiante media di  $4.1 \pm 1.9 \mu\text{J/pulse}$  e con esposizione radiante media di  $10.3 \pm 4.9$ ; mentre per risposte CAPs, l'energia radiante media è di  $7.2 \pm 4.7 \mu\text{J/pulse}$  e l'esposizione radiante media è di  $18.9 \pm 12.2 \text{ mJ/cm}^2$  [18].

Questa tipologia di studio fu intrapresa per la prima volta da Izzo e colleghi [134] [123], nel cui studio si stimolavano i neuroni uditivi del gerbillo con impulsi IR ( $\sim 1.94 \mu\text{m}$ ) di durata  $5 \mu\text{s}$  e frequenza 2 Hz; sono stati osservati risposte CAPs sia in animali sordi<sup>64</sup> che di controllo (non sordi), dimostrando l'efficacia del INS.

La precisione spaziale tipica del INS fu verificata successivamente, tramite diverse metodologie, quali tecniche di colorazione con fluorescenza [164], recording del (ICC) [165] e ricostruzioni  $\mu\text{CT}$  della coclea [166].

Gli studi pionieristici di Izzo e colleghi [134] [123] suggeriscono che, per una stimolazione stabile ( $\lambda=1.844$  e  $1.873$ ,  $f= 2$  Hz), la durata degli impulsi non dovrebbe superare i  $30 \mu\text{s}$ , perché impulsi con durate maggiori richiedono un'energia radiante maggiore per avere le stesse risposte neurali.

Inoltre, poiché le frequenze di processamento delle informazioni uditive da parte dei SGNs possono arrivare fino a 1 kHz, impulsi IR con durate superiori a  $30 \mu\text{s}$  ridurrebbero conseguentemente i tempi necessari per il rilassamento termico, incrementando così il rischio di provocare danni termici ai tessuti.

---

<sup>63</sup> ICC si trova nel tronco encefalico ed ha il ruolo di ri-processamento informazioni provenienti dalla coclea per poi inviarli al talamo ed alla corteccia.

<sup>64</sup> Questo studio supporterebbe l'ipotesi che la stimolazione dei SGNs sia direttamente correlata dagli impulsi IR e non mediati da effetti fotoacustici.

Altri studi, invece, si sono occupati di come agissero IR al variare dei parametri come lunghezza d'onda, frequenza e durata massima per cui non si arrechino danni ai tessuti della coclea: 6 h per frequenza di 400 Hz Richter e colleghi; 5 h per frequenza di 250 Hz, impulsi da 100  $\mu$ s,  $\lambda = 1869$  ed energia radiante = 25  $\mu$ J/pulse [167]. In conclusione, i parametri ottimali, comunque, sono fortemente dipendenti dalla posizione della fibra rispetto alla membrana tectoria, perciò sarebbe opportuno usare quelle lunghezze d'onda che determinano una capacità di penetrazione maggiore di tale distanza, anche superiore della distanza tra la fibra ed i neuroni uditivi

### **Inibizione**

Disattivare le attività dei neuroni tramite radiazione infrarossa è un'altra tecnica che solo recentemente è stata apportata delle migliorie, in quanto si tratta di innalzare la temperatura indotta dalla luce, incrementando così il rischio di provocare danni.

L'inibizione di attività neurali mediata dalla luce ha molteplici potenzialità: innanzitutto, come INS, ha una elevata selettività spaziale e non richiede la stessa invasività richiesta dagli altri approcci, come l'optogenetica e l'uso di molecole fotoattive; inoltre, può essere praticata in maniera sicura e reversibile e ciò rende una potenziale tecnica per trattare certe malattie del CNS, le quali provocano iperattività dei neuroni, come la malattia del Parkinson ed epilessia [111] [168].

Una inibizione delle attività nervose indotta dall'incremento della temperatura fu evidenziata già alla fine degli anni '40 da Hodgkin [169], il quale, aumentando la temperatura di neuroni di calamaro, ottenne la diminuzione dell'intensità degli APs, fino al loro totale annullamento.

Successivamente, questa osservazione fu riconfermata da diversi studi sperimentali di Duke [170] e di Cayce [143], il quale si ottenevano gli stessi effetti anche tramite radiazione infrarossa, dopo che la temperatura superasse una certa soglia; perciò, questo è stato chiamato INI (Infrared Neural Inhibition) [5] [123].



Tuttavia, ancora oggi, i meccanismi dell'inibizione rimangono non del tutto compresi, ma è certo che il calore, quindi la variazione di temperatura provocata dalla radiazione infrarossa influenza significativamente la conduttanza, il potenziale e la capacitance di membrana.

Gli studi in materia sono carenti perchè, nonostante le sue potenzialità cliniche, INI può indurre danni ipertermici se le cellule vengono esposte per troppo tempo alla radiazione; si tratta di un aspetto negativo importante.

Non è consigliabile, inoltre, usare le stesse lunghezze d'onda del INS, poiché esse determinano, nella maggior parte dei casi, un basso coefficiente di assorbimento dell'acqua, che comporta una variazione di temperatura non sufficientemente elevata da inibire i APs.

Uno studio recente [168] ha riscontrato che, inducendo una variazione di temperatura compresa tra 5°C e 9°C<sup>65</sup> in neuroni corticali murini *in vitro*, si ha una probabilità di INI ( $\lambda = 1550$  nm) compresa tra 10% e 80%; però, per ciascun impulso ed effettiva inibizione del neurone, la durata di quest'ultima persiste nei 3 s successivi, dopodichè, si ha un ritorno allo stato iniziale, 8 s dopo la fine dell'impulso.

Questa durata è notevolmente maggiore rispetto a quello del rilassamento termico (2 s) che si riscontra nel INS: ciò potrebbe essere dovuto, probabilmente, ad una serie di adattamenti che la cellula attua a fronte di una temperatura che è oltre il range di operatività.

Di conseguenza, anche se la potenza del laser non supera i 56 mW, soglia massima entro cui non si arrecano danni termici, si riscontra spesso maggiori attività nei neuroni rispetto alla condizione normale, anche dopo la fase di ripresa da INI.

Autori di un ulteriore studio [171], al fine di verificare in maniera più diretta l'effettiva inibizione, hanno usufruito dell'optogenetica

---

<sup>65</sup> Corrispondente alla temperatura assoluta di 42 e 46°C

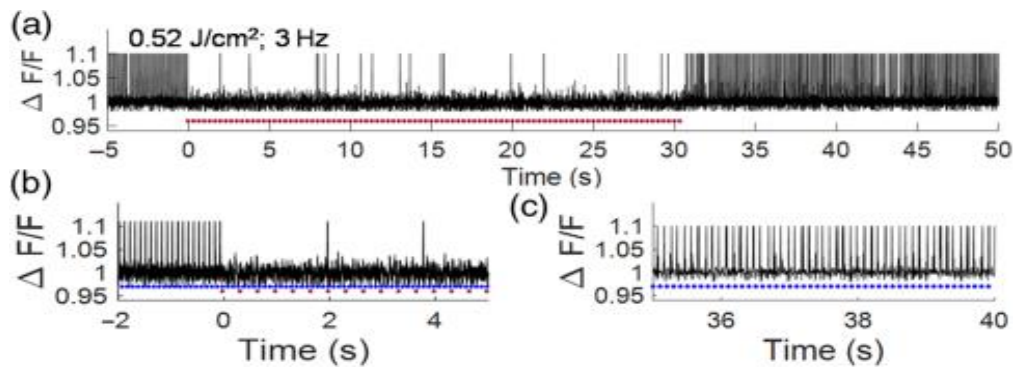


Figura 33

NeuroPhotonics - Action potential block in neurons by infrared light

in neuroni ippocampali murini *in vitro*: le attività di queste cellule, dotate di proteine ChRs e GEVI, per rispondere ad impulsi di luce blu ( $\lambda=488$  nm, 10 Hz,  $\tau_{\text{pulse}}=5$  ms) emettendo fluorescenza, venivano soppresse sotto impulsi IR ( $\lambda = 1869$  nm, diametro fibra  $\sim 200\mu\text{m}$ , esposizione radiante=  $0.13\text{-}0.96$  J/cm<sup>2</sup> ,  $\tau_{\text{pulse}} =1.37\text{-}5.01$  ms) (la Figura 33 mostra l'andamento temporale dei segnali di fluorescenza a fronte di impulsi IR :  $0.52$  J/cm<sup>2</sup>, 3 Hz).

È maggiormente evidente che singoli impulsi IR sopprimono le attività nervose perché quando essi, insieme agli impulsi di luce blu, illuminano i neuroni, non si presenta alcuna fluorescenza. Le analisi riportano, inoltre, che in funzione dell'esposizione radiante, la durata di inibizione cresce in maniera esponenziale<sup>66</sup>, mentre il tempo di recupero cresce linearmente<sup>67</sup>.

Per quanto riguarda, invece, INI applicato in cellule differenti da quelli corticali, anche le attività di quelle cardiache possono essere inibite a fronte di impulsi IR.

Di fatto, Yves e colleghi [172] sono riusciti ad inibire le attività del cuore di quaglia allo stato embrionale, esponendo le cellule cardiache tramite IR ( $\lambda = 1463\text{-nm}$ ,  $\tau_{\text{pulse}} = 200\text{-}\mu\text{s}$ , esposizione radiante =  $66\text{mJ/cm}^2$ ; al contrario delle basse frequenze tipicamente usate nel INS applicato al cuore (2-3 Hz) [156], vengono, però, utilizzate frequenze notevolmente superiori (200 Hz).

Si ipotizza che tale blocco meccanico sia dovuto da uno shock termico provocato dalle elevate frequenze che depositano ingenti

<sup>66</sup> Con esposizione radiante  $> 0.69$  J/cm<sup>2</sup> => durata di inibizione  $> 1$  s

<sup>67</sup> Con esposizione radiante =  $0.26$  J/cm<sup>2</sup> => durata media di ripristino = 2.75 s.

Con esposizione radiante =  $0.96$  J/cm<sup>2</sup> => durata media di ripristino = 11.1 s

Con esposizione radiante  $> 0.96$  J/cm<sup>2</sup> => durata media di ripristino  $> 5$  min

quantità di energia nelle cellule cardiache; infatti, l'analisi di temperatura riporta che ci sono degli incrementi di temperatura compresa tra 10 e 15°C.

È lecito dedurre che tali quantità di energia possano provocare gravi danni alle cellule, ma, attraverso verifiche biochimiche, non sono stati evidenziati segni di necrosi o danni delle pareti cellulari nei 10 minuti successivi ad un'esposizione laser di 30 s, nonostante l'elevata temperatura indotta dagli impulsi IR. Invece, per durate maggiori, i danni si intensificano. Ciò significa che è possibile inibire le attività cardiache e, quindi, funzioni meccaniche del cuore senza arrecare danni, solo per brevi durate di esposizione laser.

Se il laser viene posto sul ventricolo (Figura 34.a), solo quest'ultimo, insieme al tratto di deflusso, risulta bloccato; al contrario, il posizionamento del laser sull'atrio (Figura 34.b) determina l'abolizione completa della contrazione del cuore.

Dopo l'esposizione INI, il cuore riprende con le normali contrazioni.

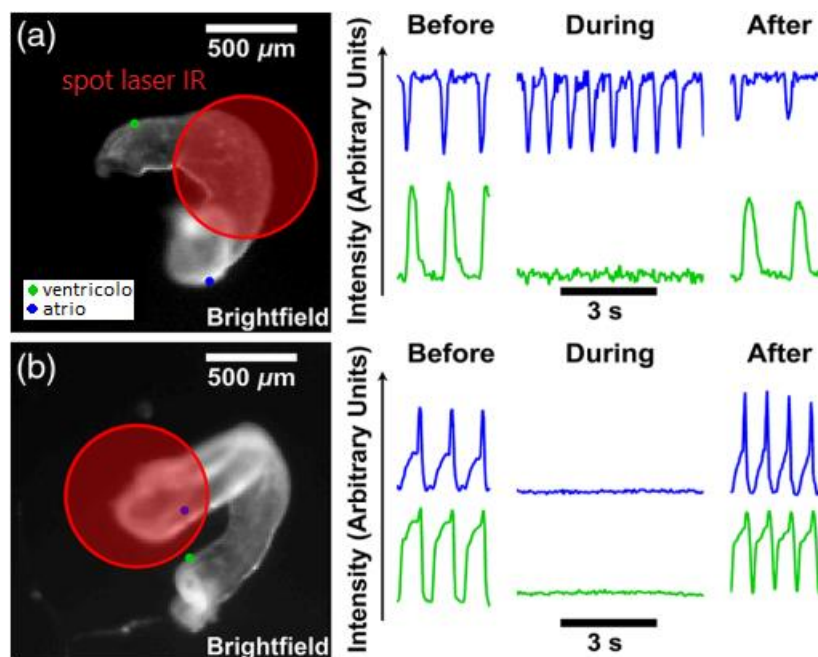


Figura 34

# Conclusione

---

In sintesi, negli ultimi anni, grazie agli sviluppi tecnologici che hanno consentito ad un ampio spettro della luce, si è assistito ad un cambio di paradigma, trasformando e offrendo nuove opportunità alla scienza di base ed all'indagine clinica e riscoprendo le potenzialità intrinseche della luce, prima impossibili da impiegare, nonostante fossero note già dalla fine del XIX secolo.

La stimolazione e la visualizzazione di attività neurali sono, però, tecniche molto sofisticate, perché richiedono la multidisciplinarietà di numerosi settori tecnologici e scientifici. È richiesta, per esempio, una profonda conoscenza di numerosi concetti relativi a ottica, optoelettronica, neurobiologia, biotecnologia, nanotecnologia e scienza dei materiali.

Paradossalmente, proprio questa multidisciplinarietà finisce, spesso, per dare origine ad una delle maggiori difficoltà della scienza: l'uso dei differenti linguaggi e differenti background di apprendimento di ciascuno rendono alquanto complessa l'integrazione delle varie conoscenze; ragion per cui alcuni degli approcci menzionati in questo lavoro, come INS o INI, non hanno inizialmente ricevuto molta attenzione.

Situazione non riscontrabile, al contrario, tra ricercatori che si occupano di optogenetica, perché in possesso di una formazione basata sia sulla biologia molecolare che sulle neuroscienze.

Lo sviluppo di tale approccio, pertanto, ha avuto una spinta maggiore fin dagli inizi, a differenza del INS che, invece, richiede una conoscenza tecnica piuttosto complessa della fisica della luce e delle molecole esogene e delle nanoparticelle.

È evidente che la prima generazione di stimolazione e di imaging è stata caratterizzata da limiti assai rilevanti, intrinseci più alla biologia stessa che alla tecnologia, in quanto la generazione di campi elettrici, che si diffondono attorno agli elettrodi, altera più cellule simultaneamente.

Sviluppi tecnologici successivi hanno utilizzato, per la prima volta, fenomeni ottici, campi magnetici o ultrasuoni, riducendo in maniera

drastica le potenze necessarie agli stimoli primari e l'invasività, e migliorando, quindi, la sicurezza; tuttavia, hanno sofferto ed ancora soffrono di una scarsa risoluzione spaziale.

Tecniche emergenti, utilizzate nei laboratori di ricerca a partire dagli inizi degli anni 2000, sono proprio quelle che il seguente lavoro ha trattato: le nanotecnologie hanno indubbiamente permesso enormi progressi in numerosi settori, in particolare nelle neuroscienze, per la riduzione in scala e la specificità del tipo di cellule, aumentando così la risoluzione spaziale.

Di fatto, si tratta di tecniche nuove che necessitano, quindi, di ulteriori studi prima di essere applicate nei primi test clinici sugli esseri umani. Pur tuttavia, molte di esse, come INS, optogenetica ed uso di molecole esogene hanno dato risultati promettenti sia *in vivo* che *in vitro*, tanto da apprestarsi ad essere migliorate grazie all'interesse che suscitano nella comunità scientifica ed ai progressi tecnologici.

D'altro canto, si avrebbe un quadro più completo, per esempio, se si avessero maggiori evidenze di effetti comportamentali su animali svegli, utilizzando le tecniche trattate nel presente lavoro.

Oramai, esse detengono, infatti, una precisione spaziale paragonabile a quella di un piccolo gruppo di neuroni; studi recenti hanno rafforzato l'idea che si possono osservare cambiamenti nei comportamenti animali con l'attivazione o l'inibizione di singoli circuiti neurali o, addirittura, di un solo neurone [173].

Tuttavia, questi tipi di studi sono stati effettuati per la maggior parte su modelli animali murini; per quanto riguarda i modelli animali primati non umani, sono stati riportati sì importanti risultati, ma, dato il gran numero di variabili coinvolte, ogni singolo studio ha riguardato solo un piccolo bias statistico di una specifica modalità di comportamento, rispetto a un'altra nell'ambito di centinaia di prove. Numerosi sono gli interessi alla base dello sviluppo di queste tecniche, ed uno riguarda indubbiamente lo sviluppo di interfacce brain-computer (BCIs).

Infatti, le tecniche trattate in questo lavoro possono, a tutti gli effetti, essere parti integranti di un sistema read-in e read-out necessarie ad un BCI.

Molti sono i possibili modelli di BCI alla base dei fenomeni ottici, ma l'autore ritiene che uno dei BCI più efficienti possa essere quello che si basa su tecniche optogenetiche [11].

Indicatori come i GEVIs (Genetically Encoded Voltage Indicators) adempiono a compiti di read-out, dato che la loro bioluminescenza può essere rilevata da microscopi in maniera lineare, in risposta a segnali di membrana dei neuroni, come APs. In questo modo, si potrebbero “leggere” attività motorie, sensoriali ed intenzionali con alta precisione; tuttavia, sarebbe piuttosto invasivo collocare microscopi, come il 2P microscopy, su ogni neurone, considerando anche la dimensione di questi strumenti. Inoltre, la rilevazione è sensibile al movimento, quindi sarebbe piuttosto complesso e problematico localizzare e tracciare l'attività neurale di neuroni periferici soggetti a movimento continuo.

Per quanto riguarda, invece, gli attuatori, le difficoltà vengono meno, soprattutto perché esistono numerosi varianti di questa tipologia, come le ChRs e le NpHRs, che rendono più versatile la possibilità di “scrivere” le attività nervose.

Inoltre, le tecnologie delle fibre ottiche e dei laser sono piuttosto avanzate e rendono possibili, ad esempio, controlli motori con difficoltà significativamente inferiori rispetto alla “lettura” ottica ed alle convenzionali “scritture” via elettrodi; grazie alla precisione spaziale indubbiamente superiore, si riduce la complessità degli algoritmi di cui i BCI elettrici necessitano.

Un'altra tipologia di BCI che merita attenzione, è quella citata dalla revisione di Naseer e Hong [174]: si tratta del sistema BCI basata sul fNIRS.

Essa è economica, portatile e, soprattutto, non invasiva, in quanto facilmente indossabile su più parti della testa, determinando, così, un alto numero di comandi motori ed intenzionali. Tuttavia, la presenza del ritardo intrinseco nella risposta emodinamica limita l'uso del fNIRS.

Ma se il BCI basato sul fNIRS viene combinato con migliori algoritmi di classificazione, con reti neurali artificiali <sup>68</sup> e con elettroencefalogramma (EEG), l'intero sistema BCI risulta ottimizzato a livello di accuratezza e le informazioni possono essere trasferite ed elaborate ad elevate velocità.

Sviluppi futuri per il read-in includono sviluppi avanzati di sistemi di controllo wireless a bassi consumi, di migliori attuatori optogenetici e di LEDs e varianti, in modo da avere la possibilità di controllare spazialmente pattern di luce in maniera rapida e precisa e da attivare neuroni alla risoluzione cellulare tridimensionale.

Invece, sviluppi futuri per il read-out includono sia progettazioni di indicatori GEVIs con elevata risposta di fluorescenza in funzione di potenziali di membrana, sia, in particolare, sistemi di imaging più performanti, in modo da avere risoluzioni spaziali migliori e profondità di penetrazione maggiori.

Quest'ultimi, inoltre, dovranno essere più stabili nell'acquisizione di fenomeni dinamici ed in grado di rilevare ogni singolo APs o segnale nervoso significativo.

Sono necessarie, infine, anche progettazioni di nanoparticelle più sicure e specifiche, di vettori virali ad alta specificità che minimizzino le risposte immunitarie e di transgeni che vengano espressi in maniera più duratura nelle cellule di interesse.

---

<sup>68</sup> Le reti neurali artificiali possono abbattere significativamente i costi computazionali, rendendo un computer più efficiente e veloce.

## Bibliografia

---

- [1] S. A. Josselyn, «The past, present and future of light-gated ion channels and optogenetics.» 2018. [Online]. Available: <https://elifesciences.org/articles/42367>.
- [2] M. Chernov e A. W. Roe, «Infrared neural stimulation: a new stimulation tool for central nervous system applications.» 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/1.NPh.1.1.011011>.
- [3] A. M. Aravanis, L.-P. Wang, F. Zhang, L. A. Meltzer, M. Z. Mogri, M. B. Schneider e K. Deisseroth, «An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology.» 2007. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1088/1741-2560/4/3/S02>.
- [4] A. Dieter, C. J. Duque-Afonso, V. Rankovic, M. Jeschke e T. Moser, «Near physiological spectral selectivity of cochlear optogenetics.» 2019. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-09980-7>.
- [5] C.-P. Richter, A. Izzo, J. Wells, D. Jansen e J. Walsh, «Neural stimulation with optical radiation.» 2011. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/lpor.200900044>.
- [6] J. J. Katz e T. R. Janson, «PHOTOCHEMICAL STIMULATION OF NERVES». USA Brevetto 3,900,034, 1975.
- [7] R. L. Fork, «Laser Stimulation of Nerve Cells in Aplysia.» 1971. [Online]. Available: <https://science.sciencemag.org/content/171/3974/907>.
- [8] D. H. Auston, «Ultrafast Optoelectronics.» 1988. [Online]. Available: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-02546-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-662-02546-8_5).
- [9] A. C. Thompson, P. R. Stoddart e D. E. Jansen, «Optical Stimulation of Neurons.» 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.2174/2211555203666141117220611>.
- [10] S. Park, G. Loke, Y. Fink e P. Anikeeva, «Flexible fiber-based optoelectronics for neural interfaces.» , 2019. [Online]. Available: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/cs/c8cs00710a>.
- [11] H. E. Anderson e R. F. Weir, «On the development of optical peripheral nerve interfaces.» 2018. [Online]. Available: [www.nrronline.org/article.asp?issn=1673-5374;year=2019;volume=14;issue=3;spage=425;epage=436;aulast=Anderson](http://www.nrronline.org/article.asp?issn=1673-5374;year=2019;volume=14;issue=3;spage=425;epage=436;aulast=Anderson).
- [12] K. Guo, X. Zhao, X. Dai, N. Zhao e F. Xu, «Organic/inorganic nanohybrids as multifunctional gene delivery systems.» 2019. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jgm.3084>.
- [13] R. H. Kramer, D. L. Fortin e D. Trauner, «New photochemical tools for controlling neuronal activity.» 2009. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959438809001263?via%3Dihub>.
- [14] J. Wells, C. Kao, P. Konrad, T. Milner, J. Kim, A. Mahadevan-Jansen e D. Jansen, «Biophysical Mechanisms of Transient Optical Stimulation of Peripheral Nerve.» 2007. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104786>.
- [15] A. Duke, H. L. Lu, M. Jenkins, H. Chiel e D. Jansen, «Spatial and temporal variability in response to hybrid electro-optical stimulation.» 2012. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1088/1741-2560/9/3/036003>.
- [16] R. Servay e J. Jewett, *Fisica per Scienze ed Ingegneria - V edizione*, EdiSES, 2015.
- [17] A. J. Visser e O. J. Rolinski, «BASIC PHOTOPHYSICS.» 2014. [Online]. Available: <http://photobiology.info/Visser-Rolinski.html>.
- [18] X. Tan, S. Rajguru, H. Young, N. Xia, S. R. Stock, X. Xiao e C.-P. Richter, «Radiant energy required for infrared neural stimulation.» 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/srep13273>.
- [19] N. Kallweit, P. Baumhoff, A. Krueger, N. Tinne, A. Kral, T. Ripken e H. Maier, «Optoacoustic effect is responsible for laser-induced cochlear responses.» 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/srep28141>.
- [20] A. N. Yaroslavsky, P. C. Schulze, I. V. Yaroslavsky, R. Schober, F. Ulrich e H.-J. Schwarzmaier, «Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range.» 2002. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/47/12/305>.



- [21] V. G. Peters, D. R. Wyman, M. S. Patterson e G. L. Frank, «Optical properties of normal and diseased human breast tissues in the visible and near infrared,» 1990. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/35/9/010>.
- [22] M. Hlavàc, «Measurement of tissue optical properties,» 2013. [Online]. Available: <https://cyber.felk.cvut.cz/theses/papers/346.pdf>.
- [23] D. U. Silverthorn, *FISIOLOGIA UMANA*, PEARSON, 2013.
- [24] M. H. Niemz, *Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications*, Springer International Publishing, 2019.
- [25] P. G. Bush, D. L. Wokosin e A. C. Hall, «Two-versus one photon excitation laser scanning microscopy: Critical importance of excitation wavelength,» 2007. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127269>.
- [26] D. E. Mitchell, É. Martineau, S. Tazerart e A. Roberto, «Probing Single Synapses via the Photolytic Release of Neurotransmitters,» 2019. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsyn.2019.00019/full>.
- [27] G. C. R. Ellis-Davies, «Two-Photon Uncaging of Glutamate,» 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00048>.
- [28] M. AKienzler e E. YIsacoff, «Precise modulation of neuronal activity with synthetic photoswitchable ligands,» 2017. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.021>.
- [29] G. C. R. Ellis-Davies, «Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology,» 2014. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nmeth1072>.
- [30] B. N. Zemelman, N. Nesnas, G. A. Lee e G. Miesenböck, «Photochemical gating of heterologous ion channels: Remote control over genetically designated populations of neurons,» 2003. [Online]. Available: <https://www.pnas.org/content/100/3/1352>.
- [31] R. H. Kramer, J. J. Chambers e T. Dirk, «Photochemical tools for remote control of ion channels in excitable cells,» 2005. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nchembio750>.
- [32] W. Li, J. Lin, T. Wang e P. Huang, «Photo-triggered Drug Delivery Systems for Neuron-related Applications,» 2019. [Online]. Available: <http://www.eurekaselect.com/163179/article>.
- [33] I. Tochitsky, M. A. Kienzler, E. Isacoff e R. H. Kramer, «Restoring Vision to the Blind with Chemical Photoswitches,» 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00723>.
- [34] D. Warther, S. Gug, A. Specht, F. Bolze, J.-F. Nicoud, A. Mourot e M. Goeldner, «Two-photon uncaging: New prospects in neuroscience and cellular biology,» 2010. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.04.084>.
- [35] E. Rial, R. Verde, L. Zayat, R. Etchenique e R. Yuste, «Photorelease of GABA with visible light using an inorganic caging group,» 2008. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/neuro.04.002.2008/full>.
- [36] W. Li, R. Luo, A. D. Jadhav, Z. Zhang, L. Yan, C.-Y. Chan, X. Chen, J. He, C.-H. Chen e P. Shi, «Remote modulation of neural activities via near-infrared triggered release of biomolecules,» 2015. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961215005554>.
- [37] G. Cabré, A. Garrido-Charles, M. Moreno, M. Bosch, M. Porta-de-la-Riva, M. Krieg, M. Gascón-Moya, N. Camarero, R. Gelabert, J. Lluch, F. Busqué, J. Hernando, P. Gorostiza e R. Alibés, «Rationally designed azobenzene photoswitches for efficient two-photon neuronal excitation,» 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08796-9>.
- [38] A. Beharrya e A. Woolley, «Azobenzene photoswitches for biomolecules,» 2011. [Online]. Available: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/cs/c1cs15023e#!divAbstract>.
- [39] E. R. Thapaliya, J. Zhao e G. Ellis-Davies, «Locked-Azobenzene: Testing the Scope of a Unique Photoswitchable Scaffold for Cell Physiology,» 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00734>.

- [40] Mourot, Alexandre, I. Tochitsky e R. H. Kramer, «Light at the end of the channel: optical manipulation of intrinsic neuronal excitability with chemical photoswitches,» 2013. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2013.00005/full>.
- [41] W. J. Deal, B. Erlanger, F. e D. Nachmansohn, «PHOTOREGULATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY BY PHOTOCROMIC REAGENTS. III. PHOTOREGULATION OF BIOELECTRICITY BY ACETYLCHOLINE RECEPTOR INHIBITORS,» 1969. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1073/pnas.64.4.1230>.
- [42] S. Szobota, P. Gorostiza, F. Del Bene, C. Wyart, D. L. Fortin, K. D. Kolstad, O. Tulyathan, M. Volgraf, R. Numano, H. L. Aaron, E. K. Scott, R. H. Kramer, J. Flannery e H. Baier, «Remote Control of Neuronal Activity with a Light-Gated Glutamate Receptor,» 2007. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.010>.
- [43] J. Levitz, A. T. Popescu, A. Reiner e E. Y. Isacoff, «A Toolkit for Orthogonal and in vivo Optical Manipulation of Ionotropic Glutamate Receptors,» 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00002>.
- [44] D. L. Fortin, M. R. Banghart, T. W. Dunn, K. Borges, D. A. Wagenaar, Q. Gaudry, M. H. Karakossian, T. S. Otis, W. B. Kristan, D. Trauner e R. H. Kramer, «Photochemical control of endogenous ion channels and cellular excitability,» 2008. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nmeth.1187>.
- [45] M. Mortensen, F. Iqbal, A. Pandurangan, S. Hannan, R. Huckvale, M. Topf, J. R. Baker e T. G. Smart, «Photo-antagonism of the GABAA receptor,» 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/ncomms5454>.
- [46] T. Huber e T. P. Sakmar, «Chemical Biology Methods for Investigating G Protein-Coupled Receptor Signaling,» 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.08.009>.
- [47] A. Takeda, T. Komatsu, H. Nomura, M. Naka, N. Matsuki, Y. Ikegaya, T. Terai, T. Ueno, K. Hanaoka, T. Nagano e Y. Urano, «Unexpected Photo-instability of 2,6-Sulfonamide-Substituted BODIPYs and Its Application to Caged GABA,» 2016. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbic.201600097>.
- [48] M. L. DiFrancesco, F. Lodola, E. Colombo, L. Maragliano, G. M. Pater, M. Bramini, S. Cimò, L. Colella, D. Fazzi, C. G. Eleftheriou, J. F. Maya-Vetencourt, C. Bertarelli, G. Lanzani e F. Benfenati, «A Membrane-Targeted Photoswitch Potently Modulates Neuronal Firing,» 2019. [Online]. Available: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/711077v1.full>.
- [49] B. V. Zemelman, G. A. Lee, M. Ng e G. Miesenböck, «Selective Photostimulation of Genetically ChARGed Neurons,» 2002. [Online]. Available: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00574-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00574-8).
- [50] K. Deisseroth, G. Feng, A. K. Majewska, G. Miesenböck, A. Ting e M. J. Schnitzer, «Next-Generation Optical Technologies for Illuminating Genetically Targeted Brain Circuits,» 2006. [Online]. Available: <https://www.jneurosci.org/content/26/41/10380>.
- [51] E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel e K. Deisseroth, «Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity,» 2005. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nn1525>.
- [52] P. Sae-Geun, J. Yong-Cheol, K. Dae-Gun, L. Min-Hyung, S. Anna, P. Geunhong, R. Jia, H. Jiso, B. Seohui, K. Cheol-Hu, L. Phill-Seung e K. Daesoo, «Medial preoptic circuit induces hunting-like actions to target objects and prey,» 2018. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41593-018-0072-x>.
- [53] S.-Y. Kim, A. Adhikari, S. Y. Lee, J. H. Marshel, C. K. Kim, C. S. Mallory, M. Lo, S. Pak, J. Mattis, B. K. Lim, R. C. Malenka, M. R. Warden, R. Neve, K. M. Tye e K. Deisseroth, «Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety,» 2013. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nature12018>.
- [54] X. Liu, S. Ramirez, P. T. Pang, C. B. Puryear, A. Govindarajan, K. Deisseroth e S. Tonegawa, «Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall,» 2012. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nature11028>.
- [55] A. J. Rashid, C. Yan, V. Mercaldo, H.-L. Hsiang, S. Park, C. J. Cole, A. De Cristofaro, J. Yu, C. Ramakrishnan, S. Y. Lee, K. Deisseroth, P. W. Frankland e S. A. Josselyn, «Competition between engrams influences fear memory formation and recall,» 2016. [Online]. Available: <https://science.sciencemag.org/content/353/6297/383>.
- [56] J. H. Siegle e M. A. Wilson, «Enhancement of encoding and retrieval functions through theta phase-specific manipulation of hippocampus,» 2014. [Online]. Available: <https://elifesciences.org/articles/03061>.

- [57] A. R. Adamantidis, F. Zhang, A. M. Aravanis, K. Deisseroth e L. de Lecea, «Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons,» 2007. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nature06310>.
- [58] A. V. Kravitz, B. S. Freeze, P. R. L. Parker, K. Kay, M. T. Thwin, K. Deisseroth e A. C. Kreitzer, «Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry,» 2010. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nature09159>.
- [59] B. T. Saunders, J. M. Richard, E. B. Margolis e P. H. Janak, «Dopamine neurons create Pavlovian conditioned stimuli with circuit-defined motivational properties,» 2018. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41593-018-0191-4>.
- [60] A. R. Adamantidis, H.-C. Tsai, B. Boutrel, F. Zhang, G. D. Stuber, E. A. Budygin, C. Touri, A. Bonci, K. Deisseroth e L. de Lecea, «Optogenetic Interrogation of Dopaminergic Modulation of the Multiple Phases of Reward-Seeking Behavior,» 2011. [Online]. Available: <https://www.jneurosci.org/content/31/30/10829>.
- [61] M. E. Flanigan e S. J. Russo, «Recent advances in the study of aggression,» 2019. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41386-018-0226-2>.
- [62] F. Zhang, J. Vierock, O. Yizhar, L. E. Fenno, S. Tsunoda, A. Kianianmomeni, M. Prigge, A. Berndt, J. Cushman, J. Polle, J. Magnuson, P. Hegemann e K. Deisseroth, «The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools,» 2011. [Online]. Available: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(11\)01502-9?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867411015029%3Fsho%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(11)01502-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867411015029%3Fsho%3Dtrue).
- [63] J. L. Spudich, C.-S. Yang, K.-H. Jung e E. N. Spudich, «Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans,» 2000. [Online]. Available: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.16.1.365>.
- [64] J. L. Spudich, «The multitalented microbial sensory rhodopsins,» 2006. [Online]. Available: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(06\)00231-9](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(06)00231-9).
- [65] T. P. Sakmar, «Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same,» 2002. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095506740200306X>.
- [66] W. STOECKENIUS e D. OESTERHELT, «Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium halobium,» 1971. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/newbio233149a0>.
- [67] W. Stoeckenius e E. Racker, «Reconstitution of Purple Membrane Vesicles Catalyzing Light-driven Proton Uptake and Adenosine Triphosphate Formation,» 1973. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/249/2/662.short?249/2/662>.
- [68] G. Váró, L. S. Brown, M. Lakatos e J. K. Lanyi, «Characterization of the Photochemical Reaction Cycle of Proteorhodopsin,» 2003. [Online]. Available: [https://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495\(03\)74934-0](https://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495(03)74934-0).
- [69] J. L. Spudich, «Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins,» 2002. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00859.x>.
- [70] A. Matsuno-Yagi e Y. Mukohata, «Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of Halobacterium halobium differing in pigmentation,» 1977. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X77912451>.
- [71] L. O. Essen, «Halorhodopsin: light-driven ion pumping made simple?,» 2002. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959440X02003561>.
- [72] B. Schobert e J. K. Lanyi, «Halorhodopsin is a light-driven chloride pump,» 1982. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/257/17/10306.full.pdf>.
- [73] F. Zhang, L.-P. Wang, M. Brauner, J. F. Liwald, K. Kay, N. Watzke, P. G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk e K. Deisseroth, «Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry,» 2007. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nature05744>.
- [74] X. Han e E. S. Boyden, «Multiple-Color Optical Activation, Silencing, and Desynchronization of Neural Activity, with Single-Spike Temporal Resolution,» 2007. [Online]. Available: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000299>.

- [75] G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. Musti, E. Bamberg e P. Hegemann, «Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae.» 2002. [Online]. Available: <https://science.sciencemag.org/content/296/5577/2395>.
- [76] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann e E. Bamberg, «Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel.» 2003. [Online]. Available: <https://www.pnas.org/content/100/24/13940>.
- [77] T. Mager, D. Lopez de la Morena, V. Senn, J. Schlotte, A. D'Errico, K. Feldbauer, C. Wrobel, S. Jung, K. Bodensiek, V. Rankovic, L. Browne, A. Huet, J. Jüttner, P. G. Wood, J. J. Letzkus, T. Moser e E. Bamberg, «High frequency neural spiking and auditory signaling by ultrafast red-shifted optogenetics.» 2018. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-04146-3>.
- [78] L. A. Gunaydin, O. Yizhar, A. Berndt, V. S. Sohal, K. Deisseroth e P. Hegemann, «Ultrafast optogenetic control.» 2010. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nn.2495>.
- [79] J. Y. Lin, M. Z. Lin, P. Steinbach e R. Y. Tsien, «Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics.» 2009. [Online]. Available: [https://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495\(09\)00016-2](https://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495(09)00016-2).
- [80] F. Schneider, C. Grimm e P. Hegemann, «Biophysics of Channelrhodopsin.» 2015. [Online]. Available: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biophys-060414-034014>.
- [81] A. Berndt, O. Yizhar, L. A. Gunaydin, P. Hegemann e K. Deisseroth, «Bi-stable neural state switches.» 2009. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nn.2247>.
- [82] K. Deisseroth e P. Hegemann, «The form and function of channelrhodopsin.» 2017. [Online]. Available: <https://science.sciencemag.org/content/357/6356/eaan5544>.
- [83] F. Zhang, M. Prigge, F. Beyrière, S. P. Tsunoda, J. Mattis, O. Yizhar, P. Hegemann e K. Deisseroth, «Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*.» 2008. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nn.2120>.
- [84] O. Yizhar, L. E. Fenno, M. Prigge, F. Schneider, T. J. Davidson, D. J. O'Shea, V. S. Sohal, I. Goshen, J. Finkelstein, J. T. Paz, K. Stehfest, R. Fudim, C. Ramakrishnan, J. R. Huguenard, P. Hegemann e K. Deisseroth, «Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction.» 2011. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nature10360>.
- [85] J. Y. Lin, P. M. Knutsen, A. Muller, D. Kleinfeld e R. Y. Tsien, «ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation.» 2013. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nn.3502>.
- [86] S. Kleinlogel, K. Feldbauer, R. E. Dempski, H. Fotis, P. G. Wood, C. Bamann e B. Ernst, «Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca<sup>2+</sup>-permeable channelrhodopsin CatCh.» 2011. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nn.2776>.
- [87] N. C. Klapoetke, Y. Murata, S. S. Kim, S. R. Pulver, A. Birdsey-Benson, Y. K. Cho, T. K. Morimoto, A. S. Chuong, E. J. Carpenter, Z. Tian, J. Wang, Y. Xie, Z. Yan, Y. Zhang, B. Y. Chow, B. Surek, M. Melkonian, V. Jayaraman, M. Constantine-Paton, G. K.-S. Wong e E. S. Boyden, «Independent optical excitation of distinct neural populations.» 2014. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nmeth.2836>.
- [88] H. E. Kato, Y. S. Kim, J. M. Paggi, K. E. Evans, W. E. Allen, C. Richardson, K. Inoue, S. Ito, C. Ramakrishnan, L. E. Fenno, K. Yamashita, D. Hilger, S. Y. Lee, A. Berndt, K. Shen, H. Kandori, R. O. Dror, B. K. Kobilka e K. Deisseroth, «Structural mechanisms of selectivity and gating in anion channelrhodopsins.» 2018. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41586-018-0504-5>.
- [89] J. Wietek, J. S. Wiegert, N. Adeishvili, F. Schneider, H. Watanabe, S. P. Tsunoda, A. Vogt, M. Elstner, T. G. Oertner e P. Hegemann, «Conversion of Channelrhodopsin into a Light-Gated Chloride Channel.» 2014. [Online]. Available: <https://science.sciencemag.org/node/496568.full>.
- [90] J. S. Wiegert, M. Mahn, M. Prigge, Y. Printz e O. Yizhar, «Silencing Neurons: Tools, Applications, and Experimental Constraints.» 2017. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.050>.
- [91] M. Kannan, G. Vasani e V. A. Pieribone, «A Genetically Encoded Optical Probe of Membrane Voltage.» 2019. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00053/full>.

- [92] W. Akemann, H. Mutoh, A. Perron, Y. K. Park, Y. Iwamoto e T. Knöpfel, «Imaging neural circuit dynamics with a voltage-sensitive fluorescent protein.,» 2012. [Online]. Available: <https://www.physiology.org/doi/full/10.1152/jn.00452.2012>.
- [93] G. Yiyang, H. Cheng, Z. L. Jin, F. G. Benjamin, Z. Yanping, E. Stephan e J. S. Mark, «High-speed recording of neural spikes in awake mice and flies with a fluorescent voltage sensor.,» 2015. [Online]. Available: <https://science.sciencemag.org/content/350/6266/1361>.
- [94] F. Helmchen, K. Imoto e B. Sakmann, «Ca<sup>2+</sup> buffering and action potential-evoked Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites of pyramidal neurons.,» 1996. [Online]. Available: [https://www.cell.com/biophysj/pdf/S0006-3495\(96\)79653-4.pdf](https://www.cell.com/biophysj/pdf/S0006-3495(96)79653-4.pdf).
- [95] H. Y. Helen e S.-P. François, «Genetically Encoded Voltage Indicators: Opportunities and Challenges.,» 2016. [Online]. Available: <https://www.jneurosci.org/content/36/39/9977>.
- [96] P. Zou, Y. Zhao, A. D. Douglass, D. R. Hochbaum, D. Brinks, C. A. Werley, D. J. Harrison, R. E. Campbell e A. E. Cohen, «Bright and fast multicoloured voltage reporters via electrochromic FRET.,» 2014. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/ncomms5625>.
- [97] S. Chamberland, H. H. Yang, M. M. Pan, S. W. Evans, S. Guan, M. Chavarha, Y. Yang, C. Salesse, H. Wu, J. C. Wu, T. R. Clandinin, K. Toth, M. Z. Lin e F. St-Pierre, «Fast two-photon imaging of subcellular voltage dynamics in neuronal tissue with genetically encoded indicators.,» 2017. [Online]. Available: <https://elifesciences.org/articles/25690>.
- [98] Y. Xu, L. Peng, S. Wang, A. Wang, R. Ma, Y. Zhou, J. Yang, D.-e. Sun, W. Lin, X. Chen e P. Zou, «Hybrid Indicators for Fast and Sensitive Voltage Imaging.,» 2018. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201712614>.
- [99] L. Sjulson, D. Cassataro, S. DasGupta e G. Miesenböck, «Cell-Specific Targeting of Genetically Encoded Tools for Neuroscience.,» 2016. [Online]. Available: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-genet-120215-035011>.
- [100] M. Ramamoorth e A. Narvekar, «Non viral vectors in gene therapy- an overview.,» 2014. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nrg3763>.
- [101] L. W. Seymour e A. J. Thrasher, «Gene therapy matures in the clinic.,» 2012. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nbt.2290>.
- [102] H. Uludag, A. Ubeda e A. Ansari, «At the Intersection of Biomaterials and Gene Therapy: Progress in Non-viral Delivery of Nucleic Acids.,» 2019. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00131/full>.
- [103] C. K. Baker e G. Flannery, «Innovative Optogenetic Strategies for Vision Restoration.,» 2018. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00316/full>.
- [104] C. Schroll, T. Riemensperger, D. Bucher, G. Nagel, E. Buchner e A. Fiala, «Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae.,» 2006. [Online]. Available: [https://www.cell.com/abstract/S0960-9822\(06\)01854-9](https://www.cell.com/abstract/S0960-9822(06)01854-9).
- [105] V. H. Hernandez, A. Gehrt, Z. Jing, G. Hoch, M. Jeschke, N. Strenzke e T. Moser, «Optogenetic stimulation of the auditory nerve.,» 2014. [Online]. Available: <https://www.jove.com/video/52069/optogenetic-stimulation-of-the-auditory-nerve>.
- [106] J. Nassi, M. Avery e J. Reynolds, «Inferring neural circuit properties from optogenetic stimulation.,» 2018. [Online]. Available: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0205386>.
- [107] E. J. Hamel, B. F. Grewe, J. G. Parker e M. J. Schnitzer, «Cellular level brain imaging in behaving mammals: an engineering approach.,» 2015. [Online]. Available: [https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(15\)00279-2?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627315002792%3Fsho-wall%3Dtrue](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(15)00279-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627315002792%3Fsho-wall%3Dtrue).
- [108] J. Wells, C. Kao, K. Mariappan, J. Albea, E. D. Jansen, P. Konrad e M.-J. Anita, «Optical stimulation of neural tissue in vivo.,» 2005. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1364/OL.30.000504>.
- [109] J. D. Wells, C. Kao, D. Jansen, P. E. Konrad e A. Mahadevan-Jansen, «Application of infrared light for in vivo neural stimulation.,» 2005. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/1.2121772>.

- [110] F. Vatanserver e M. R. Hamblin, «Far infrared radiation (FIR): Its biological effects and medical applications,» 2012. [Online]. Available: <https://www.degruyter.com/view/j/plm.2012.1.issue-4/plm-2012-0034/plm-2012-0034.xml>.
- [111] S.-R. Tsai e M. R. Hamblin, «Biological effects and medical applications of infrared radiation,» 2017. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.014>.
- [112] A. G. Xu, M. Qian, F. Tian, B. Xu, R. M. Friedman, J. Wang, X. Song, Y. Sun, M. M. Chernov, J. M. Cayce, E. D. Jansen, A. Mahadevan-Jansen, X. Zhang, G. Chen e A. W. Roe, «Focal infrared neural stimulation with high-field functional MRI: A rapid way to map mesoscale brain connectomes,» 2019. [Online]. Available: <https://advances.sciencemag.org/content/5/4/eaau7046>.
- [113] J. Cayce, C. Kao, J. Malphrus, P. E. Konrad, A. Mahadevan-Jansen e D. Jansen, «Infrared Neural Stimulation of Thalamocortical Brain Slices,» 2010. [Online]. Available: <https://ieeexplore.ieee.org/document/5306093>.
- [114] H. Toyokawa, Y. Matsui, J. Uhara, H. Tsuchiya, S. Teshima, H. Nakanishi, A.-H. Kwon, Y. Azuma, T. Nagaoka, T. Ogawa e Y. Kamiyama, «Promotive Effects of Far-Infrared Ray on Full-Thickness Skin Wound Healing in Rats,» 2003. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1177/153537020322800612>.
- [115] S. Hwang, D.-H. Lee, I.-K. Lee, Y. M. Park e I. Jo, «Far-infrared radiation inhibits proliferation, migration, and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells by suppressing secretory clusterin levels,» 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.12.011>.
- [116] K. Yamashita, S.-O. Dalkhsuren, T. Ishikawa, K. Sumida, J. Ishibashi, H. Hosokawa, A. Ueno, F. Nasu e S. Kitamura, «Far Infrared Ray Radiation Inhibits the Proliferation of A549, HSC3 and Sa3 Cancer Cells through Enhancing the Expression of ATF3 Gene,» 2010. [Online]. Available: [https://www.scirp.org/pdf/JEMAA20100600006\\_32418116.pdf](https://www.scirp.org/pdf/JEMAA20100600006_32418116.pdf).
- [117] D. M. Johnstone, C. Moro, J. Stone, A.-L. Benabid e J. Mitrofanis, «Turning On Lights to Stop Neurodegeneration: The Potential of Near Infrared Light Therapy in Alzheimer's and Parkinson's Disease,» 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00500>.
- [118] J.-C. Chang, S.-L. Wu, F. Hoel, Y.-S. Cheng, K.-H. Liu, M. Hsieh, A. Hoel, K. J. Tronstad, K.-C. Yan, C.-L. Hsieh, W.-Y. Lin, S.-J. Kuo, S.-L. Su e C.-S. Liu, «Far-infrared radiation protects viability in a cell model of Spinocerebellar Ataxia by preventing polyQ protein accumulation and improving mitochondrial function,» 2016. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/srep30436>.
- [119] T.-Y. Chen, Y.-C. Yang, Y.-N. Sha, J.-R. Chou e B.-S. Liu, «Far-Infrared Therapy Promotes Nerve Repair following End-to-End Neuroorrhaphy in Rat Models of Sciatic Nerve Injury,» 2015. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/207245>.
- [120] D. Gigo-Benato, S. Geuna e S. Rochkind, «Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: A review of the literature,» 2005. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1002/mus.20305>.
- [121] K. Li, Z. Zhang, N. F. Liu, S. Q. Feng, Y. Tong, J. F. Zhang, J. Constantinides, D. Lazzeri, L. Grassetti, F. Nicoli e Y. X. Zhang, «Efficacy and safety of far infrared radiation in lymphedema treatment: clinical evaluation and laboratory analysis,» 2017. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10103-016-2135-0>.
- [122] A. C. Thompson, S. A. Wade, W. G. Brown e P. R. Stoddart, « Modeling of light absorption in tissue during infrared neural stimulation,» 2012. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.7.075002>.
- [123] A. D. Izzo, J. T. Walsh, H. Ralph, J. Webb, M. Bendett, J. Wells e C.-P. Richter, «Laser Stimulation of Auditory Neurons: Effect of Shorter Pulse Duration and Penetration Depth,» 2008. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.117150>.
- [124] M. Shapiro, K. Homma, S. Villarreal, C.-P. Richter e F. Bezanilla, «Infrared light excites cells by changing their electrical capacitance,» 2012. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/ncomms1742>.
- [125] E. S. Albert, J. M. Bec, G. Desmadryl, K. Chekroud, C. Travo, S. Gaboyard, F. Bardin, I. Marc, M. Dumas, G. Lenaers, C. Hamel, A. Muller e C. Chabbert, «TRPV4 channels mediate the infrared laser-evoked response in sensory neurons,» 2012. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1152/jn.00424.2011>.
- [126] E. Suh, A. Izzo, M. Otting, J. Walsh e C.-P. Richter, « Optical stimulation in mice lacking the TRPV1 channel,» 2009. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/12.816891>.
- [127] T. Karu, «Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation,» 2008. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00394.x>.

- [128] J.-H. Park, S. Lee, D.-H. Cho, Y. M. Park, D.-H. Kang e I. Jo, «Far-infrared radiation acutely increases nitric oxide production by increasing Ca(2+) mobilization and Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine 1179.» 2013. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.003>.
- [129] W. Yu, J. Naim, M. McGowan, I. Kim e R. Lanzafame, «Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria.» 1997. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb03239.x>.
- [130] S. Passarella e T. Karu, «Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation.» 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021>.
- [131] A. C. Thompson, S. A. Wade, P. J. Cadusch, W. G. A. Brown e P. R. Stoddart, «Modeling of the temporal effects of heating during infrared neural stimulation.» 2013. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.3.035004>.
- [132] A. C. Thompson, S. A. Wade, N. C. Pawsey e P. R. Stoddart, «Infrared Neural Stimulation: Influence of Stimulation Site Spacing and Repetition Rates on Heating.» 2013. [Online]. Available: <https://ieeexplore.ieee.org/document/6557528>.
- [133] L. Wang, S. L. Jacques e L. Zheng, «MCML—Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues.» 1995. [Online]. Available: [https://doi.org/10.1016/0169-2607\(95\)01640-F](https://doi.org/10.1016/0169-2607(95)01640-F).
- [134] A. D. Izzo, J. T. Walsh, E. D. Jansen, M. Bendett, J. Webb, R. Heather e C.-P. Richter, «Optical Parameter Variability in Laser Nerve Stimulation: A Study of Pulse Duration, Repetition Rate, and Wavelength.» 2007. [Online]. Available: <https://ieeexplore.ieee.org/document/4203014>.
- [135] M. Schultz, P. Baumhoff, H. Maier, I. Teudt, A. Krüger, T. Lenarz e A. Kral, «Nanosecond laser pulse stimulation of the inner ear—a wavelength study.» 2012. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1364/BOE.3.003332>.
- [136] R. Orchardson, J. Peacock e J. Whitters, «Effect of pulsed Nd:YAG laser radiation on action potential conduction in isolated mammalian spinal nerves.» 1997. [Online]. Available: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9101\(1997\)21:2<142::AID-LSM5>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9101(1997)21:2<142::AID-LSM5>3.0.CO;2-Q).
- [137] G. Throckmorton, W. R. Adams, Z. Ricks, J. Cayce, E. D. Jansen e A. Mahadevan-Jansen, «Comparing the efficacy and safety of infrared neural stimulation at 1450 nm and 1875 nm.» 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/12.2508055>.
- [138] J. Wells, S. Thomsen, P. Whitaker, E. D. Jansen, C. C. Kao, P. E. Konrad e A. Mahadevan-Jansen, «Optically mediated nerve stimulation: Identification of injury thresholds.» 2007. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1002/lsm.20522>.
- [139] B. Entwisle, S. McMullan, P. Bokinić, S. Gross, R. Chung e M. Withford, «In vitro neuronal depolarization and increased synaptic activity induced by infrared neural stimulation.» 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1364/BOE.7.003211>.
- [140] Q. Liu, M. Frerck, H. Holman, E. Jorgensen e R. Rabbitt, «Exciting Cell Membranes with a Blustering Heat Shock.» 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.03.008>.
- [141] A. Agmon e B. Connors, «Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro.» 1991. [Online]. Available: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90333-J](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90333-J).
- [142] M. Wang, Q. Xia, F. Peng, B. Jiang, L. Chen, X. Wu, X. Zheng, X. Wang, T. Tian e W. Hou, «Prolonged post-stimulation response induced by 980-nm infrared neural stimulation in the rat primary motor cortex.» 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02826-0>.
- [143] J. M. F. R. M. Cayce, E. D. Jansen, A. Mahadevan-Jansen e A. W. Roe, «Pulsed infrared light alters neural activity in rat somatosensory cortex in vivo.» 2011. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.03.084>.
- [144] J. M. Cayce, R. M. Friedman, G. Chen, E. D. Jansen, A. Mahadevan-Jansen e A. W. Roe, «Infrared neural stimulation of primary visual cortex in non-human primates.» 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.040>.

- [145] J. M. Cayce, M. B. Bouchard, M. M. Chernov, B. R. Chen, L. E. Grosberg, E. D. Jansen, E. M. Hillman e A. Mahadevan-Jansen, «Calcium imaging of infrared-stimulated activity in rodent brain,» 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.01.004>.
- [146] N. Takata e H. Hirase, «Cortical Layer 1 and Layer 2/3 Astrocytes Exhibit Distinct Calcium Dynamics In Vivo,» 2008. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002525>.
- [147] N. K. Kuga, T. Sasaki, Y. Takahara, N. Matsuki e Y. Ikegaya, «Large-Scale Calcium Waves Traveling through Astrocytic Networks In Vivo,» 2010. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5319-10.2011>.
- [148] H. D. Lu, G. Chen, H. Tanigawa e A. W. Roe, «A Motion Direction Map in Macaque V2,» 2010. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.020>.
- [149] G. Chen, F. Wang, J. C. Gore e A. W. Roe, «Layer-specific BOLD activation in awake monkey V1 revealed by ultra-high spatial resolution functional magnetic resonance imaging,» 2013. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.08.060>.
- [150] A. W. Roe, M. Chernov, R. Friedman e G. Chen, «In Vivo Mapping of Cortical Columnar Networks in the Monkey with Focal Electrical and Optical Stimulation,» 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00135>.
- [151] E. J. Peterson e D. J. Tyler, «Motor neuron activation in peripheral nerves using infrared neural stimulation,» 2013. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1088/1741-2560/11/1/016001>.
- [152] J. Wells, A. Xing, M. Bendett, M. Keller e C. Lemaire, «Implantable infrared nerve stimulation devices for peripheral and cranial nerve interfaces». Brevetto 8,652,187, 2011.
- [153] E. J. Katz, I. K. Ilev, V. Krauthamer, D. H. Kim e D. Weinreich, «Excitation of primary afferent neurons by near-infrared light in vitro,» 2010. [Online]. Available: [https://journals.lww.com/neuroreport/fulltext/2010/06230/Excitation\\_of\\_primary\\_afferent\\_neurons\\_by.12.aspx?casa\\_token=z2MWcA6P9E0AAAAA:wWdKW1xM4f--hfTQPaeYyVp8eok6i33e\\_PF-2bzIc6-o\\_CTzQ0hbWBCfWpN8cUPz6jQQNYJJZ1\\_WUlpFRekzEXDeEFH\\_](https://journals.lww.com/neuroreport/fulltext/2010/06230/Excitation_of_primary_afferent_neurons_by.12.aspx?casa_token=z2MWcA6P9E0AAAAA:wWdKW1xM4f--hfTQPaeYyVp8eok6i33e_PF-2bzIc6-o_CTzQ0hbWBCfWpN8cUPz6jQQNYJJZ1_WUlpFRekzEXDeEFH_).
- [154] J. M. Cayce, J. D. Wells, J. D. Malphrus, C. Kao, S. Thomsen, N. B. Tulipan, P. E. Konrad, E. D. Jansen e A. Mahadevan-Jansen, «Infrared neural stimulation of human spinal nerve roots in vivo,» 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/1.NPh.2.1.015007>.
- [155] M. W. Jenkins, A. R. Duke, S. Gu, Y. Doughman, H. J. Chiel, H. Fujioka, M. Watanabe, E. D. Jansen e A. M. Rollins, «Optical pacing of the embryonic heart,» 2010. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/nphoton.2010.166>.
- [156] M. Jenkins, Y. T. Wang, Y. Q. Doughman, M. Watanabe, Y. Cheng e A. M. Rollins, «Optical pacing of the adult rabbit heart,» 2013. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1364/BOE.4.001626>.
- [157] M. Gimeno, C. Montgomery e L. Webb, «Acceleration of Rate of the Early Chick Embryo Heart by Visible Light,» 1967. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/2141014a0>.
- [158] G. M. Dittami, S. M. Rajguru, R. A. Lasher, R. W. Hitchcock e R. D. Rabbitt, «Intracellular calcium transients evoked by pulsed infrared radiation in neonatal cardiomyocytes,» 2011. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.198804>.
- [159] «Cochlear Implant Information Sheet,» 2018. [Online]. Available: <https://www.earfoundation.org.uk/hearing-technologies/cochlear-implants/cochlear-implant-information-sheet>.
- [160] H. K. Young, X. Tan, N. Xia e C.-P. Richter, «Target structures for cochlear infrared neural stimulation,» 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/1.NPh.2.2.025002>.
- [161] C.-P. Richter, R. Bayon, A. D. Izzo, M. Otting, E. Suh, S. Goyal, J. Hotaling e J. T. Walsh, «Optical stimulation of auditory neurons: effects of acute and chronic deafening,» 2008. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2008.01.011>.
- [162] G. Wenzel, B. S. K. Zhang, H. Lim, U. Reich, O. Massow, H. Lubatschowski, W. Ertmer, T. Lenarz e G. Reuter, «Green laser light activates the inner ear,» 2009. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/1.3174389>.



- [163] A. Thompson, «Investigation of Infrared Neural Stimulation in the Cochlea,» 2014. [Online]. Available: [https://www.researchgate.net/publication/273769270\\_Investigation\\_of\\_Infrared\\_Neural\\_Stimulation\\_in\\_the\\_Cochlea](https://www.researchgate.net/publication/273769270_Investigation_of_Infrared_Neural_Stimulation_in_the_Cochlea).
- [164] A. D. Izzo, E. Suh, J. Pathria, J. Walsh, D. S. Whitton e C.-P. Richter, « Selectivity of neural stimulation in the auditory system: a comparison of optic and electric stimuli,» 2007. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/1.2714296>.
- [165] C. Richter, S. Rajguru, A. Matic, E. Moreno, A. Fishman, A. M. Robinson, E. Suh e J. Walsh, «Spread of cochlear excitation during stimulation with pulsed infrared radiation: inferior colliculus measurements,» 2011. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1088/1741-2560/8/5/056006>.
- [166] L. Moreno, S. Rajguru, A. I. Matic, N. Yerram, A. Robinson, M. Hwang, S. Stock e C.-P. Richter, «Infrared neural stimulation: Beam path in the guinea pig cochlea,» 2011. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.06.006>.
- [167] V. Goyal, S. Rajguru, A. Izzo, S. Stock e C.-P. Richter, «Acute Damage Threshold for Infrared Neural Stimulation of the Cochlea: Functional and Histological Evaluation,» 2012. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1002/ar.22583>.
- [168] Q. Xia e T. Nyberg, «Inhibition of cortical neural networks using infrared laser,» 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1002/jbio.201800403>.
- [169] A. L. Hodgkin e B. Katz, «The effect of temperature on the electrical activity of the giant axon of the squid,» 1949. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1949.sp004388>.
- [170] A. Duke, M. Jenkins, H. Lu, J. McManus, H. Chiel e D. Jansen, «Transient and selective suppression of neural activity with infrared light,» 2013. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/srep02600>.
- [171] A. J. Walsh, G. P. Tolstykh, S. Martens, B. L. Ibey e H. T. Beier, « Action potential block in neurons by infrared light,» 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/1.NPh.3.4.040501>.
- [172] Y. Wang, A. Rollins e M. Jenkins, « Infrared inhibition of embryonic hearts,» 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.6.060505>.
- [173] S. N. Chettih e C. D. Harvey, «Single-neuron perturbations reveal feature-specific competition in V1,» 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0997-6>.
- [174] N. Naseer e K.-S. Hong, «fNIRS-based brain-computer interfaces: a review,» 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3389/fnhum.2015.00003>.
- [175] T. Ishizuka, K. Masaaki, R. Araki e H. Yawo, «Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels,» 2006. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010205002762>.
- [176] A.-M. Tichy, E. J. Gerrard, P. M. Sexton e H. Janovjak, «Light-activated chimeric GPCRs: limitations and opportunities,» 2019. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959440X19300557>.
- [177] J. L. Spudich e R. A. Bogomolni, «Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin,» 1984. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/312509a0>.