

Estrategias optogenéticas y fotofarmacológicas para restablecer la visión



Pablo Calvé¹ y Pau Gorostiza^{1,2,3}

Introducción

La mayoría de los casos de ceguera están causados por defectos en el ojo. Generalmente, estas alteraciones se producen por daños en las vías ópticas que conducen a la retina y son necesarias para el enfoque de las imágenes. A día de hoy, es posible tratar y curar estos impedimentos ópticos. Por ejemplo, la cirugía de cataratas para extraer una lente opaca y reemplazarla con una lente artificial se lleva a cabo rutinariamente en muchas partes del mundo y los trasplantes de córnea con córneas naturales o artificiales comúnmente tienen éxito.

Sin embargo, existen casos de ceguera que afectan a un porcentaje considerable de la población y no disponen de tratamiento. La mayor parte de las cegueras incurables son debidas a las enfermedades neurodegenerativas de la retina, que se caracterizan, la mayoría de las veces, por

pérdida de las células fotorreceptoras. En estas enfermedades, los fotorreceptores se dañan y mueren en un proceso de apoptosis que eventualmente provoca la ceguera. Sin embargo, las neuronas situadas en las capas internas de la retina permanecen intactas durante un periodo de tiempo prolongado, antes de que la retina sufra procesos de remodelización en las etapas finales de la enfermedad (1,2). Entre las enfermedades neurodegenerativas de la retina, la retinosis pigmentaria y la degeneración macular asociada a la edad son las más comunes.

De este modo, debido a que las neurodegeneraciones retinianas provocan afectaciones en la visión y pueden inducir ceguera completa en los casos más graves, es necesario buscar y estudiar nuevos tratamientos terapéuticos. Hoy en día, muchos laboratorios de investigación están desarrollando terapias para este tipo de enfermedades, dirigidas a restaurar la función de las células fotorreceptoras en el ojo ciego o bien a sustituir la pérdida de la función fotorreceptora, pretendiendo que las neuronas retinianas restantes sean directamente sensibles a la luz. Estas aproximaciones terapéuticas engloban desde prótesis electrónicas hasta células madre y terapia génica.

Terapias en desarrollo: Prótesis electrónicas retinianas y células madre

Las prótesis electrónicas de la retina se basan en convertir la imagen captada por una cámara en estímulos eléctricos de las neuronas preservadas de la retina, para que posteriormente puedan ser transportados al cerebro. La estimulación neuronal se realiza mediante un "chip" de microelectrodos implantado en la retina. Actualmente, dos dispositivos se encuentran en fase clínica (Argus II y Alpha IMS) que proporcionan restauración parcial de la visión en pacientes. Sin em-

1. Institut de bioenginyeria de Catalunya (IBEC), Barcelona Institute for Science and Technology (BIST)
 2. Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA)
 3. Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-bbn).

Artículo Científico

Optogenética y fotofarmacología

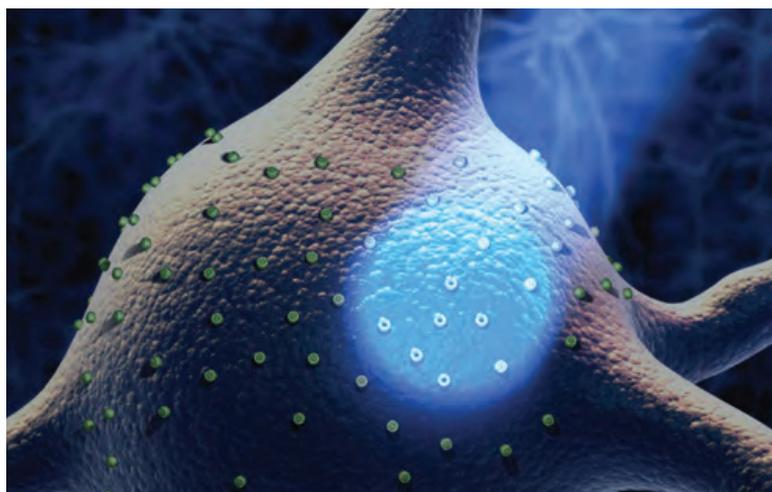


Figura 1. Modulación optogenética de una neurona empleando la luz como agente inductor. Reproducida de National Science Foundation. enlace: https://www.nsf.gov/discoveries/disc_summ.jsp?cntn_id=129298

bargo, todos estos sistemas innovadores presentan limitaciones. Las prótesis de retina son dispositivos de resolución relativamente baja y los pacientes deben usarlos como implantes permanentes. Además, la vida útil más larga registrada en dispositivos de retina electrónicos es inferior a un año (3).

Por otro lado, la terapia con células madre es otra aproximación cuyo objetivo es la conversión de células madre embrionarias en nuevos fotorreceptores. Se ha demostrado en estudios que las células madre son capaces de restaurar cierta sensibilidad a la luz en ratones ciegos (4), pero los métodos actuales de trasplante no son capaces de imitar la monocapa celular necesaria para la función óptima del epitelio pigmentario de la retina. Otro problema en esta aproximación terapéutica es el rechazo inmune (5).

Así pues, hasta la fecha, estas son las principales estrategias terapéuticas que dispone la medicina. Sin embargo, los resultados han sido limitados y requieren un mayor desarrollo. Investigaciones recientes han planteado nuevas aproximaciones para restablecer la visión, cuyo propósito es controlar la actividad de las neuronas retinianas restantes usando la luz como agente inductor. Dichas neuronas son susceptibles de activarse al estimularlas con longitudes de onda específicas mediante técnicas de optogenética y fotofarmacología

Terapia Optogenética

Los métodos optogenéticos se basan en la utilización de proteínas naturalmente sensibles a la luz, denominadas "opsinas", y procedentes de diversos microorganismos que se expresan en las neuronas de la retina por métodos de transfección o empleando vectores virales. En oftalmología, el virus adeno-asociado es sin duda el vector viral preferible para infectar las neuronas retinianas (6). De este modo, una vez infectada la neurona, la opsina se expresa en la membrana celular donde la luz incidente sobre la retina estimula la proteína, sea un canal iónico o bomba sensible a la luz, produciendo un cambio en el potencial de membrana de la neurona que permite recuperar la activación de la vía óptica.

Concretamente, las proteínas optogenéticas más utilizadas son miembros de la familia canalrodopsina, que son canales catiónicos capaces de causar la despolarización de la neurona cuando se activan. Por otro lado, también se emplean miembros de la familia halorrodopsina, que son bombas transportadoras de aniones que desencadenan la hiperpolarización neuronal (7). Así pues, estas proteínas canalizan el paso de diversos iones a través de la membrana celular, y cuando las neuronas manipuladas genéticamente se iluminan con luz de longitud de onda adecuada, la activación de las opsinas permite el control óptico de la actividad neuronal excitatoria e inhibitoria.

En base a lo anterior, se han sugerido diversas aproximaciones optogenéticas que abarcan desde la transfección en células ganglionares hasta células bipolares o incluso en fotorreceptores supervivientes (8). Sin embargo, pese a que la terapia optogenética había mostrado resultados prometedores en animales modelo, los primeros ensayos clínicos en pacientes se han iniciado recientemente y con un alcance limitado.

En primer lugar, se demostró en ratones que presentan degeneración retiniana (*rd1*) que sus neuronas ganglionares se pueden activar con luz al introducir canalrodopsina-2 (9,10). Además, la canalrodopsina-2 también se ha empleado en neuronas bipolares con la ayuda de un promotor específico que permite la expresión de dicho canal únicamente en las células bipolares ON. La expresión selectiva del canalrodopsina-2 en las células bipolares ON restauró la despolarización inducida por la luz de estas células bipolares sin afectar a las células bipolares OFF que normal-



mente se hiperpolarizan con la luz (11). Así pues, estos estudios mostraron, por primera vez, la restauración de las respuestas visuales mediante ensayos optocinéticos en animales.

Otras investigaciones también desvelaron que introducir halorrodopsina en los conos supervivientes de la retina puede ser otra alternativa optogenética para restituir la visión. En condiciones fisiológicas, este tipo de células fotorreceptoras se hiperpolariza con la luz y en el proceso de degeneración retiniana, persisten un tiempo más largo que los bastones. Con el uso de dos ratones modelo que difieren en el grado de progresión de degeneración retiniana, *rd1* (degeneración rápida) y *rho-/-cnga3-/-* (degeneración lenta), los resultados corroboraron que la expresión de halorrodopsina arqueobacterial en conos no sensibles a la luz podría sustituir la cascada de fototransducción nativa y restablecer la sensibilidad a la luz (12).

Finalmente, en la retina existe una pequeña población de neuronas ganglionares que se encargan de expresar melanopsina, una proteína

nativa que puede ser activada con niveles bajos de luz y que por lo tanto transforma a las células ganglionares que la expresan en neuronas intrínsecamente fotosensibles. Este tipo de neuronas proyecta sus axones a centros cerebrales involucrados en tareas no visuales como el ritmo circadiano (13). En ratones que padecen neurodegeneración retiniana avanzada, el tratamiento con un vector adenoviral para la sobreexpresión de melanopsina en neuronas ganglionares de la retina, permite restaurar tanto las respuestas conductuales como electrofisiológicas (14).

Gracias a estos resultados obtenidos en animales modelo, las compañías farmacéuticas están invirtiendo recursos considerables para seguir desarrollando terapias optogenéticas que puedan avanzar a fase clínica. Desde marzo de 2016, la compañía RetroSense Therapeutics LLC está ensayando la aplicación optogenética clínica en humanos para restablecer la visión (fase I/IIa). Su primer estudio propone usar un vector viral basado en virus adenoasociados de serotipo 2 que per-



La **Clínica Eurocanarias Oftalmológica** está ubicada en Las Palmas de Gran Canaria, prestando servicios clínicos y quirúrgicos de oftalmología, con la más reciente y avanzada tecnología láser para corregir patologías como la miopía, hipermetropía, astigmatismo, presbicia, queratocono, todo ello sumado a la **experiencia de más de 15 años de sus profesionales**, bajo la dirección médica de los **Doctores Humberto Carreras y Vicente Rodríguez**.

León y Castillo, 211.35004.
Las Palmas de Gran Canaria
Tfno: **928 49 10 90**





Artículo Científico

Optogenética y fotofarmacología

mita liberar un ADN complementario que codifica una versión truncada del canalrodopsina-2. El material genético se inyecta por vía intravitreal en las células ganglionares de los pacientes con retinosis pigmentaria avanzada para que la expresión de canalrodopsina-2 actúe como sensor de luz. De este modo, el tratamiento pretende compensar la pérdida de la función fotorreceptora confiriendo sensibilidad a las neuronas ganglionares, que podrán activarse al ser estimuladas con luz azul.

Terapia Fotofarmacológica

En los últimos diez años también se han desarrollado estrategias químicas para regular la actividad biológica de la retina empleando la luz como agente inductor. Este enfoque se basa en la modificación de fármacos, moléculas con actividad biológica y terapéutica, para dotarlos de fotosensibilidad, y ha dado lugar a un nuevo campo de investigación denominado optofarmacología o fotofarmacología (15).

La fotofarmacología se basa en el uso de fotoconmutadores moleculares (molecular photoswitches), moléculas sintéticas que al iluminarlas son capaces de cambiar sus propiedades de absorción, forma, polaridad etc. Asimismo, son capaces de unirse a sus proteínas diana y modificar su actividad fisiológica. Por este motivo se han comparado a "prótesis" que suplen o corrigen la actividad de las proteínas con una intencionalidad terapéutica. Estas prótesis moleculares se caracterizan por contener en su estructura una frac-

ción capaz de cambiar de forma (fotoisomerizar) reversiblemente entre dos isómeros, *trans* y *cis*. Este cambio permite variar la configuración de toda la molécula. Existen diversas fracciones químicas sensibles a la luz, y entre ellas el azobenceno es una de las más ampliamente utilizadas (16).

El azobenceno es una fracción orgánica formada por dos anillos fenilo unidos por un doble enlace entre átomos de nitrógeno (N=N). Esta estructura química fotoisomerizable existe en una configuración *trans* de geometría plana y estable en la oscuridad, que bajo iluminación con luz ultravioleta se isomeriza de forma reversible a configuración *cis*, que presenta un ángulo entre los anillos. En cambio, la isomerización inversa se produce por relajación térmica o por irradiación con longitudes de onda de luz visible (17). El isómero *cis* es menos estable que el isómero *trans* y por lo tanto *cis*-azobenceno también se convierte térmicamente de nuevo en *trans*-azobenceno en oscuridad. La fotoisomerización de *trans* a *cis* es extremadamente rápida (del orden de picosegundos), mientras que la reversión en oscuridad de *cis* a *trans* puede tardar horas para el azobenceno no sustituido. Sin embargo, la sustitución de grupos que atraen o repelen electrones puede alterar tanto la estabilidad térmica de la forma *cis* como el espectro de acción de la isomerización (18).

De este modo, la propiedad de fotoconmutación del azobenceno se ha utilizado ampliamente en el diseño de bibliotecas de compuestos, y ha permitido la síntesis de nuevas moléculas que modulan la actividad neuronal de forma dependiente de la luz. Por ejemplo, mediante la activación y desactivación de canales iónicos, receptores u otras enzimas implicadas en la vía óptica. Al aplicarlas en una retina que presenta neurodegeneración retiniana, las prótesis moleculares son capaces de inducir la activación dependiente de luz de las neuronas retinianas restantes, y permiten así reconstituir la visión por vías farmacológicas.

La primera aplicación de un derivado de azobenceno a la modulación óptica de un canal iónico se describió en 1971 para el receptor nicotínico de acetilcolina (19), pero las limitaciones existentes en la manipulación bioquímica y genética de proteínas restringieron sus aplicaciones hasta el año 2004, en el que se desarrolló el canal de potasio SPARK (synthetic photoisomerizable azobenzene-regulated potassium channel) (20). En esta aproximación,

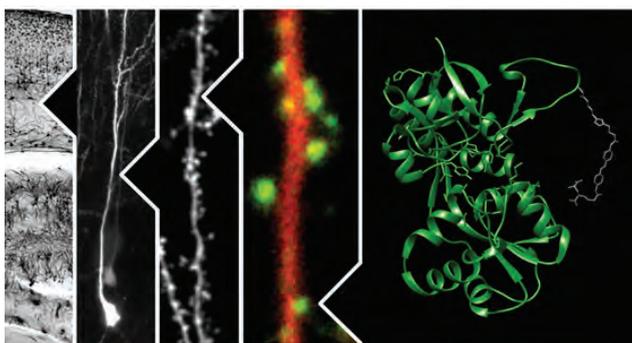


Figura 2. Estructura de las neuronas a diferentes escalas, desde circuitos neuronales (izquierda) hasta espinas dendríticas (centro), teñidas mediante diversas técnicas para microscopía óptica y de fluorescencia. Las prótesis moleculares son compuestos sintéticos (estructura gris en la imagen de la derecha) que se unen permanentemente a las proteínas (estructura verde) para suplir una determinada función, como por ejemplo la sensibilidad a la luz de una retina degenerada. El compuesto gris actúa como un fármaco regulado por luz que activa la proteína al iluminarlo. Agradecimientos a Miquel Bosch y Carlo Matera.



se emplearon dos versiones del canal de potasio Shaker y una pequeña molécula fotoconmutable. La primera versión del canal Shaker mantenía el canal en su estado nativo permitiendo el paso de potasio (H-SPARK), mientras que en la otra versión se produjo una mutación puntual que convertía el canal en un canal catiónico no selectivo permeable al sodio extracelular (D-SPARK) (21). Tras la transfección de H-SPARK y D-SPARK en células CHO (chinese hamster ovary) y administrando la molécula MAL-AZO-QA (maleimide azobenzene quaternary ammonium), se observó que aquellas células expresando D-SPARK se hiperpolarizaban al cambiar la irradiación luminosa de 390 nm a 505 nm y se despolarizaban con el cambio de iluminación opuesto. Las células expresando H-SPARK mostraron el efecto contrario a las células expresando D-SPARK, produciéndose la despolarización al cambiar de 390 nm a 505 nm. En ausencia de MAL-AZO-QA, las células transfectadas con SPARK no mostraron cambios en la función del canal. Los ensayos se repitieron en neuronas hipocámpales de ratón y se observó que las células transfectadas con D-SPARK al ser tratadas con MAL-AZO-QA disparaban potenciales de acción dependientes de luz *in vitro* (20). Así pues, estos resultados establecieron que el compuesto MAL-AZO-QA es un bloqueador de los canales de potasio capaz de inducir señales eléctricas dependientes de luz en neuronas de mamíferos.

Esta aplicación del sistema SPARK constituye un fotoconmutador de dos componentes ya que se requiere la expresión transgénica de los receptores modificados y la adición de una pequeña molécula fotoisomerizable. Investigaciones posteriores han continuado con el desarrollo de este tipo de aproximaciones análogas a SPARK. Por ejemplo, el receptor de glutamato activado mediante luz LiGluR (Light-gated Glutamate Receptor) se basa en una mutación del receptor de kainato GluK2 para introducir una cisteína en la posición 439 (L439C) a la cual se conjuga el compuesto fotoconmutable MAG (maleimide azobenzene glutamate) (22,23). Expresando este receptor en neuronas ganglionares de retina y aplicando el compuesto MAG, es posible restaurar las respuestas a la luz en el córtex visual, el reflejo pupilar y algunos comportamientos fotosensibles en ratones (24). Experimentos similares en neuronas bipolares ON de retina han permitido restaurar comportamientos dependientes de luz de mayor complejidad en ratones, y fotorrespuestas *in vitro* en retinas degeneradas de perro (25). Sin embargo, para aplicaciones terapéuti-

cas son preferibles los métodos basados únicamente en un fármaco y que no requieran modificaciones genéticas. En consecuencia, emergen los fotoconmutadores de un componente que se basan en el uso de una simple molécula fotoisomerizable.

El primer fotoconmutador de un componente desarrollado fue un bloqueador de canales de potasio sensible a la luz llamado AAQ (26). Es un derivado de MAL-AZO-QA sin grupo reactivo, el cual se descubrió que no era imprescindible para fotosensibilizar los canales (27). AAQ es capaz de fotoestimular los canales de potasio dependientes de voltaje endógeno y controlar la actividad neuronal. Los estudios iniciales se realizaron en rodajas de cerebro y se observó que al añadir AAQ e iluminar con luz verde (530 nm) las neuronas se activaban, mientras que al iluminar con luz de corta longitud de onda (390 nm) la actividad de dichas neuronas se silenciaba (28). En base a estos resultados, se sugirió que el compuesto AAQ podría emplearse para restaurar señales eléctricas dependientes de luz en las neuronas ganglionares de la retina de animales con degeneración retiniana externa. Por ello, se llevaron a cabo varios estudios utilizando retinas aisladas de ratones ciegos *rd1/rd1* y se observó que estos ratones recuperaban la actividad neuronal de la retina de manera dependiente de la luz cuando se les administraba AAQ (29).

Así pues, los resultados obtenidos en estas investigaciones demostraron que los bloqueadores de canales de potasio derivados de azobenceno son aproximaciones de un solo componente, capaces de restaurar la actividad de las células ganglionares de forma dependiente de la luz en animales ciegos con degeneración retiniana. Sin embargo, el compuesto AAQ presenta ciertas limitaciones que deben de tenerse en cuenta antes de que sea administrado en pacientes. En primer lugar, la longitud de onda con la que AAQ se activa (380 – 400 nm) es problemática ya que la lente del ojo humano filtra la gran mayoría de estas longitudes de onda y se requerirían intensidades luminosas muy elevadas para activar AAQ. Además, la relajación térmica de AAQ es muy lenta en la oscuridad por lo que sería necesario el uso de un dispositivo auxiliar de estimulación visual que permita la fotoisomerización rápida del compuesto en ambos sentidos. Finalmente, la presencia de restos de acrilamida en la estructura química de AAQ incrementa la posibilidad de que el compuesto sea neurotóxico (30).

Artículo Científico

Optogenética y fotofarmacología

Para superar estas limitaciones, recientemente se han diseñado y sintetizado nuevas series de compuestos en las que se han mejorado las propiedades del azobenceno. Por ejemplo, estos cambios alteran el espectro de absorción de los compuestos permitiendo una activación de los mismos en rangos de longitudes de onda mayores (luz azul, verde y roja) y una relajación más rápida en oscuridad. Estos fotoconmutadores de un componente de segunda generación incluyen los compuestos BENAQ, PHENAQ, AFM2-10, DENAQF4 y DENAQ (31).

DENAQ ha sido la molécula más prometedora hasta la fecha. *In vitro*, DENAQ produjo el disparo de señales eléctricas dependientes de luz desencadenando una buena activación de las células ganglionares en ratones ciegos *rd1/rd1*. Asimismo, las retinas activadas por DENAQ también mostraron mayor sensibilidad que cuando eran estimuladas por AAQ. Finalmente, la inyección vítrea de DENAQ en ratones *rd/rd* permitió que los ratones ciegos fueran capaces de asociar la estimulación de luz con un estímulo nocivo en un paradigma de aprendizaje (32).

Recientemente se han desarrollado los fotoconmutadores dirigidos TCP (targeted covalent photoswitches), una familia de fotoconmutadores de un solo componente para los receptores de glutamato (16), con una estructura derivada de MAG en la que se ha reemplazado el grupo reactivo maleimida por NHS-éster. Pese a la elevada reactividad de estos compuestos, mantienen una gran especificidad de conjugación al receptor diana GluK1 debido a un mecanismo de afinidad (23). Varios de estos compuestos son capaces de activar con luz receptores de glutamato endógenos sin necesidad de manipularlos genéticamente, incluyendo los receptores que se encuentran en la retina. De este modo, la simple aplicación del TCP en la retina degenerada permite recuperar las respuestas a la luz de forma muy robusta.

Objetivos, ventajas y desventajas de las aplicaciones terapéuticas reguladas por luz

Los resultados obtenidos hasta la fecha demuestran que tanto las aproximaciones optogenéticas como las fotofarmacológicas de uno o dos componentes logran conferir actividad dependiente de luz a las neuronas de retina de ratones con degeneración retiniana externa casi completa. Dicha actividad es suficiente para restaurar la sensibilidad a la luz conductual

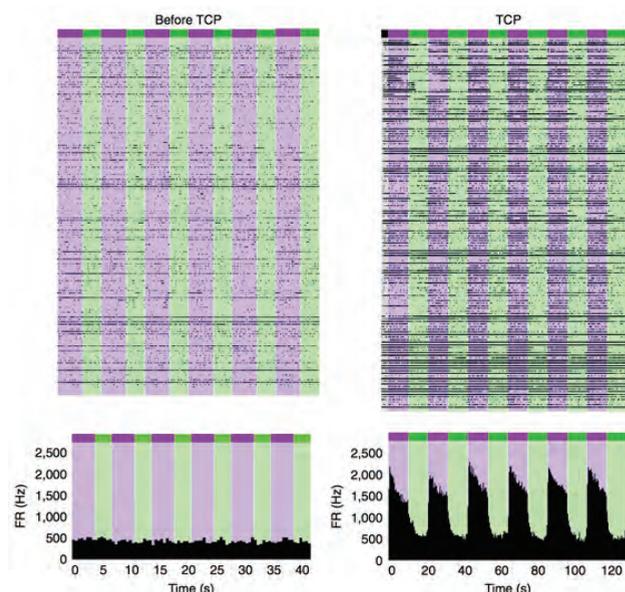


Figura 3. Restauración de fotorrespuestas en retina degenerada de ratón *rd10* mediante TCP. Registros de matriz de multielectrodos (disparos de potenciales de acción) en retina plana antes (izquierda) y después de la aplicación de TCP (derecha). Las franjas violeta y verde indican la iluminación a 380nm y 500nm. Reproducida de Izquierdo-Serra et al. *Nat Comm*, 2016.

y restablecer la función fisiológica dependiente de luz. Actualmente se siguen desarrollando diversos proyectos para restaurar la visión en distintos grados, empleando por ejemplo el reflejo optocinético o el aprendizaje asociativo basado en estímulos visuales naturales.

Funcionalmente, las técnicas basadas tanto en optogenética como en fotofarmacología tienen el mismo objetivo final que las prótesis eléctricas de la retina. El éxito clínico de estos implantes, conseguido tras muchos años de investigación, presagia el potencial terapéutico de la optogenética y la fotofarmacología (33,34,35,36). No obstante, cada aplicación terapéutica tiene sus ventajas y desventajas.

Tanto los métodos optogenéticos como los fotofarmacológicos de dos componentes requieren manipulación genética, aunque emplean distintas técnicas para conferir fotosensibilidad a las neuronas ganglionares, bipolares o fotorreceptores no degenerados (8,36). En comparación con los fotoconmutadores de un componente, las aproximaciones genéticas permiten una selección de la diana más específica en los diferentes tipos de neuronas retinianas. Sin embargo, estas alteraciones son potencialmente irreversibles y tienen el inconveniente de producir una expresión poco uniforme de opsinas o proteínas truncadas, lo que probablemente daría lugar a diferentes niveles de actividad entre las células transfectadas. Asimismo, la sobreexpresión de canales o bombas iónicas en la membrana neuronal podría alterar la maquinaria celular intrínseca y consecuentemente perjudicar las condiciones fisiológicas habituales. Además,

la sobreexpresión de opsinas de origen microbiano como el canalrodopsina-2 puede conducir a respuestas inmunes que deben caracterizarse en todas las etapas del tratamiento (37).

Los fotoconmutadores de un componente tienen la ventaja potencial de conferir sensibilidad a la luz a cada neurona ganglionar de la retina, sin tener en cuenta la interferencia inducida por campos eléctricos externos o los niveles de expresión, tal y como sucede con las prótesis electrónicas y los métodos genéticos, respectivamente. Además, la administración de compuestos fotoisomerizables se realizaría por simple inyección intravítrea, en lugar de recurrir a la cirugía epirretiniana o subretinal necesaria para la implantación de un dispositivo eléctrico. Por lo tanto, los fotoconmutadores de un solo componente presentan una mayor simplicidad y desde un punto de vista práctico, sería de esperar que la aprobación reglamentaria de estas moléculas fuese más expedita que la de los fotoconmutadores de dos componentes. No obstante, el efecto terapéutico podría verse influenciado por la distribución del compuesto en diferentes tipos de neuronas retinianas. Otro aspecto que puede contribuir a la aplicabilidad de estas moléculas es mejorar su solubilidad y fotosensibilidad, facilitando así los futuros ensayos en pacientes con trastornos neurodegenerativos de la retina.

Conclusión

En definitiva, en un periodo de tiempo relativamente breve, los campos de la optogenética y la fotofarmacología han progresado vertiginosamente demostrando la restauración parcial de la visión en animales modelo. Aunque estas aproximaciones aún necesitan madurar y superar diversas limitaciones, se han establecido sus fundamentos y se han identificado las principales barreras a superar. Esperamos que en los próximos años se resuelvan los obstáculos relacionados con la seguridad, administración y optimización de la señal en las vías ópticas del cerebro, y la optogenética y la fotofarmacología puedan aplicarse eficazmente como terapia contra la ceguera.

Agradecimientos: El proyecto de fotosensibilización de la retina degenerada que están desarrollando los autores se realiza en colaboración con los laboratorios de A. Llebaria, E. Fernández, P. De la Villa, M. A. Pericàs y J. Lerma.

Bibliografía

1. Marc RE, Jones BW, Anderson JR, Kinard K, Marshak DW, Wilson JH, et al. Neural reprogramming in retinal degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(7):3364–71.
2. Jones BW, Pfeiffer RL, Ferrell WD, Watt CB, Marmor M, Marc RE. Retinal remodeling in human retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res.* 2016;150:149–65.
3. Yue L, Weiland JD, Roska B, Humayun MS. Retinal stimulation strategies to restore vision: Fundamentals and systems. *Prog Retin Eye Res.* 2016;53:21–47.
4. Lamba D. Transplantation of human embryonic stem cells derived photoreceptors restores some visual function in Crx deficient mice. 2010;4(1):73–9.
5. Ramsden CM, Powner MB, Carr A-JF, Smart MJK, da Cruz L, Coffey PJ. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development.* 2013;140:2576–85.
6. Maclaren RE. *Gene Therapy for Retinal Disease* : 2015;
7. Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K. Optogenetics in Neural Systems. *Neuron.* 2011;71(1):9–34.
8. Henriksen BS, Marc RE, Bernstein PS. Optogenetics for Retinal Disorders. *J Ophthalmic Vis Res.* 2014;9(3):374–82.
9. Bi A. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. 2006;50(1):23–33.
10. Tomita H, Sugano E, Fukazawa Y, Isago H, Sugiyama Y, Hiroi T, et al. Visual Properties of Transgenic Rats Harboring the Channelrhodopsin-2 Gene Regulated by the Thy-1 .2 Promoter. 2009;4(11).
11. Kim DS, Lagali PS, Balya D, Awatramani GB, Mu TA. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. 2008;11(6):667–75.
12. Busskamp V, Busskamp V, Duebel J, Balya D, Fradot M, Viney TJ, et al. Genetic Reactivation of Cone Responses in Retinitis Pigmentosa. 2013;413(2010).
13. Brown RL, Robinson PR. NIH Public Access. 2008;21(2):189–204.
14. Lin B, Koizumi A, Tanaka N, Panda S, Masland RH. Restoration of visual function in

Artículo Científico

Optogenética y fotofarmacología

- retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. 2008;105(41).
15. Broichhagen J, Frank JA, Trauner D. A Roadmap to Success in Photopharmacology. 2015;
 16. Izquierdo-Serra M, Bautista-Barrufet A, Trapero A, Garrido-Charles A, Díaz-Tahoces A, Camarero N, et al. Optical control of endogenous receptors and cellular excitability using targeted covalent photoswitches. *Nat Commun.* 2016;7:12221.
 17. Biswas M, Burghardt I. Azobenzene photoisomerization-induced destabilization of B-DNA. *Biophys J.* 2014;107(4):932–40.
 18. Banghart MR, Volgraf M, Trauner D. Current Topics Engineering Light-Gated Ion Channels †. 2006;45(51).
 19. Bartels EVA, Wassermann NH, Erlanger BF. Photochromic Activators of the Acetylcholine Receptor. 1971;68(8):1820–3.
 20. Banghart M, Borges K, Isacoff E, Trauner D, Kramer RH. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. 2004;7(12):1381–6.
 21. Chambers JJ, Banghart MR, Trauner D, Kramer RH, James J, Banghart MR, et al. Light-Induced Depolarization of Neurons Using a Modified Shaker K⁺ Channel and a Molecular Photoswitch. 2006;2792–6.
 22. Volgraf M, Gorostiza P, Numano R, Kramer RH, Isacoff EY, Trauner D. Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. 2006;2(1):47–52.
 23. Gorostiza P, Volgraf M, Numano R, Szobota S, Trauner D, Isacoff EY. Mechanisms of photoswitch conjugation and light activation of an ionotropic glutamate receptor. 2007;104(26):1–6.
 24. Caporale N, Kolstad KD, Lee T, Tochitsky I, Dalkara D, Trauner D, et al. LiGluR Restores Visual Responses in Rodent Models of Inherited Blindness. *Mol Ther.* 2011;19(7):1212–9.
 25. Gaub BM, Berry MH, Holt AE, Reiner A, Kienzler MA, Dolgova N, et al. Restoration of visual function by expression of a light-gated mammalian ion channel in retinal ganglion cells or ON-bipolar cells. 2014;
 26. Yao JZ. NIH Public Access. 2014; 48(48):9097–101.
 27. Banghart MR, Mouroto A, Fortin DL, Yao JZ, Kramer RH, Trauner D. Photochromic Blockers of Voltage-Gated Potassium Channels. 2009;9097–101.
 28. Fortin DL, Banghart MR, Dunn TW, Borges K, Daniel A, Gaudry Q, et al. excitability. 2009;5(4):331–8.
 29. Polosukhina A, Litt J, Tochitsky I, Nemargut J, Sychev Y, De Kouchkovsky I, et al. Photochemical Restoration of Visual Responses in Blind Mice. *Neuron.* 2012;75(2):271–82.
 30. Spencer PS, Schaumburg HH. A Review of Acrylamide Neurotoxicity Part I. Properties, Uses and Human Exposure. 1974;(May).
 31. Mouroto A, Kienzler MA, Banghart MR, Fehrentz T, Huber FME, Stein M, et al. Tuning Photochromic Ion Channel Blockers. 2011;536–43.
 32. Tochitsky I, Polosukhina A, Degtyar VE, Gallerani N, Smith CM, Friedman A, et al. Article Restoring Visual Function to Blind Mice with a Photoswitch that Exploits Electrophysiological Remodeling of Retinal Ganglion Cells. *Neuron.* 2014;81(4):800–13.
 33. Zrenner E. Fighting Blindness with Microelectronics.
 34. Mandel Y, Goetz G, Lavinsky D, Huie P, Mathieson K, Kamins T, et al. HHS Public Access. 2014;1–21.
 35. Barry MP, Dagnelie G, li A, Group S. Use of the Argus II Retinal Prosthesis to Improve Visual Guidance of Fine Hand Movements. 2012;53(9):5095–101.
 36. Busskamp V, Picaud S, Sahel JA, Roska B. Optogenetic therapy for retinitis pigmentosa. 2011;19(2):169–75.
 37. Guru A, Post RJ, Ho YY, Warden MR. Making sense of optogenetics. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2015;18(11):1–8.