

Optogenética e estimulação óptica neural: estado atual e perspectivas

Eddy Krueger*, Tiago Manczak, Edwing Martin Holguin Wilson, Wilson José da Silva, Percy Nohama

Resumo Ao longo dos últimos 50 anos, o uso da luz, em especial o laser, vem promovendo grandes avanços em diversas áreas da ciência e da tecnologia. Na última década o uso de estímulos ópticos no campo da biomédica tem despertado grande interesse no meio acadêmico e na indústria. Dois ramos que se destacam pelo seu crescimento são: a estimulação óptica direta e a optogenética. A primeira utiliza diferentes parâmetros da luz para adequar o efeito desejado na interação com o tecido biológico. A segunda faz uso de engenharia genética para tornar os tecidos biológicos sensíveis à luz. A estimulação neural por infravermelho (estimulação óptica direta) não necessita de contato direto com o tecido e apresenta maior seletividade especial se comparada à estimulação elétrica, mas tem a capacidade restrita de ativar (despolarizar) os neurônios. A optogenética, entretanto, pode ser utilizada para manipular o tecido neural tornando-o sensível à luz; sendo, então, possível despolarizar ou hiperpolarizar os neurônios codificados, assim como monitorar as ativações por meio de codificação de proteínas fluorescentes sensíveis à tensão elétrica. Tanto a técnica de estimulação óptica por infravermelho ou a técnica de optogenética, vêm sendo aplicadas apenas à modelos animais. Os resultados mostram, entretanto, que há grande viabilidade de aplicação da estimulação óptica em seres humanos. Futuramente, tais técnicas poderão substituir o atual padrão ouro para a ativação neural, a estimulação elétrica, em aplicações envolvendo doenças neurológicas específicas.

Palavras-chave Optogenética, Estimulação óptica neural, Fotoreceptores.

Optogenetics and neural optical stimulation: current state and perspectives

Abstract *Within the last 50 years the light and specially the laser has fomented great advances in several areas of science and technology. During the past decade the use of optical stimuli in the biomedical research field have been of great interest for both academy and industry. Two research branches that can be highlighted due to its growth are: direct optical stimulation and optogenetic. The first one uses different parameters of light to optimize the desired effect on the tissue interaction. The other branch works with genetic engineering technics to make cells sensitive to light. The neural stimulation by infrared (direct optical stimulation) does not require direct contact with the tissue and has higher spatial selectivity when compared to electrical stimulation, but it has restricted ability to activate (depolarize) neurons. The optogenetic, however, can be used to manipulate the neural tissue depolarizing or hyperpolarizing encoded neurons, as well as monitor activations by encoding fluorescent proteins sensitive to voltage. The stimulation by infrared optical or optogenetic, has been applied only to animal models although there is a great possibility for human applications. In the future, it may even replace existing techniques such as electrical brain stimulation to treat specific neurological diseases.*

Keywords: *Optogenetic, Optical stimulation of neural tissue, Photoreceptors.*

*e-mail: kruegereddy@gmail.com

Recebido: 18/11/2011 / Aceito: 02/05/2012

Extended Abstract

Introduction

During the past decade the use of optical stimuli in the biomedical research field have grown substantially, due to advantages such as accuracy, noninvasiveness and lower prices. Two research branches that can be highlighted in this area are: direct neuron optical stimulation and optogenetic.

Materials and Methods

The search was conducted on the basis Wiley Online Library, ScienceDirect, SciELO, Biomed Central, Google Scholar, IEEE Xplore, IOP and books. The preferred language selected was English with the keywords: optogenetic, optical stimulation, infrared neural stimulation and photoreceptors. We performed the search for papers from 1979 to 2011. We discarded the papers that were not in accordance with the scope of this paper. After performing the search in the databases we read the abstracts and eliminated duplication, were extracted information about the following topics: optogenetics and optical stimulation of neural tissue.

Results

Four books and fifty one articles have been used in this paper, collected from various search bases (Table 1) and over the years of 1979 to 2011 (Table 2).

Discussion

Neural optical stimulation uses different parameters of the light to optimize the desired effect on the tissue interaction, in this case, the production of action potential in neurons. Usually, the wavelength used in such applications is into the infrared spectra, greater than 770 nm (Cayce et al., 2010a; Duke et al., 2009; Harris et al., 2009; Izzo et al., 2006a, 2006b; Izzo et al., 2007; Wells et al., 2007b; Wininger et al., 2009). In neural optical stimulation (NOS) the light beam is applied directly over the neuron membrane, triggering the action potential. The possibility of controlling the action potential generation in a certain amount of neurons extends this application to the use in special prosthesis such as cochlear implants (Izzo et al., 2006a; Richter et al., 2008), visual implants (Kim et al., 2004), vestibular implants (Harris et al., 2009) and deep brain stimulation implants (Cayce et al., 2010b).

As in the electrical stimulation, in NOS, the higher the frequency, the lower the intensity of the light needed to depolarise neuronal cells (Cayce et al., 2010b). Wells et al. (2007b) studied the application of NOS using YAG laser ($Y_3Al_5O_{12}$) in peripheral

nerves assuring the results by histological tests. According to their results, the maximum pulse frequency of the YAG laser, for safe stimulation, is limited to 5 Hz. Under this limit no tissue injury were detected. Another advantage of NOS is the selectivity of stimulation. This property allows to stimulate one specific nerve without interfering with adjacent nerves, that cannot be guaranteed by the usual electrical stimulation. This is important for applications such as visual implants, as those proposed by Kim et al. (2004) or the hearing implants proposed by Richter et al. (2008).

In optogenetics, on the other hand, the neurons are genetic engineered to make them sensitive to certain wavelengths (Liu and Tonegawa, 2010; Zhang et al., 2010). This is possible through the use of rhodopsins, the same proteins present in the photoreceptor cells of the retina. They can be extracted from microalgae or eubacterias and inserted in a virus, which in turn, modify the cells DNA. Some functions are then modified making neurons whether sensitive to light ($\lambda = 960 \sim 470$ nm) (Andrasfalvy et al., 2010; Carter et al., 2010; Goold and Nicoll, 2010; Gunaydin et al., 2010; Kravitz et al., 2010) or with the ability to emit light ($\lambda = 360$ nm) (Kötter et al., 2005).

The term optogenetic was first used by Deisseroth et al. (2006) in order to explain the use of light sensitive codified proteins to monitor and control specific activities of neuronal circuits. The photoreceptors of rhodopsin were first isolated by Möglich and Moffat from the marine organism flagellate algae. Opsin genes can be inserted into neural tissue by viral vectors (Zhang et al., 2010). Those genes modify ionic (potassium and sodium) channels turning them light sensitive, that means, the potential of the cell membrane changes when it is exposed to light. Moreover, recently literature has come up with new possibilities, as researches Mutoh et al. (2010) developed animal models with biosensors using voltage sensitive fluorescent proteins (VSFP) extracted from marine animals like *Ciona Intestinalis* and *Aequorea Victoria*. These proteins can modify a neuron in such way that, as a synapse is generated, a light stimulus is also produced by the cell. Combining the light sensitive ionic channel and the VSFP in neuronal cells makes possible to produce a fully light controlled neuronal circuit.

Conclusions

Although optical stimulation by infra-red and optogenetics are relatively new fields of research, it has already been observed a wide expansion of researches applied, mostly, to animal models. However, the results presented in the work related to these themes show a broad perspective for human application, and may even come to replace the so-called ground truth methods (electrical stimulation) and propel new researches in the activation of neural circuits.

Introdução

A utilização de tecnologia óptica é muito ampla e bem difundida na atualidade. O laser, por exemplo, causa diferentes alterações fotoquímicas, fototérmicas e fotomecânicas (Wells *et al.*, 2007a) em tecidos biológicos conforme a variação de suas características (intensidade, tempo de aplicação, comprimento de onda). Ao longo dos anos, o laser popularizou-se tendo hoje inúmeras aplicações médicas e cirúrgicas em oftalmologia, odontologia, ginecologia, urologia, neurocirurgia, angioplastia e cardiologia, dermatologia, ortopedia, gastroenterologia, otorrinolaringologia e pneumologia (Niemz, 2004); além do uso em fisioterapia, como o laser HeNe (630 nm) na dermatologia (Ling e Wu, 2005), do laser GaAs (904 nm) na ortopedia (Naeser *et al.*, 2002) e o laser AlGaInP (685 nm) em pontos de acupuntura (Valchinov e Pallikarakis, 2005).

Pesquisas recentes mostram duas novas aplicações de interação entre luz e tecidos biológicos, mais especificamente tecido neuronal. A primeira é a estimulação óptica, na qual um feixe de luz, geralmente na faixa do infravermelho (comprimento de onda > 770 nm) (Cayce *et al.*, 2010a; Duke *et al.*, 2009; Harris *et al.*, 2009; Izzo *et al.*, 2006a, 2006b; Izzo *et al.*, 2007; Wells *et al.*, 2007b; Wininger *et al.*, 2009) é aplicado diretamente ao neurônio deflagrando, assim, um potencial de ação (PA). O uso de estimulação óptica estende-se à fabricação de próteses especiais como implante coclear (Izzo *et al.*, 2006a; Richter *et al.*, 2008), visual (Kim *et al.*, 2004), vestibular (Harris *et al.*, 2009), e estimulação encefálica profunda (Cayce *et al.*, 2010b).

Outra técnica para promover a interação entre neurônios e luz é a optogenética, que está embasada na introdução de um vírus no tecido nervoso com o DNA modificado (Liu e Tonegawa, 2010; Zhang *et al.*, 2010). O vírus contém rodopsinas, proteínas presentes em fotorreceptores da retina que podem também ser extraídas de microalgas e eubactérias. Com essas proteínas, é possível manipular

funções de células como os neurônios (Hegemann e Möglich, 2010), tornando-os sensíveis à luz para uma faixa compreendida entre 470 a 960 nm (Andrasfalvy *et al.*, 2010; Carter *et al.*, 2010; Goold e Nicoll, 2010; Gunaydin *et al.*, 2010; Kravitz *et al.*, 2010) ou fazendo com que emitam luz em um comprimento de onda (λ) igual a 360 nm (Kötter *et al.*, 2005).

Materiais e Métodos

A busca de informações foi realizada nas bases Wiley Online Library, ScienceDirect, Scielo, Biomed Central, Google Scholar, IEEE Xplorer, IOP e livros. O idioma de preferência selecionado foi o inglês com as palavras-chave: *optogenetic*, *optical stimulation*, *infrared neural stimulation* e *photoreceptors*. Seguindo o método retrospectivo, efetuou-se a procura de trabalhos com uma janela de tempo de 1979 a 2011. Foram descartados os trabalhos que não estavam de acordo com o escopo do artigo. Após a realização da busca nas bases de dados, foram lidos os *abstracts* e eliminadas as duplicações. Dos trabalhos selecionados, foram extraídas informações a respeito dos seguintes tópicos: optogenética e estimulação óptica neural.

Resultados

Todos os trabalhos selecionados versavam sobre: optogenética, estimulação neural óptica e assuntos afins, como fotorreceptor, potencial de ação, neuroanatomia, dentre outros. A Tabela 1 mostra os trabalhos utilizados e suas respectivas bases de pesquisa. A Tabela 2 mostra os artigos e livros divididos por ano.

Discussão

Optogenética

O termo optogenética (do inglês *optogenetic*) foi cunhado por Deisseroth *et al.* (2006) para se referir às proteínas codificadas que respondem à luz para monitorar e controlar a atividade específica de

Tabela 1. Quantidades de artigos e livros avaliados e as bases de pesquisa utilizadas.

Table 1. Amount of articles and books used and the research data bases.

Base de pesquisa	Optogenética	Estimulação óptica	Assuntos afins
Google acadêmico	18	11	9
Biomed Central	1		
ScienceDirect	6	2	
Wiley Online Library	1	1	
IOP	1		
IEEE Xplorer	1	5	
SciELO			1
Livro		1	3

Tabela 2. Número de artigos e livros utilizados entre os anos de 1979 a 2011.

Table 2. Amount of papers and books used in the period of 1979 to 2011.

Ano	Optogenética	Estimulação óptica	Assuntos afins
1979			1
1993			1
1996			1
2002			2
2004		2	
2005		4	2
2006	1	2	1
2007		5	2
2008		1	1
2009	1	3	
2010	21	3	1
2011	5		1

circuitos neurais. Os fotorreceptores, amplamente utilizados na optogenética e também presentes na retina, são receptores neurais especiais que respondem à absorção de luz com uma mudança na atividade biológica como o potencial da membrana do neurônio (Möglich e Moffat, 2010). Esses fotorreceptores são formados por rodopsinas, proteínas contendo sempre dois terminais polares, basicamente um grupamento amina (NH_2) e outro carboxila (COOH) (Hegemann e Möglich, 2010). Quando fótons incidem nos fotorreceptores localizados na retina, reações bioquímicas alteram o potencial elétrico da membrana celular. O bastonete, quando incidido por um fóton, transforma o *11-cis retinal* (proveniente da rodopsina) (Kraft *et al.*, 1993) em *all-trans retinal*, com uma reação em cascata proporcionada pela proteína G (guanosina trifosfato) (Hubbell e Bownds, 1979) no meio intracelular. Assim, ocorre a inibição dos canais de cátions da membrana, gerando hiperpolarização devido à diminuição da condutância dos íons de Na^+ e Ca^{++} (Baylor, 1996).

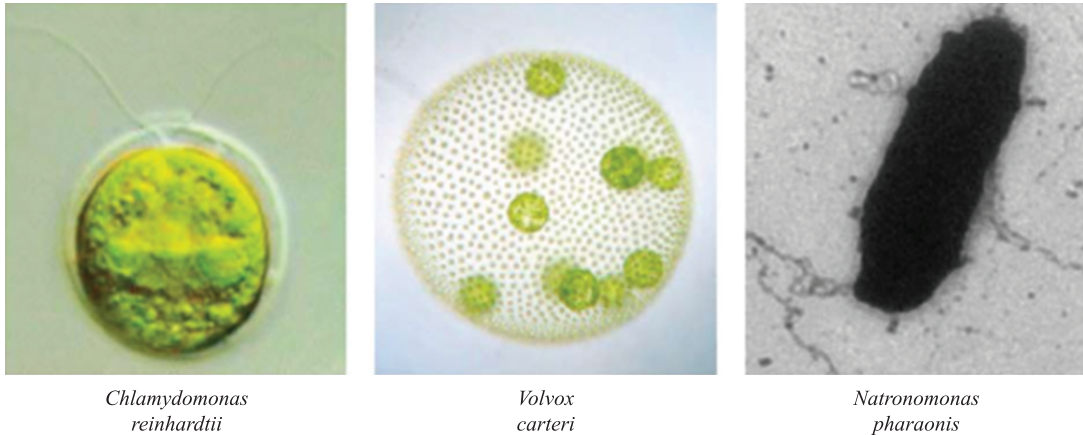
Os fotorreceptores de canais de rodopsina foram isolados primeiramente do organismo marinho *flagellate algae* (Möglich e Moffat, 2010). Genes de opsina podem ser introduzidos no tecido neural utilizando-se vetores virais (Zhang *et al.*, 2010), os quais tornam canais de cátions, sódio e potássio (Mutoh *et al.*, 2010), de neurônios sensíveis à luz podendo responder com alteração no potencial da membrana quando incididos por luz (Mutoh *et al.*, 2010). A modificação gênica (Liu e Tonegawa, 2010) é realizada pela enzima Cre-recombinase (Gradinaru *et al.*, 2010), sendo a despolarização da membrana celular decorrente da codificação dos genes microbianos de opsina (Hegemann e Möglich, 2010). A Figura 1 mostra os microorganismos utilizados para codificar os canais

iônicos que respondem ao estímulo luminoso. O canal iônico codificado *channelrhodopsin-2* (ChR2), como mostra a Figura 2, provém do microorganismo *Chlamydomonas Reinhardtii*. O *channelrhodopsin-1* (VChR1) (Hegemann e Möglich, 2010) provém da *Volvox Carteri* e o canal *halorhodopsin* (NpHR) (Gradinaru *et al.*, 2010) da estrutura microbiana *Natronomonas Pharaonis*.

Os canais codificados ChR2 e o canal VChR1 respondem ao estímulo luminoso, como mostra a Figura 3, com a abertura dos canais de cátions da membrana despolarizando-a (Hegemann e Möglich, 2010). O canal NpHR ativa a entrada de ânions na membrana gerando à hiperpolarização do meio intra celular (Gradinaru *et al.*, 2010). O ChR2 tem sua ativação maximizada pela luz azul cujo comprimento de onda (λ) é 470 nm (Zhang *et al.*, 2010) e o canal VChR1 pela luz amarela (λ próximo de 590 nm) (Mancuso *et al.*, 2011). As faixas de comprimento de onda que respondem aos canais iônicos codificados (Zhang *et al.*, 2010) ChR2, VchR1 e NpHR são mostrados na Figura 4.

Andrasfalvy *et al.* (2010) identificaram os parâmetros ótimos para a excitação focal de ChR2 a dois fótons. Desses parâmetros, destacam-se o comprimento de onda para uma faixa de $800 \text{ nm} \leq \lambda \leq 960 \text{ nm}$, para uma potência (P) compreendida entre $0 \leq P \leq 400 \text{ mW}$. O pico de absorção para apenas dois fótons foi encontrado para λ igual a 880 nm. Em relação à potência, foi verificada uma relação não linear com o tempo de despolarização da célula, apresentando acima de 300 mW pouca variação (< 2 ms) com o aumento de potência. Aumentando a duração do pulso sobre neurônios inibitórios (canais NpHR), não há um valor diferenciado do potencial de membrana hiperpolarizada (Andrasfalvy *et al.*, 2010), pois a célula obedece à lei do efeito tudo ou nada (Bean, 2007).

Os canais de íons ChR2 tem uma constante de desativação de ~12 ms, e os canais de VChR1 tem uma constante de desativação de ~120 ms (Zhang *et al.*, 2010). Receptores conseguem transmutar sinais de *flashes* luminosos na faixa de milissegundos (~12 ms a ~120 ms), para uma frequência de ativação (Fatv) compreendida entre 30 e 50 Hz (Zhang *et al.*, 2010). Algumas células com canais ChR2 podem apresentar certas anomalias na resposta à luz como a não produção de potenciais evocados à frequências de estímulo acima de 40 Hz, além de apresentarem a frequências mais baixas uma espícula extra para cada pulso individual (Gunaydin *et al.*, 2010). Entretanto, novos receptores vêm sendo desenvolvidos e aperfeiçoados para a optogenética (Liu e Tonegawa, 2010). Gunaydin *et al.*



*Chlamydomonas
reinhardtii*

*Volvox
carteri*

*Natronomonas
pharaonis*

Figura 1. Imagem microscópica dos microorganismos utilizados para produzir canais iônicos codificados pela optogenética para responder a luz [adaptado de Zhang *et al.* (2010)].

Figure 1. Microscopic image of the microorganisms used to produce ion channels encoded by optogenetics to respond to light [adapted from Zhang *et al.* (2010)].

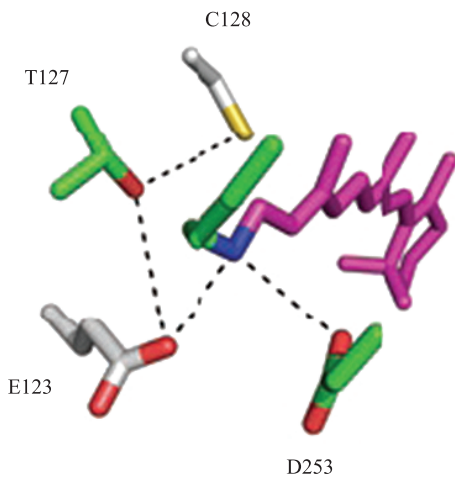


Figura 2. Modelo da estrutura do canal de rodopsina 2 (ChR2) [adaptado de Gunaydin *et al.* (2010)].

Figure 2. Model of the channelrhodopsin-2 structure (ChR2) [adapted from Gunaydin *et al.* (2010)].

(2010) codificaram o gene de opsina ChETA para trabalhar com frequências que atinjam até 200 Hz, faixa de trabalho cinco vezes maior que os canais ChR2.

A optogenética pode ser utilizada na manipulação de mensageiros intracelulares secundários como a adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e da Guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (Ryu *et al.*, 2010). Teh *et al.* (2010) desenvolveram o fotossensibilizador *KillerRed* que, exposta à luz branca ou a verde, estimula fortemente a interação bioquímica do oxigênio. Em baixos níveis, a ativação do oxigênio pode promover a mitose, mas em altos níveis provoca apoptose (morte celular). A utilização do *KillerRed* estende-se à

simulação de patologias cardíacas, com a perspectiva de aplicação em tecido neoplásico (canceroso).

A optogenética é viável ainda para a estimulação da plasticidade neural, que envolve os sistemas de aprendizado e memória nas regiões cornos de Amon (CA) 1 e 3 do hipocampo (Gradinaru *et al.*, 2010), com enorme viabilidade para futuras aplicações médicas (Fiala *et al.*, 2010). A aplicabilidade da optogenética pode se estender à monitorização da atividade celular (movimentação de Ca^{++}) dos astrócitos (Figueiredo *et al.*, 2011), que são células do tecido conjuntivo (neuroglias) do sistema nervoso central e periférico (Haines, 2008; Machado, 2006). Como ilustrado na Figura 5, a optogenética ativa/inibe o neurônio com os canais codificados e consequentemente despolariza ou hiperpolariza os neurônios com os quais faz conexão, como se o neurônio fosse ativado/inibido fisiologicamente (Palmer, 2010).

Desenvolvimentos recentes na optogenética estão abrindo novas possibilidades para o campo da neurociência (Fiala *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Pesquisadores como Mutoh *et al.* (2010) vem trabalhando no ultimo decênio em cultura celular e em modelos animais com biosensores por meio de modificação gênica em proteínas fluorescentes sensíveis à tensão elétrica (do inglês *voltage sensitive fluorescent proteins* (VSFPs)). Quando o neurônio modificado gera uma sinapse, o mesmo responde com um estímulo luminoso. Para a Produção das VSFPs, são utilizadas modificações das proteínas de animais marinhos como a ascídia (*Ciona intestinalis*) e da água-viva (*Aequorea Victoria*) (Mutoh *et al.*, 2010). As VSFPs tendem a ser monocromáticas como mostra

a Figura 6, respondendo a um comprimento de onda de luz específico entre o vermelho e o azul.

Pode-se codificar neurônios com a ChR2 (que responde com a despolarização) e/ou com a NpHR (que responde com a hiperpolarização) e codificar neurônios adjacentes com VSFPs, assim, um estímulo pós sináptico pode ser expresso por um sinal luminoso (Mancuso *et al.*, 2010) como mostra a Figura 7. Lee *et al.* (2010) aplicaram laser azul (comprimento de onda igual a 473 nm) a 20 Hz (duração do pulso 15 ms) no tálamo motor, onde foi evidenciada a ativação do córtex motor de ratos adultos, tendo sido o vírus implantado no córtex motor. Esses resultados mostram que utilizando as técnicas da optogenética é possível alterar as codificações das vias neurais, viabilizando a identificação de vias encefálicas.

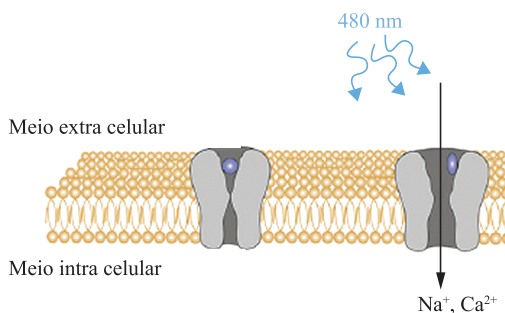


Figura 3. Canais de cátions codificados que respondem a fótons com a entrada de íons no meio intracelular e despolarização da membrana [adaptado de Fiala *et al.* (2010)].

Figure 3. Encoded cation channels responsive to photons by the entering of ions into the intracellular medium and membrane depolarization [adapted from Fiala *et al.* (2010)].

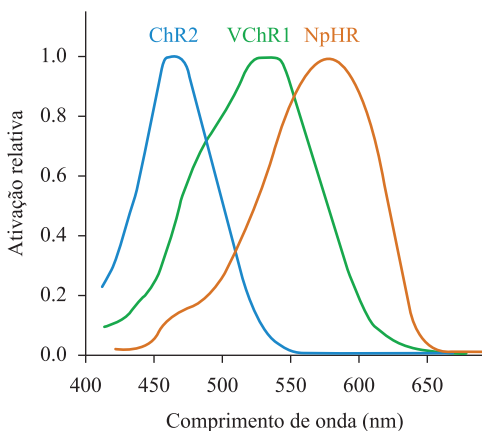


Figura 4. Comprimentos de onda que respondem aos canais iônicos codificados [adaptado de Zhang *et al.* (2010)].

Figure 4. Wavelengths that respond to the coded ion channels [adapted from Zhang *et al.* (2010)].

A técnica de ressonância magnética funcional BOLD (*Blood oxygenation level dependent*, dependente do nível de oxigênio no sangue) avalia a atividade neural (Lee *et al.*, 2010). Mesmo sendo aplicada em modelo animal, a ressonância magnética com BOLD, em conjunto com a técnica de optogenética, mostra-se futuramente possível para determinação de mapas neurais em humanos (Palmer, 2010). As vias tálamo-corticais e córtico-talâmicas são entrelaçadas, o que torna difícil o estudo das suas conexões. A optogenética aplicada a essas vias viabiliza seu estudo isolado (Cruikshank *et al.*, 2010).

Kravitz *et al.* (2010) estudaram estimulações direta e indireta das células espinhosas médias dos gânglios basais (estriato) de ratos com Parkinson e com alteração transgênica dos receptores de dopamina D1 e D2. Realizaram a expressão viral de ChR2 nos receptores e utilizaram um laser com comprimento de onda de 473 nm e 1 mW de potência. Durante a

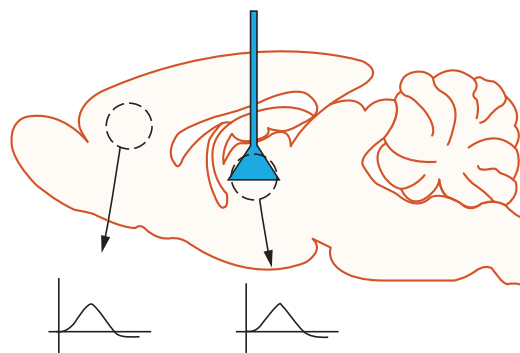


Figura 5. Estimulação óptica de células codificadas do tálamo de ratos com resposta do córtex motor primário [adaptado de Palmer (2010)].

Figure 5. Optical stimulation of cells encoded in the thalamus of rats with the primary motor cortex response [adapted from Palmer (2010)].

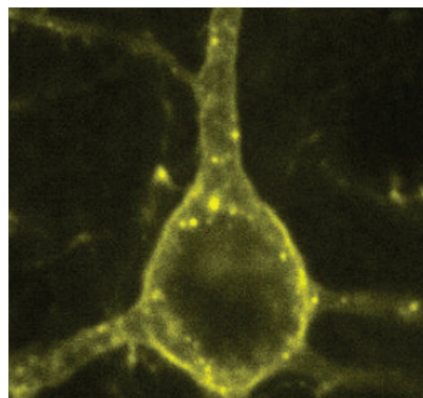


Figura 6. Neurônios piramidais de rato com modificação genética para responder a uma sinapse com a cor amarela [adaptado de Mutoh *et al.* (2010)].

Figure 6. Pyramidal neurons of rats with genetic modification to respond to a synapse with the yellow [adapted from Mutoh *et al.* (2010)].

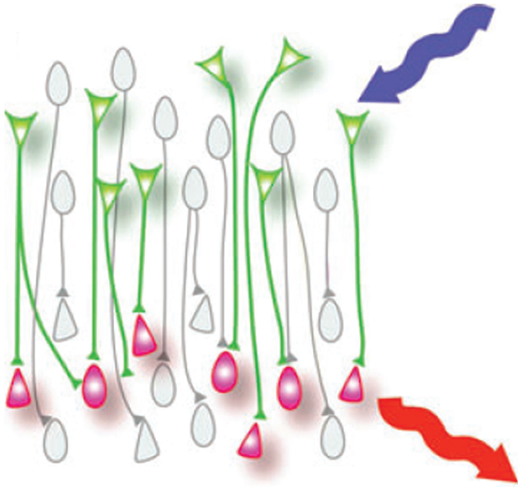


Figura 7. Neurônios codificados com optogenética e proteínas fluorescentes sensíveis à tensão elétrica [adaptado de Mancuso *et al.* (2011)].

Figure 7. Neurons encoded by optogenetics and voltage-sensitive fluorescent proteins [Adapted from Mancuso *et al.* (2011)].

estimulação óptica, os receptores de dopamina tipo D1 sofreram aumento da frequência de despolarização, de 0,03 para 1,16 Hz. Já os receptores D2 sofreram incremento na frequência, de 0,06 para 0,76 Hz. Os resultados mostraram que a excitação bilateral das vias indiretas das células espinhosas médias gera bradicinesia e paralisação. Do contrário, a estimulação em vias diretas da célula espinhosa média, reduz a paralisação e aumenta a locomoção.

A ativação das vias dopaminérgicas D1 e D2 que formam projeções presentes no núcleo *accumbens* (localizado no lobo frontal), centro de recompensa durante o uso de cocaína, ainda são superficialmente conhecidos. Lobo *et al.* (2010) avaliaram o efeito a estimulação óptica e optogenética com codificação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 sobre a ausência do TrkB (receptor do *brain-derived neurotrophic factor*). Utilizou-se um feixe de luz azul (λ igual a 473 nm) com frequências de 1, 1,4 e 10 Hz e pulsos com duração de 200 ms e 1 s. Os resultados mostraram que a ativação do receptor D2 suprimiu o sistema de recompensa da cocaína e efeitos contrários foram encontrados com a ativação do receptor D1.

Arrenberg *et al.* (2010) testaram a viabilidade de um marca-passo cardíaco por meio de controle optogenético. Realizaram alteração gênica de NpHR e ChR2 em células do miocárdio de peixes zebras. Os pesquisadores conseguiram simular: (1) taquicardia, (2) bradicardia, (3) bloqueio atrioventricular e parada cardíaca, tornando promissora a futura aplicação de optogenética em marca-passo cardíaco.

O *locus coeruleus* é uma estrutura noradrenérgica localizada no tronco cerebral com função de coordenar os estados de vigília e alerta (Saper *et al.*, 2005). Carter *et al.* (2010) avaliaram, por meio de optogenética, a resposta do *locus coeruleus* de ratos ao estímulo óptico. Os neurônios do *locus coeruleus* foram modificados com o (I) ChR2 (excitatório) que responde à cor azul, e (II) NpHR, que é uma bomba de cloreto (inibitório), sensível a cor amarela. Foram utilizados dois lasers para o experimento: um (I) laser de cor azul (comprimento de onda igual a 473 nm) com 20 mW potência, com função estimulatória e um (II) laser de cor amarela (593 nm) com efeito inibitório (hiperpolarização dos neurônios). Foram utilizadas as técnicas de medição de eletroencefalografia (EEG) e eletromiografia (EMG) da musculatura do pescoço. A fotoinibição do *locus coeruleus* causa a redução da duração de vigília. A fotoestimulação do *locus coeruleus* causa mudança do estado de sono para vigília, imediatamente após a estimulação no período de sono não REM, e alguns segundos após o início da estimulação no estágio de sono REM. Os resultados mostraram que com 1 h de aplicação contínua, o laser azul (estimulatório) aumentava-se a duração do período de vigília. Entretanto, frequências acima de 5 Hz causaram estado de paralisação temporária do movimento, assemelhando-se à cataplexia, registrado pela EMG, que cessava apenas 15-20 s após a interrupção do estímulo (Carter *et al.*, 2010).

O deslocamento do globo ocular com o objetivo de redirecionar a fixação visual de um objeto qualquer é denominado de sacada (Costa, 2007). Por meio da optogenética, Schoonheim *et al.* (2010) conseguiram localizar o centro neural do movimento de sacada no tronco cerebral de larvas de peixe zebra (*Danio Rerio*). Recentemente, Leifer *et al.* (2011) estudaram o circuito motor e mecano-sensorial de vermes (*Caenorhabditis elegans*) também com técnicas da optogenética. Foram utilizados os canais ChR2 (estimulatório) e NpHR (inibitório) com comprimentos de onda (λ) de 473 nm (azul) e 532 nm (amarelo), respectivamente. Goold e Nicoll (2010), aplicaram optogenética a cultura de neurônios piramidais de ratos envolvidos na formação da memória da área CA1 do hipocampo. Os canais codificados foram os receptores do neurotransmissor glutamato AMPA e NMDA. Foi utilizado diodo operando com um comprimento de onda igual a 470 nm e uma potência de 195 mW, aplicada em uma área de 1.963 mm², onde o estudo mostrou a viabilidade do uso em neurônios piramidais.

Paralikal *et al.* (2010) desenvolveram um protótipo de estimulador óptico para optogenética implantável, com configurações ajustáveis no comprimento de onda em 473 nm e 535 nm, ativador do ChR2 e inibidor do

NpHR, respectivamente. A densidade de potência de saída pode ser regulada em até $5,3 \text{ mW/cm}^2$, para cada um dos dois canais independentemente. A frequência pode ser ajustada entre 0,153 e 200 Hz, e a duração do pulso ajustada de $100 \mu\text{s}$ à períodos acima de 10 ms. Im *et al.* (2011) projetaram e desenvolveram uma sonda neural com aplicação em optogenética como mostra a Figura 8. Possibilitando estimulação com luz azul e amarela, com potência de saída de até $50 \mu\text{W}$, intensidade suficiente para despolarizar/inibir regiões neurais codificadas com optogenética.

Iwai *et al.* (2011) desenvolveram um dispositivo de baixo custo, pequeno, acionado por LED para estimulação óptica dos neurônios corticais de ratos e proporciona movimentação livre por ser controlado com tecnologia sem fio. O dispositivo é facilmente montado sobre a cabeça de um rato com um bloco de polímero e opera com uma tensão de 5 V - 6 V. Zhang *et al.* (2009), como mostra a Figura 9, desenvolveram uma matriz de cem elementos, onde um era a sonda óptica e os outros eletrodos de medição eletrofisiológica, com a capacidade de aplicar a estimulação óptica e gravar os sinais neurais sem gerar interferência no sinal captado, o que ocorre quando o estímulo utilizado é elétrico.

Estimulação óptica neural

A utilização de laser na faixa do infravermelho de baixa intensidade (Wells *et al.*, 2005) sobre o tecido neural com o objetivo de deflagrar potenciais de ação denomina-se estimulação neural por infravermelho, do inglês *infrared neural stimulation* (Cayce *et al.*, 2010b). Ao contrário da estimulação elétrica funcional, a estimulação neural por infravermelho não necessita do contato direto de eletrodos com o tecido e é muito seletiva a feixes nervosos dentro do nervo (Duke *et al.*, 2009; Izzo *et al.*, 2006b).

O estimulador neural por infravermelho comercial com aplicações não humanas Capella (modelo R 1850), da marca Aculight®, como mostra a Figura 10, apresenta uma profundidade de aplicação de 300 a 600 μm , necessitando que sua sonda esteja muito próxima ou adjacente ao tecido nervoso (Aculight, 2010). A estimulação óptica aplicada a 300 μm do modiolo (estrutura óssea da cóclea) reduz em aproximadamente 68% a amplitude dos potenciais de ação compostos do nervo auditivo comparado quando ele está totalmente em contato (Izzo *et al.*, 2006b). Em ratos com o nervo ciático exposto, a estimulação é realizada a aproximadamente 700 μm da superfície do nervo (Duke *et al.*, 2009). A Tabela 3 mostra os parâmetros utilizados nesse tipo de aplicação entre os anos de 2006 a 2010.



Figura 8. Sonda neural com aplicação em optogenética [adaptado de Im *et al.* (2011)].

Figure 8. Neural probe for applications in optogenetics [adapted from Im *et al.* (2011)].

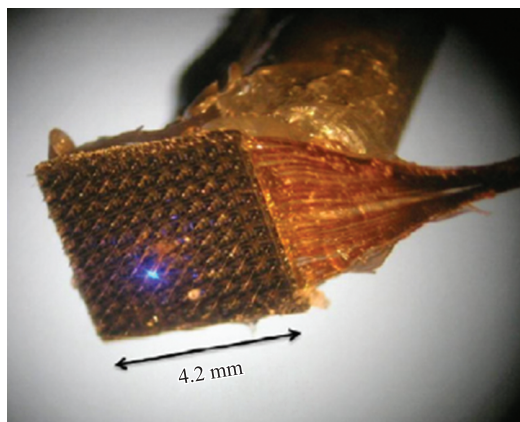


Figura 9. Matriz de cem elementos para estimulação óptica e aquisição de sinal eletrofisiológico encefálico [adaptado de Zhang *et al.* (2009)].

Figure 9. Matrix of one hundred optical stimulation elements and electrophysiological brain signal acquisition [adapted from Zhang *et al.* (2009)].

Da mesma forma que na estimulação elétrica, na EO, quanto maior a frequência, menor a amplitude necessária para despolarizar um neurônio (Cayce *et al.*, 2010b). Wells *et al.* (2007b) estudaram a aplicação de EO com laser de YAG ($\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) em nervos periféricos com testes histológicos para avaliarem as alterações ocorridas. Segundo Wells *et al.* (2007b), a frequência de pulsos desse laser para estimulação segura está limitada em aproximadamente 5 Hz. Nessa faixa não foram observadas lesões tissulares em nervos periféricos (nervos femorais, fibulares e tibiais de ratos) como flictenas (bolhas) e edema. Além disso, radiações de EO entre $0,66 - 0,70 \text{ J/cm}^2$ apresentam probabilidade menor que 1% de ocasionarem danos térmicos (Wells *et al.*, 2007b) já em intensidades acima de 50 J/cm^2

causam desidratação do tecido nervoso (Wells *et al.*, 2007a). Ainda conforme Wells *et al.* (2007a), para comprimentos de onda (λ) entre 2,1 a 1,87 μm (infravermelho), o limiar de despolarização da célula nervosa ($0,3 - 0,4 \text{ J/cm}^2$) é aproximadamente

2,5 vezes menor que a intensidade lesiva ao tecido ($0,8 - 1,0 \text{ J/cm}^2$).

Uma das vantagens da EO é a garantia de seletividade das estruturas estimuladas, como quando aplicada sobre o nervo auditivo em

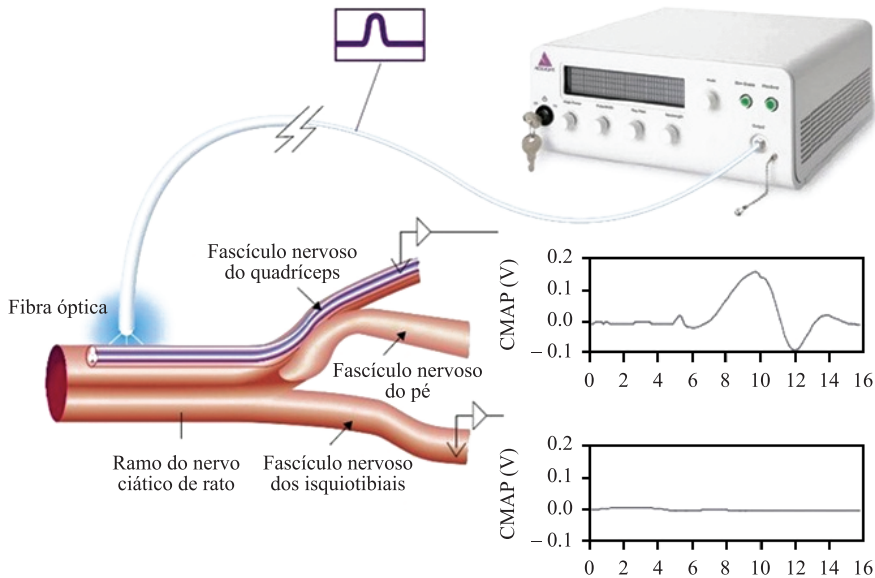


Figura 10. Estimulador neural por infravermelho comercial Capella (modelo R 1850), da marca Aculight®, e sua aplicação seletiva sobre feixes nervosos [adaptado de Aculight (2010)].

Figure 10. Neural stimulator for commercial infrared Capella (model R 1850), Aculight® brand, and its selective application on nerve bundles [adapted from Aculight (2010)].

Tabela 3. Parâmetros utilizados para estimulação óptica por infravermelho entre os anos de 2006 a 2010.

Table 3. Stimulation parameters used for optical infra-red between the years 2006 to 2010.

Autor	λ (μm)	τ (μs)	Frequência (Hz)	Diâmetro da fibra óptica (μm)	Radiação (J/cm^2)	Aplicado em
Izzo <i>et al.</i> (2006b)	2,12	250	2	100	0,01-0,1	Nervo auditivo de rato
Izzo <i>et al.</i> (2006a)	2,12	250	2	100	0,01-0,06	Implante coclear de rato
Wells <i>et al.</i> (2007b)	2,12	350	2-8	600	0,2-1,5	Nervo ciático de rato
Izzo <i>et al.</i> (2007)	1,84-1,88	35-1000	1-13	200	0,001-0,1	Estimulação do sistema auditivo de rato
Teudt <i>et al.</i> (2007)	2,12	250	2	600	0,71-2,2	Nervo facial de rato
Fried <i>et al.</i> (2007)	1,87	2500	10	300	1	Nervo cavernoso de rato
Wells <i>et al.</i> (2007a)	2,12	350	2-10	600	0,3-51,7	Nervo ciático de rato
	2-10	5				
	0,75	350				
Richter <i>et al.</i> (2008)	1,84-1,87	30; 60; 100;	13	200	0,003-0,9	Nervo auditivo de rato
		200; 400; 800 e 1600				
Harris <i>et al.</i> (2009)§	1,82-1,84	10-continuo	*	300	*	Implante vestibular em suíno
Winger <i>et al.</i> (2009)	1,85	200-2000	PU	600	0,1-1	Nervo da pata de lagosta
Duke <i>et al.</i> (2009)	1,87	*	2	400	1,69 \pm 0,30	Nervo ciático de rato
Cayce <i>et al.</i> (2010a)	1,87-1,94	250	10-200	400	0,01-0,5	Córtex somatossensorial de rato

λ : comprimento de onda; τ : duração do pulso; PU: pulso único; §: estimulador óptico por comprimentos de onda que respondem aos canais iônicos codificados por infravermelho comercial Capella R-1850 (Aculight®).

λ : wavelength, τ : pulse duration; PU: single pulse; §: stimulator optical infra-red commercial Capella R-1850 (Aculight®).

implantes cocleares (Izzo *et al.*, 2006b), além do uso para futuros implantes visuais (Kim *et al.*, 2004). Richter *et al.* (2008) aplicaram EO sobre feixes do nervo auditivo em surdez aguda e crônica de ratos Gerbil (*Meriones unguiculatus*). Os resultados foram positivos em ambos os estágios de surdez; entretanto, o limiar de despolarização foi maior na surdez crônica, necessitando de uma intensidade maior para gerar um potencial evocado. Izzo *et al.* (2006b) mostraram que a EO pode ativar o nervo auditivo de ratos adultos com respostas em 20 a 40 dB sem ocasionar dano tecidual ao nervo auditivo.

Izzo *et al.* (2007) utilizaram laser de diodo sobre o sistema auditivo (central) de ratos Gerbil (*Meriones unguiculatus*) para avaliar os potenciais de ação evocados pela EO. O laser foi fixado a aproximadamente 0,5 mm das células do gânglio espiral. Os resultados mostraram que os parâmetros de duração de pulso de 35 μ s a uma frequência de 13 Hz mantinham a despolarização das células constante e estável. Esses resultados indicam que um laser pulsado com uma frequência acima de 10 Hz é favorável para a EO, diferenciando-se dos resultados de Wells *et al.* (2007b), que afirmam que uma frequência segura seria aproximadamente 5 Hz. Izzo *et al.* (2007) estudaram também a relação entre o comprimento de onda (λ) e a penetração óptica mantendo os demais parâmetros fixos. Os resultados demonstraram que a penetração óptica partiu de 308 μ m para um (λ) de 1,88, para 1.129 μ m para um (λ) de 1,84, evidenciando que quanto menor o comprimento de onda, maior a penetração do laser no tecido.

A estimulação elétrica é considerada como padrão ouro para ativação artificial do sistema nervoso central (Azoulay-Zyss *et al.*, 2011) e periférico (Yu e Chang, 2010), mas pode estimular estruturas adjacentes resultando em artefatos indesejados. A estimulação neural por infravermelho pode ser aplicada ao sistema nervoso central sem gerar artefatos por ser pontual (Cayce *et al.*, 2010b). Além disso, podemos citar o uso de tecnologia óptica para aquisição de imagem (como Yanai *et al.* (2005), que desenvolveram uma tomografia óptica com diodos laser de emissão para λ iguais a 780 nm e 830 nm) e recepção, para medir a variação de oxigênio na região cerebral.

Dentre as aplicações viáveis para a EO encontra-se a estimulação encefálica profunda (Cayce *et al.*, 2010b). Cayce *et al.* (2010a) aplicaram no córtex somatossensorial (região do lobo parietal) de ratos, trens de pulsos durante 500 ms com um tempo inativo de 15 a 30 s. Comparou-se o estímulo óptico aplicado ao córtex com o estímulo mecânico (piezoelétrico) a 8 Hz aplicado à pata do animal com registro eletrofisiológico. Uma coleta de imagem por

microscopia cirúrgica do córtex cerebral mostrou que a EO não gerou dano ao tecido encefálico. Os resultados mostraram que a estimulação neural por infravermelho no córtex somatossensorial causou um efeito inibitório, levando-os a concluir que implantes neurais por meio de estimulação neural por infravermelho podem ser viáveis para a concepção de próteses neurais para controle em malha fechada.

Wininger *et al.* (2009) estudaram em nervos *ex vivo* de patas de lagosta (*Homarus americanus*) a EO e elétrica, com registro elétrico e óptico. Utilizaram estimulação elétrica pulsada com duração de 0,2 ms em intervalos de 1-2 s, corrente de 10 μ A a 2 mA e tensão de 3 V a 30 V. A EO (sonda) ficou posicionada a aproximadamente 0,75 mm da inervação. Um LED com emissão em 665 nm irradiava os feixes nervosos, enquanto um fotodiodo e polarizadores cruzados posicionados adjacentes ao tecido captavam a variação de birrefringência do LED durante a estimulação nervosa. Os resultados mostraram que foi possível reconhecer o potencial de ação por meio da birrefringência, mas que a resposta teve um atraso maior que do sinal eletrofisiológico. O sinal óptico mostrou menor interferência que o elétrico no sinal eletrofisiológico. Para Wininger *et al.* (2009), a combinação de EO com a gravação óptica vem a ser uma promissora ferramenta na engenharia neural, tornando futuramente desnecessário o uso de fios hoje utilizados durante gravações eletrofisiológicas.

A aplicação de EO amplia-se da utilização para implante coclear (Izzo *et al.*, 2006a) para o uso no sistema vestibular responsável pelo equilíbrio e funções proprioceptivas (Bear *et al.*, 2002). Como nas pesquisas de Harris *et al.* (2009), que ativaram o ramo vestibular do oitavo par craniano por meio de estimulação neural por infra-vermelho e compararam com a ativação por estimulação elétrica. O posicionamento dos eletrodos e do laser de diodo foi na região da ampola dos canais do labirinto. A estimulação elétrica foi bifásica com um conversor tensão-corrente entre 160 - 710 μ A, para uma frequência de 100 Hz. A EO teve sua calibração com um pico de potência que fornecia até 1,26 W. As ativações ópticas e elétricas deveriam proporcionar movimentos oculares com registros. Os resultados foram negativos para a EO, na qual não se obteve os mesmos efeitos fisiológicos (movimentos oculares evocados) que com estimulação elétrica.

Alternativamente a aplicação de EO por infra-vermelho no tecido neural, Kötter *et al.* (2005) utilizaram EO na faixa de ultra-violeta nos neurônios piramidais da V camada do córtex de ratos para liberação do neurotransmissor glutamato enjaulado. A experiência consistia em aplicar luz de xenon sobre

uma estrutura química com o ácido L-glutâmico e γ -[α -carboxi-2-nitrobenzil]-éster que após a aplicação óptica, liberava um grupo carboxi-nitrobenzil e o neurotransmissor glutamato. A ativação do *flash* de xenon pode influenciar na liberação de glutamato em até 200 μ m do ponto de ativação, tornando o uso de ultra-violeta uma perspectiva para outros fármacos no tecido encefálico.

Teudt *et al.* (2007) utilizaram a estimulação por infra-vermelho no nervo facial de ratos Gerbil (*Meriones unguiculatus*). Foi medida a ativação dos músculos faciais: orbicular do olho, levantador do lábio superior e da asa do nariz e o músculo orbicular da boca e analisado o nível de lesão tissular causada pelo laser sobre o nervo facial e seus ramos. Histologicamente, comprovou-se danos aos feixes nervosos com uma radiação de 2,2 J/cm², mas não ficou comprovada lesão aparente em uma intensidade de 2,0 J/cm². Esses resultados viabilizam a EO para ativar seletivamente ramos do nervo fácil, principalmente em processo cirúrgico com o objetivo de poupar estruturas sadias da extirpação. Com o mesmo escopo de utilizar a estimulação neural por infravermelho para poupar estruturas sadias, Fried *et al.* (2007) fizeram uso da EO do nervo cavernoso durante cirurgia de câncer de próstata para preservar a condição sexual após a cirurgia.

Conclusão

A aplicação de estímulos ópticos no campo da biomedicina vem crescendo gradativamente. A estimulação neural óptica e a optogenética despontam positivamente, tanto como ferramenta de pesquisa como em aplicações clínicas.

A estimulação neural por infravermelho não necessita contato direto com o tecido, o que lhe confere uma grande vantagem em relação à estimulação elétrica, mas tem efetividade restrita ao evocar resposta nos neurônios (ativação-despolarização). Por outro lado, a seletividade do estímulo óptico é superior ao estímulo elétrico, tornando o estímulo óptico mais indicado para implantes do sistema nervoso (coclear, vestibular).

A optogenética pode ser utilizada para manipular o tecido neural despolarizando ou hiperpolarizando os neurônios codificados, além de monitorar as ativações por meio de codificação de proteínas fluorescentes sensíveis à tensão elétrica. Isso permite rastrear estímulos viabilizando a identificação de circuitos intra-cerebrais de um modo não invasivo. Além disso, é possível mapear os circuitos alterados, sendo de grande valia em avaliações e aplicações neuro-psicológicas.

A estimulação óptica por infravermelho e a optogenética são dois campos de pesquisa novos, mas em expansão, cujas pesquisas vem sendo aplicadas apenas a modelos animais. Entretanto, os resultados apresentados nos trabalhos relacionados a tais temas mostram um horizonte promissor de aplicações em seres humanos, podendo até mesmo vir a substituir métodos considerados padrão ouro (estimulação elétrica) na ativação e pesquisa de circuitos neurais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas para a realização deste trabalho.

Referências

- Aculight. Aculight Laser Solutions. Capella. Bothell, WA, USA. [cited 2010 Dec 21]. Available from: www.aculight.com/Downloads/CapellaDatashet.pdf
- Andrasfalvy BK, Zemelman BV, Tang J, Vaziri A. Two-photon single-cell optogenetic control of neuronal activity by sculpted light. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2010. p. 11981-6. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1006620107>
- Arrenberg AB, Stainier DYR, Baier H, Huisken J. Optogenetic control of cardiac function. *Science*. 2010; 330(6006):971-4. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1195929>
- Azoulay-Zyss J, Roze E, Welter ML, Navarro S, Yelnik J, Clot F, Bardinet E, Karachi C, Dormont D, Galanaud D. Bilateral deep brain stimulation of the pallidum for myoclonus-dystonia due to {varepsilon}-sarcoglycan mutations: A pilot study. *Archives of Neurology*. 2011; 68(1):94-8.
- Baylor D. How photons start vision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93(2):560-5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.2.560>
- Bean BP. The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007; 8(6):451-65. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2148>
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências: Desvendando o sistema nervoso*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.
- Carter ME, Yizhar O, Chikahisa S, Nguyen H, Adamantidis A, Nishino S, Deisseroth K, De Lecea L. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nature Neuroscience*. 2010; 13(12):1526-33. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2682>
- Cayce JM, Friedman R, Roe AW, Konrad PE, Jansen ED, Mahadevan-Jansen A. Relating optical signals induced by infrared neural stimulation to electrophysiology. In: *BSEC: Proceedings of Biomedical Sciences and Engineering Conference*; 2010 May 25-26; Oak Ridge. Oak Ridge; 2010a. p. 1-4. <http://dx.doi.org/10.1109/BSEC.2010.5510836>

- Cayce JM, Kao CC, Malphrus JD, Konrad PE, Mahadevan-Jansen A, Jansen ED. Infrared neural stimulation of thalamocortical brain slices. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 2010b; 16(3):565-72. <http://dx.doi.org/10.1109/JSTQE.2009.2032424>
- Costa MF. Movimentos oculares no bebê: o que eles nos indicam sobre o status oftalmológico e neurológico. *Psicologia USP*. 2007; 18(2):47-61.
- Cruikshank SJ, Urabe H, Nurmikko AV, Connors BW. Pathway-specific feedforward circuits between thalamus and neocortex revealed by selective optical stimulation of axons. *Neuron*. 2010; 65(2):230-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.025>
- Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenbock G, Ting A, Schnitzer MJ. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *Journal of Neuroscience*. 2006; 26(41):10380-6. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006>
- Duke AR, Cayce JM, Malphrus JD, Konrad P, Mahadevan-Jansen A, Jansen ED. Combined optical and electrical stimulation of neural tissue in vivo. *Journal of Biomedical Optics*. 2009; 14(6):1-3. <http://dx.doi.org/10.1117/1.3257230>
- Fiala A, Suska A, Schlüter OM. Optogenetic approaches in neuroscience. *Current Biology*. 2010; 20(20):R897-903. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.053>
- Figueiredo M, Lane S, Tang F, Liu BH, Hewinson J, Marina N, Kasymov V, Souslova EA, Chudakov DM, Gourine AV. Optogenetic experimentation on astrocytes. *Experimental Physiology*. 2011; 96(1):40-50. <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2010.052597>
- Fried NM, Rais-Bahrami S, Lagoda GA, Chuang A, Su L, Burnett AL. Identification and imaging of the nerves responsible for erectile function in rat prostate, in vivo, using optical nerve stimulation and optical coherence tomography. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 2007; 13(6):1641-5. <http://dx.doi.org/10.1109/JSTQE.2007.910119>
- Goold CP, Nicoll RA. Single-cell optogenetic excitation drives homeostatic synaptic depression. *Neuron*. 2010; 68(3):512-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.020>
- Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, Goshen I, Thompson KR, Deisseroth K. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell*. 2010; 141(1):154-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.037>
- Gunaydin LA, Yizhar O, Berndt A, Sohal VS, Deisseroth K, Hegemann P. Ultrafast optogenetic control. *Nature Neuroscience*. 2010; 13(3):387-92. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2495>
- Haines DE. *Neuroanatomy: An atlas of structures sections, and systems*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
- Harris DM, Bierer SM, Wells JD, Phillips JO. Optical nerve stimulation for a vestibular prosthesis. In: *SPIE Conference: Proceedings of SPIE*; 2009; San Jose, California. San Jose; 2009. v. 7180, p. 1-4. <http://dx.doi.org/10.1117/12.810197>
- Hegemann P, Möglich A. Channelrhodopsin engineering and exploration of new optogenetic tools. *Nature Methods*. 2010; 8(1):39-42. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.f.327>
- Hubbell WL, Bownds MD. Visual transduction in vertebrate photoreceptors. *Annual Review of Neuroscience*. 1979; 2(1):17-34. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ne.02.030179.000313>
- Im M, Cho IJ, Wu F, Wise KD, Yoon E. Neural probes integrated with optical mixer/splitter waveguides and multiple stimulation sites. In: *IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems: Proceedings of 24th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*; 2011 Jan 23-27; Cancun, Mexico. IEEE; 2011. p. 1051-4. <http://dx.doi.org/10.1109/MEMSYS.2011.5734609>
- Iwai Y, Honda S, Ozeki H, Hashimoto M, Hirase H. A simple head-mountable LED device for chronic stimulation of optogenetic molecules in freely moving mice. *Neuroscience Research*. 2011; 70(1):124-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2011.01.007>
- Izzo A, Pathria J, Suh E, Whitlonb D, Jansen E, Richter C. Selectivity of optical stimulation in the auditory system. *Proceedings of SPIE*. 2006A; 6078(2006):60781P-1-8. <http://dx.doi.org/10.1117/12.659743>
- Izzo AD, Richter CP, Jansen ED, Walsh Junior JT. Laser stimulation of the auditory nerve. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2006B; 38(8):745-53. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20358>
- Izzo AD, Walsh JT, Jansen ED, Bendett M, Webb J, Ralph H, Richter CP. Optical parameter variability in laser nerve stimulation: a study of pulse duration, repetition rate, and wavelength. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2007; 54(6):1108-14. <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2007.892925>
- Kim ET, Seo JM, Zhou JA, Jung H, Kirn SJ. A retinal implant technology based on flexible polymer electrode and optical/electrical stimulation. In: *IEEE International Workshop on Biomedical Circuits & Systems: Proceedings of IEEE International Workshop on Biomedical Circuits & Systems*; 2004; Singapore. IEEE; 2004. p. 12-5.
- Kötter R, Schubert D, Dyhrfeld-Johnsen J, Luhmann HJ, Staiger JF. Optical release of caged glutamate for stimulation of neurons in the in vitro slice preparation. *Journal of Biomedical Optics*. 2005; 10(1):011003-1-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.07.004>
- Kraft TW, Schneeweis DM, Schnapf JL. Visual transduction in human rod photoreceptors. *Journal of Physiology*. 1993; 464(1):747-65.
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PRL, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*. 2010; 466(7306):622-6. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09159>
- Lee JH, Durand R, Gradinaru V, Zhang F, Goshen I, Kim DS, Fenno LE, Ramakrishnan C, Deisseroth K. Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically

- by type and wiring. *Nature*. 2010; 465(7299):788-92. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09108>
- Leifer AM, Fang-Yen C, Gershow M, Alkema MJ, Samuel ADT. Optogenetic manipulation of neural activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*. *Nature Methods*. 2011; 8(2):147-52. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1554>
- Ling YM, Wu SE. 350 mW high-power He-Ne laser and its application in photodynamic therapy. *Review of Scientific Instruments*. 2005; 76:126107-1. <http://dx.doi.org/10.1063/1.2148988>
- Liu X, Tonegawa S. Optogenetics 3.0. *Cell*. 2010; 141(1):22-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.019>
- Lobo MK, Covington HE, Chaudhury D, Friedman AK, Sun HS, Damez-Werno D, Dietz DM, Zaman S, Koo JW, Kennedy PJ. Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science*. 2010; 330(6002):385-90. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1188472>
- Machado ABM. *Neuroanatomia funcional*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2006.
- Mancuso JJ, Kim J, Lee S, Tsuda S, Chow NBH, Augustine GJ. Optogenetic probing of functional brain circuitry. *Experimental Physiology*. 2011; 96(1):26-33.
- Möglich A, Moffat K. Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2010; 9(10):1286-300. <http://dx.doi.org/10.1039/c0pp00167h>
- Mutoh H, Perron A, Akemann W, Iwamoto Y, Knöpfel T. Optogenetic monitoring of membrane potentials. *Experimental Physiology*. 2010; 96:13-18. <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2010.053942>
- Naeser MA, Hahn KAK, Lieberman BE, Branco KF. Carpal tunnel syndrome pain treated with low-level laser and microamperes transcutaneous electric nerve stimulation: a controlled study. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2002; 83(7):978-88. <http://dx.doi.org/10.1053/apmr.2002.33096>
- Niemz MH. *Laser-tissue interactions: fundamentals and applications*. 3rd ed. Berlin: New York: Springer Verlag; 2004.
- Palmer H. Optogenetic fMRI sheds light on the neural basis of the BOLD signal. *Journal of neurophysiology*. 2010; 104(4):1838-40. <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00535.2010>
- Paralikar K, Cong P, Santa W, Dinsmoor D, Hocken B, Munns G, Giftakis J, Denison T. An implantable 5mW/channel dual-wavelength optogenetic stimulator for therapeutic neuromodulation research. In: *IEEE International Solid-State Circuits Conference: Proceedings of IEEE International Solid-State Circuits Conference*; 2010 Feb 7-11; San Francisco. IEEE; 2010. p. 238-9. <http://dx.doi.org/10.1109/ISSCC.2010.5433938>
- Richter CP, Bayon R, Izzo AD, Otting M, Suh E, Goyal S, Hotaling J, Walsh Junior JT. Optical stimulation of auditory neurons: Effects of acute and chronic deafening. *Hearing research*. 2008; 242(1-2):42-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2008.01.011>
- Ryu MH, Moskvina OV, Siltberg-Liberles J, Gomelsky M. Natural and engineered photoactivated nucleotidyl cyclases for optogenetic applications. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(53):41501-8. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.177600>
- Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 2005; 437(7063):1257-63. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04284>
- Schoonheim PJ, Arrenberg AB, Del Bene F, Baier H. Optogenetic localization and genetic perturbation of saccade-generating neurons in zebrafish. *Journal of Neuroscience*. 2010; 30(20):7111-20. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5193-09.2010>
- Teh C, Chudakov DM, Poon KL, Mamedov IZ, Sek JY, Shidlovsky K, Lukyanov S, Korzh V. Optogenetic in vivo cell manipulation in KillerRed-expressing zebrafish transgenics. *BMC Developmental Biology*. 2010; 10(110):1-12. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-10-110>
- Teudt IU, Nevel AE, Izzo AD, Walsh Junior JT, Richter CP. Optical stimulation of the facial nerve: a new monitoring technique? *The Laryngoscope*. 2007; 117(9):1641-7. <http://dx.doi.org/10.1097/MLG.0b013e318074ec00>
- Valchinov ES, Pallikarakis NE. Design and testing of low intensity laser biostimulator. *BioMedical Engineering OnLine*. 2005; 4:1-10.
- Wells J, Kao C, Konrad P, Milner T, Kim J, Mahadevan-Jansen A, Jansen ED. Biophysical mechanisms of transient optical stimulation of peripheral nerve. *Biophysical Journal*. 2007A; 93(7):2567-80. PMID:17526565 PMCID:1965456. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.104786>
- Wells J, Kao C, Mariappan K, Albea J, Jansen ED, Konrad P, Mahadevan-Jansen A. Optical stimulation of neural tissue in vivo. *Optics Letters*. 2005; 30(5):504-7. PMID:17526565 PMCID:1965456. <http://dx.doi.org/10.1364/OL.30.000504>
- Wells JD, Thomsen S, Whitaker P, Jansen ED, Kao CC, Konrad PE, Mahadevan-Jansen A. Optically mediated nerve stimulation: Identification of injury thresholds. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2007B; 39(6):513-26. PMID:17526565 PMCID:1965456. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20522>
- Winger FA, Schei JL, Rector DM. Complete optical neurophysiology: toward optical stimulation and recording of neural tissue. *Applied Optics*. 2009; 48(10):218-24. PMID:17526565 PMCID:1965456. <http://dx.doi.org/10.1364/AO.48.00D218>
- Yanai HF, Yorimoto A, Kubota T, Fujii K, Kawaguchi F, Yamamoto E, Ichikawa N, Koshino Y. Observation on effect of optical stimulation to human using optical topography. *Japanese Journal of Applied Physics*. 2005; 44(8). PMID:17526565 PMCID:1965456. <http://dx.doi.org/10.1143/JJAP.44.6304>
- Yu NY, Chang SH. The Characterization of Contractile and Myoelectric Activities in Paralyzed Tibialis Anterior Post Electrically Elicited Muscle Fatigue. *Artificial Organs*. 2010; 34(4):E117-E21. PMID:17526565

PMCID:1965456. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1525-1594.2009.00956.x>

Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis AR, Durand R, Airan RD, De Lecea L, Deisseroth K. Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nature Protocols*. 2010; 5(3):439-56. PMID:17526565
PMCID:1965456. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.226>

Zhang J, Laiwalla F, Kim JA, Urabe H, Wagenen RV, Song YK, Connors BW, Zhang F, Deisseroth K, Nurmikko AV. Integrated device for optical stimulation and spatiotemporal electrical recording of neural activity in light-sensitized brain tissue. *Journal of Neural Engineering*. 2009; 6:055007. PMID:17526565
PMCID:1965456. <http://dx.doi.org/10.1088/1741-2560/6/5/055007>

Autores

Eddy Krueger*, Tiago Manczak

Laboratório de Engenharia de Reabilitação, Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Curitiba, PR, Brasil.

Edwing Martin Holguin Wilson

Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Wilson José da Silva

Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Curitiba, PR, Brasil.

Percy Nohama

Laboratório de Engenharia de Reabilitação, Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Curitiba, PR, Brasil.
Laboratório de Engenharia de Reabilitação, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, Curitiba, PR, Brasil.