

## **Terapia optogenética e o uso das algas como oportunidade para reconstrução da visão humana**

### **Optogenetic therapy and the use of algae as an opportunity for the reconstruction of human vision**

Anna Júlia Ribeiro<sup>1</sup>; Ana Beatriz Amorim Ramos<sup>2</sup>; Ketelyn Karolynne Santos Delfino<sup>3</sup>; Luanna Silva Almeida<sup>4</sup>; Adriano Lopes da Silva<sup>5</sup>; Rodrigo Junio Rodrigues Barros<sup>6</sup>

1. Graduando em Biomedicina. Centro Universitário Divinópolis. Una Divinópolis, 2021 Divinópolis, Minas Gerais. juliaribeiroanna@gmail.com
2. Graduando em Biomedicina. Centro Universitário Divinópolis. Una Divinópolis, 2021 Divinópolis, Minas Gerais. anabeatrizar558@gmail.com
3. Graduando em Biomedicina. Centro Universitário Divinópolis. Una Divinópolis, 2021 Divinópolis, Minas Gerais. ketelynkaryllynne9@gmail.com
4. Graduando em Biomedicina. Centro Universitário Divinópolis. Una Divinópolis, 2021 Divinópolis, Minas Gerais. luannagaslove@gmail.com
5. Pós-Graduado em Biomedicina. Universidade Unifenas de Minas Gerais, 2014. Pós-graduado Circulação extracorpórea. Universidade AGD de Goiás, 2017. Mestrando em Ciência Farmacêuticas. Universidade Federal São João Del-Rei de Minas Gerais. Professor adjunto do Cento Universitário De Divinópolis. Divinópolis. Minas Gerais. adriano.lopes@una.br
6. PhD em Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2018. Professor adjunto do Cento Universitário De Divinópolis. Divinópolis. Minas Gerais. rodrigo.barros@prof.unibh.br

**Resumo:** A optogenética é uma técnica utilizada para estudos de circuitos neurais no cérebro, é usada uma luz para controlar a atividade das células. O presente estudo teve como objetivo demonstrar a eficiência da terapia optogenética e o uso das algas para tratamento da reconstrução da visão humana, através de uma revisão integrativa da literatura da base de dados pub med, Science, NCBI, nature medicine, google acadêmico. Foram utilizados 12 artigos nesse trabalho de um total de 50.973 encontrados. Os métodos mais utilizados são uma revisão integrativa da literatura, feito através de pesquisas em determinadas bases de dados.

**Palavras-chave:** optogênética, channebrodopsinas chrs2, optogenetiterapia, óptica neural.

**Abstract:** Optogenetics is a technique used to study neural circuits in the brain, a light is used to control the activity of cells. This study aimed to demonstrate the efficiency of optgenetic therapy and the use of algae to treat the reconstruction of human vision, through an integrative literature review from the pub med, Science, NCBI, nature medicine, google academic database. Twelve articles were used in this work out of a total of 50,973 found. The most used methods are an integrative literature review, carried out through searches in certain databases.

**Keywords:** Optogenetics, channebrodopsinas CHRs2, optogenetictherapy, neural optics

### **1.0 Introdução:**

A técnica usada para o estudo de circuitos neurais no cérebro conhecida como Optogenética. É utilizada uma luz para controlar precisamente a atividade das células cerebrais. Usada pelos cientistas para restaurar parcialmente a função visual do paciente para detectar a luz. A optogenetica é baseada em proteínas, produzidas em algas, chamadas rodopsinas de canal, que mudam seu comportamento em resposta à luz. Os micróbios são utilizados para se mover em direção à luz. Que possibilita a ativação de neurônios específicos do cérebro, por meio da junção entre luz, genética e bioengenharia, permitindo assim a identificação diversas doenças e apontando soluções de cura.

Nos estudos optogenéticos, os cientistas pegaram o código genético dos neurônios e adicionaram nele um novo gene que foi extraído de uma espécie de alga, e esse novo código que foi criado, permite que esses neurônios produzam proteínas especiais, chamadas opsinas, que respondem a um tipo específico de luz (luz de cor âmbar). Alga que vive na água e da sujeira pode ser responsável por devolver parcialmente a visão aos cegos. Conhecida como *Chlamydomonas reinhardtii* possui uma estrutura simples, unicelular, constituída por duas caudas parecidas com chicotes circundando seu corpo, que é utilizada para encontrar luz e realizar a fotossíntese, o seu formato é parecido com um olho.

Estudos apontam que cientistas que fizeram os neurônios de ratos sensíveis à luz, os pesquisadores da RetroSense também vão implantar a ChR2 nos neurônios retinianos para torná-los fotossensíveis. A distinção está no meio de transporte da proteína: eles

irão utilizar um vírus em vez de fibra óptica. A ideia de utilizar vírus em tratamentos genéticos para curar doenças genéticas não é novidade, já foi tentado inúmeras vezes, com estes organismos servindo para carregar genes saudáveis até o local da doença. Aqui a diferença é que o gene em questão não vem de outro ser humano, mas sim de uma alga. Assim, a RetroSense age apenas na última camada dos neurônios retinianos, conhecida como células ganglionares da retina. Segundo a pesquisa publicada pela revista *nature medicine*, um homem cego recebeu uma injeção intravítrea com um vírus adeno-associado em seu olho com pior visão, com o objetivo de infectar o tecido do olho, esse vírus ele é benéfico e é constituído por proteínas sensíveis a luz, que reagiriam ao tratamento com pulsos de luz, depois da aplicação foi colocado óculos especiais que fazia a tradução das imagens da câmera, para o comprimento de onda certo e para a cor âmbar. (14,16).

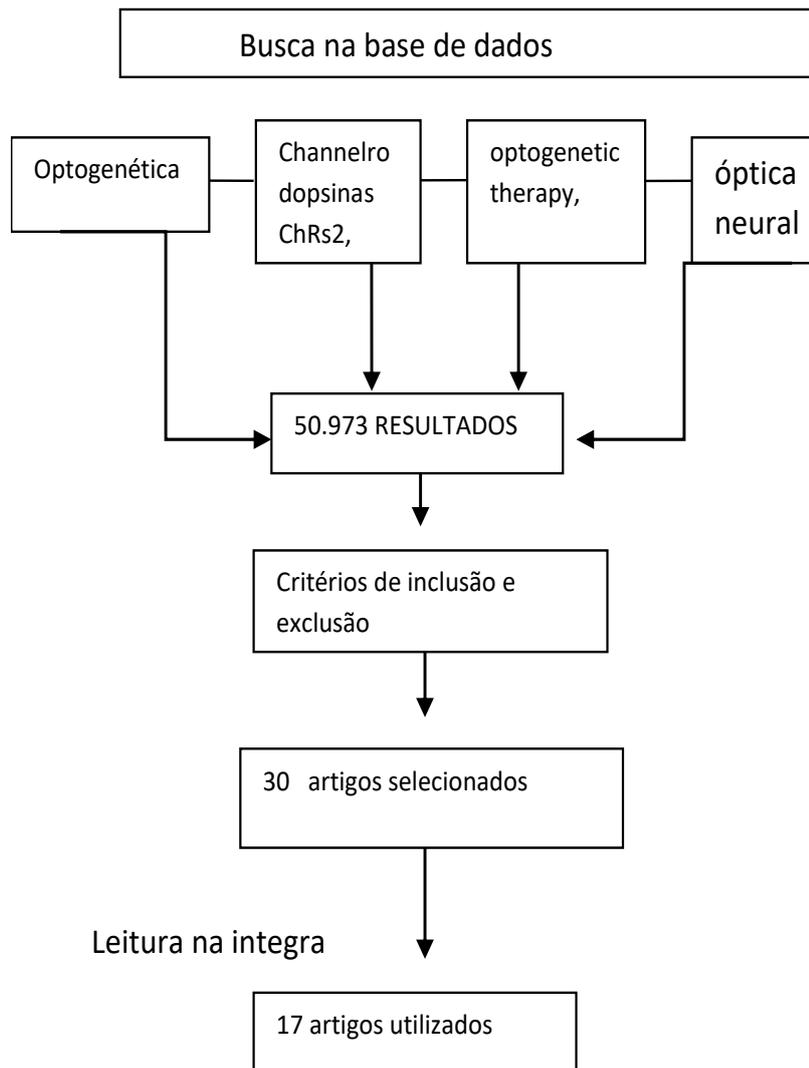
## **2.0 MÉTODO:**

O presente estudo se caracteriza como uma revisão integrativa da literatura, feito através de pesquisas da base de dados no Pub Med, Science, NCBI, Nature Medicine, Google Acadêmico, descritos na busca como: Optogenética, Channelrodopsinas ChRs2, optogenetic therapy, óptica neural. Os critérios de inclusão foram artigos originais, de 2005 a 2021, disponíveis em português e inglês e que tratavam da optogenética.

## **3.0 RESULTADOS:**

A busca de artigos na base de dados Pud Med, Science, NCBI, Nature Medicine e Google Acadêmico resultou em 50.978 resultados. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 30 artigos, em seguida, 17 artigos foram usados após leitura na íntegra de acordo com a figura a seguir.

Figura. Nº 1: fluxograma apresentando o processo de busca e seleção dos artigos utilizado.



#### 4.0 DISCUSSÃO:

##### Neurofisiologia da visão

A luz é um dos mais importantes sinais que expressam informações para os sistemas biológicos, e, para detectá-la os organismos vivos possuem várias moléculas fotorreceptoras como fitocromos, criptocromos, xantopsinas, rodopsinas, que são todas elas proteínas sensíveis à luz de diferentes comprimentos de onda. Rodopsinas são proteínas fotorreceptoras que podem ser encontradas nos 3 grandes domínios dos seres vivos: Bactérias, Archaeas e Eucariotos, e são classificadas como microbianas (Tipo I) ou animais (Tipo II). Quando a luz entra no olho, passa primeiro pela córnea, humor aquoso, cristalino, humor vítreo e por último, a retina, que é a estrutura do olho que percebe a luz. (7)

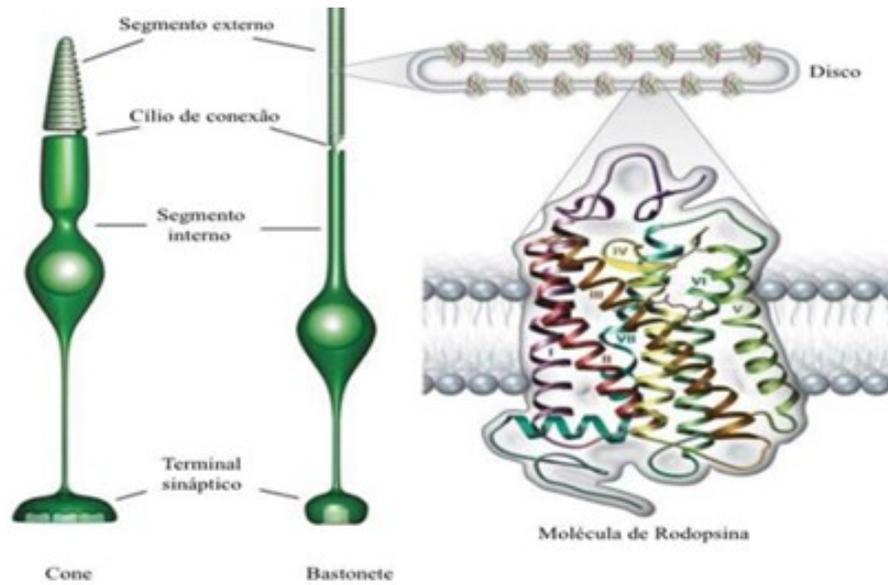
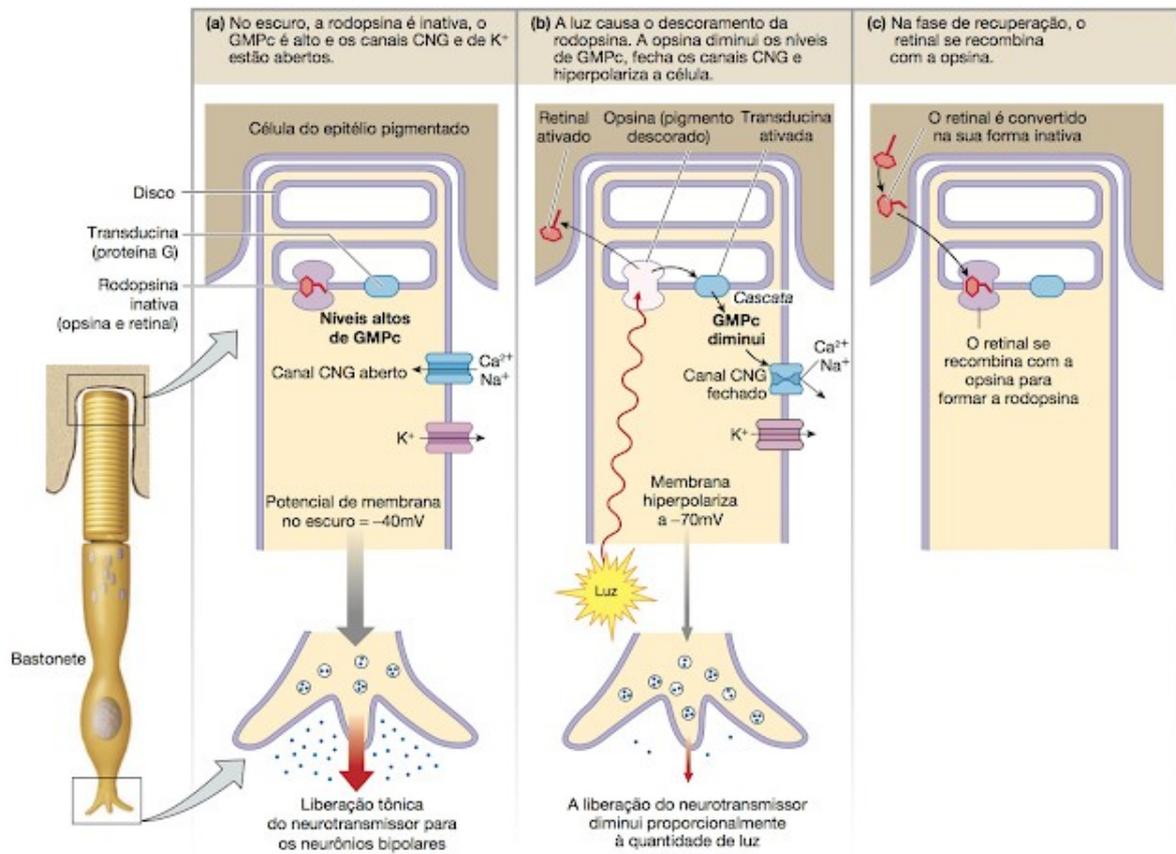


Figura 2: Neurofisiologia-da-visao.Fonte: Adaptada de Neurofisiologia-da-visao, 2018.

Na retina, contém células chamadas bastonetes, que atuam em condições com pouca luz, e os cones, que trabalham na visão de cores e detalhes. Com isso, a absorção da luz por essas células é seguida dos seguintes processos: 1. Chegada de retinol (vitamina A) no olho e conversão dele em retinal (cis); 2. Ligação do retinal com as opsinas na membrana plasmática dos cones e bastonetes e a formação da rodopsina; 3. Isomerização da rodopsina (11-cis a all-trans), provocando uma mudança conformacional da sua estrutura para a metarrodopsina e iniciando uma série de interações proteína-proteína que disparam uma cascata de sinalização, que envolve o segundo mensageiro GMP cíclico (cGMP); 4. A membrana celular de um bastonete possui uma carga elétrica. Quando a luz atinge a rodopsina, e, ao ativa-la, causa uma redução no GMP cíclico, que por sua vez aumenta esta carga elétrica e produz uma corrente elétrica por toda a célula.



● FIGURA 10-41 As fototransdução nos bastonetes usa o pigmento visual rodopsina.

Figura 3: Arquivo BioQui; Postado por Rafael Henrique, 2015

Com isso, o GMPc, na presença de luz, é responsável por fechar os canais de cálcio e sódio nos cones e bastonetes desencadeando a hiperpolarização dessas células e impulso elétrico necessário, que posteriormente atinge um gânglio nervoso e, depois, o nervo ótico. 5. O GMPc é produzido continuamente no fotorreceptor, mantendo os canais de sódio abertos e deixando a célula despolarizada para iniciar o processo quando exposta a luz novamente. A luz é formada por diferentes comprimentos de onda (400 a 700nm). Chamamos de luz o segmento do espectro eletromagnético que o olho humano é sensível, que é resultado da percepção (transdução) através dos cones e bastonetes. Os cones distinguem a luz três cores: verde (533nm), vermelho (564nm) e azul (437nm). Já os bastonetes são sensíveis à púrpura (489nm) e são responsáveis pela visão monocromática ou em tons de cinza. (8,9,10,18).

## **Opsinas microbianas**

Opsinas são canais de íons controlados através da ativação de luz ou bombas que absorvem luz em comprimentos de onda específicos e respondem abrindo ou fechando, o que conduz o fluxo de íons para dentro ou para fora da célula. Há uma variedade de opsinas microbianas de ocorrência natural que respondem a diferentes comprimentos de onda de luz, como a luz azul ou amarela, além de introduzir respostas eletroquímicas. Os pesquisadores usam a engenharia genética para melhorar essas opsinas naturais – inserindo mutações precisas para alterar o espectro de absorção ou adicionando sinais de tráfego para localizar opsinas na membrana celular. (1).

As opsinas microbianas podem ser direcionadas e expressas em subconjuntos específicos de neurônios, permitindo o controle espaço-temporal exato desses neurônios ligando e desligando a fonte de luz. A optogenética tem sido utilizada para estudar a fisiologia do cérebro e do sistema nervoso, na tentativa de mapear e compreender os circuitos neuronais. (1).

## **Channelrodopsinas**

As channelrodopsinas permitem a despolarização rápida dos neurônios após a exposição à luz+ através da estimulação dos canais iônicos. Canalrodopsinas de ocorrência natural foram descobertas nas algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii*, onde nelas estão presentes o canal rodopsina-1 (ChR1) e o canal rodopsina-2 (ChR2), ambas ativadas por luz azul. Os fótons de luz entram no eyespot (olho primitivo), localizado no cloroplasto, e se propagam lateralmente refletidos pelos carotenóides, ativando esses dois canais e provocando um influxo de cálcio que induz mudanças no batimento do flagelo e faz com que a alga se mova em direção à luz (fototaxia). Entretanto, ChR2 é a primeira ferramenta optogenética abrangentemente adotada, por assumir condutância mais alta em pH fisiológico e trafega bem para a membrana. (7,1).

## **Terapias optogenéticas**

A cegueira consiste na degeneração dos fotorreceptores, mas poupa outras células da retina, levando à esperança de que a expressão de proteínas sinalizadoras ativadas por luz nas células sobreviventes pudesse restaurar a visão (11). As terapias optogenéticas visam restabelecer a sensibilidade a luz em células ganglionares da retina (RGC) em indivíduos com perda irreversível da visão. O uso da optogenética para restaurar a visão foi proposto

pela primeira vez por Zhao Pan e seus colegas, que expressaram a opsina microbiana channelrodopsina-2 (Chr2) nos RGCs de camundongos cegos e logo em seguida na retina de saguis normais, e que desde então fomentou novos estudos e ensaios clínicos. (GREGORY et al., 2021). A técnica em questão possui ferramentas classificadas como atuadores e sensores. A primeira, é uma ferramenta geneticamente codificada para o controle de proteínas ativadas por luz (opsinas microbianas e interruptores ópticos). Já os sensores são repórteres geneticamente codificados de sinais moleculares (indicadores de cálcio). (ADDGENE., 2017).

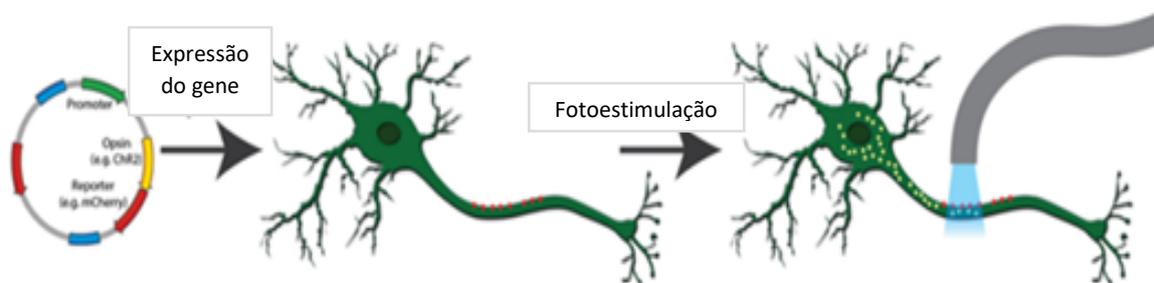


Figura 6: Optogenetics Guide. Fonte: Adaptado de Optogenetics Guide

A figura acima representa um exemplo de um procedimento optogenético. Um canal rodopsina, fundido a uma proteína (mCherry), é expresso em neurônios. Quando exposto à luz do comprimento de onda correto, o poro se abre, os cátions fluem para a célula e o neurônio é ativado. (ADDGENE., 2017).

Semelhante a isso, no estudo analisado (ensaio clínico) para produção deste artigo (4), os pacientes têm uma doença hereditária chamada retinite pigmentosa (RP). A RP é uma doença progressiva causada por mutações em mais de 71 genes, que afeta mais de 2 milhões de pessoas em todo o mundo e sem terapias aprovadas (com exceção de uma terapia de substituição gênica para uma forma de RP de início precoce causada por mutação no gene RPE65). Apesar da perda de fotorreceptores, seus olhos ainda têm as células ganglionares que direcionam esses sinais para o cérebro por meio do nervo óptico. Isso significa que os pacientes podem ganhar visão fazendo com que essas células recebam uma opsina microbiana. O estudo PIONEER de fase 1 / 2a aberto foi projetado para avaliar a segurança e eficácia de um tratamento experimental para os pacientes. (JOCELYN.,2021).

A técnica optogenética utilizada pelos neuropesquisadores consiste na inserção de genes que codificam uma proteína sensível à luz em um vetor viral adeno-associado que, por

sua vez, codifica a proteína do canal de rodopsina sensora de luz ChrimsonR, fundida à proteína fluorescente vermelha tdTomato (incluída para aumentar a expressão de ChrimsonR na membrana celular). Em seguida, esses vetores virais geneticamente modificados são injetados em um dos olhos. A proteína, chamada ChrimsonR, é uma versão projetada de uma proteína fotossensível (ChR2) encontrada em algas *Chlamydomonas reinhardtii*, que permite que o organismo unicelular detecte e se mova em direção à luz solar. Os canais codificados ChR2 respondem ao estímulo luminoso com a abertura dos canais de cátions da membrana, despolarizando-a. ChrimsonR foi modificado para reagir às cores dentro da extremidade avermelhada do espectro de cores (luz âmbar). A escolha da ChrimsonR se deve ao fato de que, entre os sensores optogenéticos disponíveis, seu espectro de ação é mais desviado para o vermelho (a luz âmbar é mais segura e causa menos constrição da pupila). Ao injetar genes para ChrimsonR na retina, a equipe esperava tornar essas células sensíveis à luz amarelo. Diante disso, o paciente fez uso de óculos especiais estimuladores de luz, que capturam imagens do mundo visual por meio de uma câmera neuromórfica e detecta mudanças de intensidade, pixel a pixel, como eventos distintos. Os óculos, então, traduzem esse sinal em imagens monocromáticas (luz âmbar) e os projetam em tempo real à medida que a luz local, de 595 nm, pulsa na retina, ativando o ChrimsonR.(JOSÉ et al.,2021).

O primeiro voluntário foi um francês de 58 anos, diagnosticado com retinite pigmentosa, uma doença que leva à morte de células fotossensíveis na superfície da retina, há 40 anos. O paciente foi analisado em três testes psicofísicos: (1) ambos os olhos abertos sem os óculos estimuladores de luz; (2) olho não tratado coberto, olho tratado aberto sem os óculos (monocular natural); e (3) olho não tratado coberto, olho tratado aberto e estimulado com os óculos (monocular estimulado). O primeiro teste consistiu em perceber, localizar e tocar um único objeto colocado em uma mesa branca, sem êxito. O segundo teste incluiu perceber, contar e localizar mais de um objeto, ou seja, dois ou três copos, que também foi incapaz de realizá-lo. Entretanto, na condição monocular estimulada, o paciente percebeu os objetos em 63% das tentativas (12 de 19). Para investigar a ligação entre a recuperação parcial da visão e a atividade neuronal, foi realizado um terceiro teste que combinou a avaliação da visão com a eletroencefalografia multicanal extracraniana (EEG), uma técnica de registro cerebral não invasiva que fornece uma leitura da atividade neuronal através do córtex. Novamente, a taxa de avaliações corretas foi significativamente maior sob condições monoculares estimuladas.

Os resultados dos três testes visuais e visuomotores sugerem que a estimulação retiniana optogenética desencadeada pela cena visual induziu a percepção visual. O primeiro e o segundo testes foram realizados cinco meses antes do terceiro teste visual, sugerindo que o ganho na função visual foi estável durante esse período. (JOSÉ et al.,2021).

Fazendo uso dos óculos especiais, o paciente relatou espontaneamente a identificação de faixas de pedestres e pôde contar o número de listras brancas. Em seguida, o paciente observou uma grande melhora nas atividades visuais diárias, como detectar um prato, caneca ou telefone, encontrar um móvel em um quarto ou detectar uma porta em um corredor. Assim, o tratamento com a combinação de um vetor optogenético com óculos estimulantes de luz promoveu uma recuperação visual significativa neste paciente, contribuindo e trazendo qualidade em sua vida diária. Mesmo agora, a visão do homem ainda é limitada, já que ele só consegue ver imagens monocromáticas e em baixa resolução. Contudo, o artigo demonstra uma maneira promissora de restaurar parcialmente a visão em pacientes cegos afetados com RP avançado. (JOSÉ et al.,2021).

## **5.0 CONCLUSÃO**

Com todos os avanços da tecnologia, nota-se que é possível ter um resultado perceptível das condições visuais utilizada pela técnica de circuitos neurais, baseando-se nas proteínas produzidas por algas nas retinas humanas e podem ser encontradas nas células bastonetes e os cones. Assim, produzira correntes elétricas e após uma maior captação de luz, será possível a ativação da rodopsina. Por outro lado, as opsinas microbianas são usadas como testes para obtenção de resultados em subconjuntos específicos de neurônios, utilizando-se a engenharia genética para uma melhora significativa nas opsinas naturais.

A partir da minuciosa análise destes testes, foi possível obter resultados relevantes para a presente pesquisa e futuras, porém, é importante frisar que não é possível se ter a cura total do paciente, pois sua visão é limitada, conseguindo somente observar imagens com baixa resolução e monocromáticas. Dessa forma, faz-se necessário mais investimento em pesquisas relacionadas.

## 6.0 REFERÊNCIAS:

- 1- **Addgene: Optogenetics Guide.** Disponível em: <<https://www.addgene.org/guides/optogenetics/>>. Acesso em: 19 abr. 2022.
- 2- GAUVAIN, G.; AKOLKAR, H.; CHAFFIOL, A.; ARCIZET, F.; KHOEI, M. A.; DESROSIERS, M.; JAILLARD, C.; CAPLETTE, R.; MARRE, O.; BERTIN, S.; FOVET, C.-M.; DEMILLY, J.; FORSTER, V.; BRAZHNIKOVA, E.; HANTRAYE, P.; POUGET, P.; DOUAR, A.; PRUNEAU, D.; CHAVAS, J.; SAHEL, J.-A.; DALKARA, D.; DUEBEL, J.; BENOSMAN, R.; PICAUD, S. Optogenetic Therapy: High Spatiotemporal Resolution and Pattern Discrimination Compatible with Vision Restoration in Non-Human Primates. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 125, dez. 2021. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s42003-020-01594-w>>. Acesso em: 19 abr. 2022.
- 3- MCGREGOR, J. E.; GODAT, T.; DHAKAL, K. R.; PARKINS, K.; STRAZZERI, J. M.; BATEMAN, B. A.; FISCHER, W. S.; WILLIAMS, D. R.; MERIGAN, W. H. Optogenetic Restoration of Retinal Ganglion Cell Activity in the Living Primate. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1703, 3 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-020-15317-6>>. Acesso em: 19 abr. 2022.
- 4- SAHEL, J.-A.; BOULANGER-SCÉMAMA, E.; PAGOT, C.; ARLEO, A.; GALLUPPI, F.; MARTEL, J. N.; ESPOSTI, S. D.; DELAUX, A.; DE SAINT AUBERT, J.-B.; DE MONTLEAU, C.; GUTMAN, E.; AUDO, I.; DUEBEL, J.; PICAUD, S.; DALKARA, D.; BLOUIN, L.; TAIEL, M.; ROSKA, B. Partial Recovery of Visual Function in a Blind Patient after Optogenetic Therapy. **Nature Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1223–1229, jul. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41591-021-01351-4>>. Acesso em: 19 abr. 2022.
- 5 - FERRARI, U.; DENY, S.; SENGUPTA, A.; CAPLETTE, R.; TRAPANI, F.; SAHEL, J.-A.; DALKARA, D.; PICAUD, S.; DUEBEL, J.; MARRE, O. Towards optogenetic vision restoration with high resolution. **PLoS Computational Biology**, v. 16, n. 7, p. e1007857, 15 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7416966/>>. Acesso em: 19 abr. 2022.

6- **Blind man regains some vision, with help from light-sensing algal protein.** Disponível em: <<https://www.science.org/content/article/blind-man-regains-some-vision-help-light-sensing-algal-protein>>. Acesso em: 19 abr. 2022.

7- **Percepção da luz: dos Microrganismos a Visão Humana.** Disponível em: <<http://www.iq.usp.br/schreier/suleygomespalestra.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2022.

8- **Como funciona a visão.** Disponível em: <<http://focusmedicinadosolhos.com.br/index.php/artigos/como-funciona-a-visao/>>. Acesso em: 19 abr. 2022.

9- **Fisiologia da visão - T Fisiologia da visão O cristalino é o responsável pelo processo de.** Disponível em: <<https://www.studocu.com/pt-br/document/universidade-estadual-de-montes-claros/anatomia/fisiologia-da-visao/13546009>>. Acesso em: 19 abr. 2022.

10- **NEUROFISIOLOGIA DA VISÃO - PDF Free Download.** Disponível em: <<https://docplayer.com.br/81759092-Neurofisiologia-da-visao.html>>. Acesso em: 19 abr. 2022.

11- BERRY, M. H.; HOLT, A.; LEVITZ, J.; BROICHHAGEN, J.; GAUB, B. M.; VISEL, M.; STANLEY, C.; AGHI, K.; KIM, Y. J.; CAO, K.; KRAMER, R. H.; TRAUNER, D.; FLANNERY, J.; ISACOFF, E. Y. Restoration of Patterned Vision with an Engineered Photoactivatable G Protein-Coupled Receptor. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1862, 30 nov. 2017.

12- KRUEGER, E.; MANCZAK, T.; WILSON, E. M. H.; SILVA, W. J. da; NOHAMA, P. Optogenética e estimulação óptica neural: estado atual e perspectivas. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 28, n. 3, p. 294–308, 2012. Disponível em: <<http://rbejournal.org/doi/10.4322/rbeb.2012.029>>. Acesso em: 19 abr. 2022.

13- **Chlamydomonas reinhardtii - an overview | ScienceDirect Topics.** Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/chlamydomonas-reinhardtii>>. Acesso em: 19 abr. 2022.

14- **Optogenética: o controle da mente por meio da luz - eCycle.** Disponível em: <<https://www.ecycle.com.br/optogenetica/>>. Acesso em: 19 abr. 2022.

15- O tratamento revolucionário que restaurou parte da visão de um homem cego. **BBC News Brasil**, [s.d.] Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-57272089>>. Acesso em: 20 abr. 2022.

16- **Introduction to Optogenetics**. Disponível em: <<https://www.news-medical.net/life-sciences/Introduction-to-Optogenetics.aspx>>. Acesso em: 20 abr. 2022.

17 - HENRIQUE, P. por R. **A fototransdução nos bastonetes usa o pigmento visual rodopsina**[s.d.] Disponível em: <<http://arquivobioqui.blogspot.com/2015/11/as-fototransducao-nos-bastonetes-usa-o.html>>. Acesso em: 20 abr. 2022.