
Nuove tecnologie per studiare il cervello con la luce

Massimo De Vittorio

*Center for Biomolecular Nanotechnologies, Istituto Italiano di Tecnologia, Arnesano (Lecce), Italy
Dipartimento di ingegneria dell'innovazione, Università Del Salento, Lecce, Italy*

Ferruccio Pisanello

Center for Biomolecular Nanotechnologies, Istituto Italiano di Tecnologia, Arnesano (Lecce), Italy

Nell'ultimo decennio l'optogenetica è diventata una delle tecniche più utilizzate nelle neuroscienze moderne. Attraverso l'espressione di proteine fotosensibili in specifiche classi di neuroni, è possibile controllare otticamente l'attività neuronale, attivando o inibendo la generazione di segnali cerebrali. Tuttavia, il cervello è un tessuto intrinsecamente dispersivo, e per sfruttare al meglio le potenzialità dell'optogenetica la comunità scientifica ha sviluppato una serie di approcci in grado di portare efficientemente la radiazione luminosa nel cervello. Questo lavoro ha lo scopo di analizzare lo stato dell'arte dei dispositivi impiantabili per esperimenti di optogenetica, concentrandosi sul ruolo ricoperto dalle micro e nanotecnologie.

Introduzione

Il cervello umano è un organo straordinario, composto da decine di miliardi di neuroni, ciascu-

no dei quali interconnesso con migliaia di altri neuroni grazie un numero incredibile di sinapsi. Questa complessa rete di cellule memorizza ed elabora le informazioni raccolte dai nostri sensi, producendo le nostre sensazioni e azioni. Le neuroscienze studiano da molti decenni questa intricata rete cerebrale per comprenderne la struttura, i meccanismi e per studiare e controllare disordini e patologie cerebrali. Già a partire dalla fine del 1800 si scoprì che l'attività cerebrale è di tipo elettrico: il flusso di ioni attraverso i cosiddetti canali ionici, proteine situate sulla membrana cellulare, determina il potenziale di transmembrana, ovvero la differenza di potenziale elettrico tra il nucleo della cellula e il suo ambiente esterno. Questo potenziale in un neurone a riposo è negativo. Quando il potenziale sale al di sopra di una certa soglia, la cellula si attiva generando il cosiddetto potenziale d'azione. Il metodo più utilizzato per misurare questo potenziale e per influenzarlo è basato sull'uso di uno o più elettrodi metallici. Questo approccio ha portato alla fine del secolo scorso ai primi dispositivi medici per il controllo di patologie cerebrali, ovvero stimolatori elettrici in grado di modulare l'attività

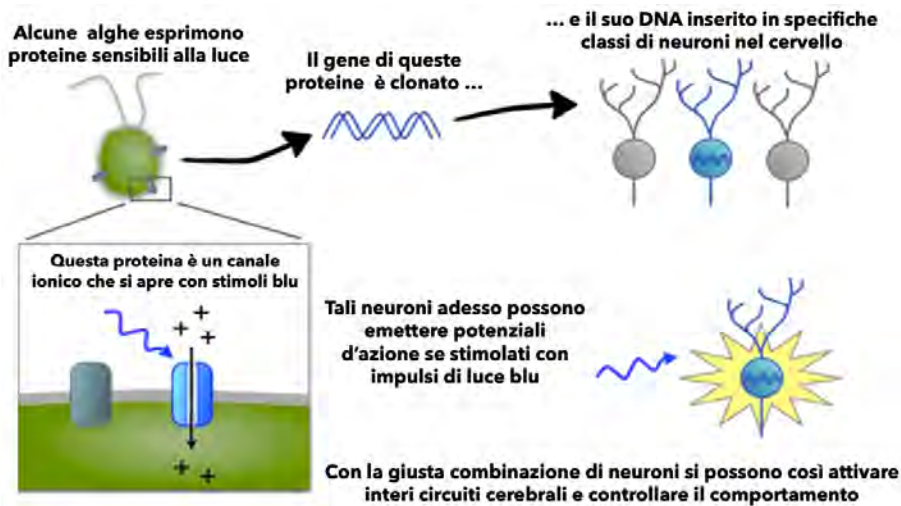


Figura 1: Principio di funzionamento dell'optogenetica. Riprodotta da riferimento [32].

neurone (deep brain stimulation - DBS) grazie ad impulsi elettrici ad alta frequenza in zone specifiche e profonde del cervello, per trattare i sintomi di gravi patologie neurologiche e neuropsichiatriche quali il tremore essenziale, il morbo di Parkinson e la distonia. Pur avendo permesso di ottenere importanti risultati nel trattamento di sintomi motori in pazienti affetti da queste patologie, l'uso di stimoli elettrici può produrre effetti collaterali importanti quali, depressione, sbalzi d'umore e impulsività [1]. Inoltre, l'applicazione di stimoli elettrici colpisce indistintamente ogni classe di cellule, producendo quindi effetti negativi anche su neuroni e zone cerebrali integre. Il cervello è infatti ricco di differenti tipi di neuroni che lavorano assieme per implementare sensazioni, sentimenti, pensieri e movimenti e la capacità di modulare l'attività di specifiche classi di neuroni è essenziale per la comprensione del funzionamento del cervello e per correggerne i malfunzionamenti. Questa specificità nel controllo di tipi distinti di neuroni è adesso possibile grazie al lavoro di un gruppo di scienziati presso le università di Stanford e di Würzburg che hanno messo a punto una nuova combinazione di genetica e fotonica, creando nel 2005 [2] un nuovo filone delle neuroscienze chiamato poi nel 2006 optogenetica. Il termine optogenetica indica un insieme di tecniche che rendono specifiche cellule neuronali attivabili o disattivabili attraverso stimoli luminosi. Definita nel 2010 come la tecnica dell'anno dalla rivista "Nature Methods", si basa sulla capacità di codificare geneticamente il DNA di alcune proteine fotosensibili della famiglia delle opsine, in specifiche classi di neu-

roni. Traendo spunto da alcuni microorganismi algali che si dirigono verso la luce, quali la *Chlamydomonas reinhardtii*, Georg Nagel ed i suoi colleghi riuscirono a clonare nel 2003 il gene della canalrodopsina-2 (ChR2, ChannelRhodopsin-2), che di fatto è un canale ionico sensibile alla luce blu. Il DNA di queste proteine, una volta codificato in alcuni tipi di neuroni produce l'espressione di questi canali ionici sulla membrana cellulare e rende possibile attivare i neuroni con impulsi luminosi (Fig.1) [3]. La ChR2 controlla il flusso passivo di ioni Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} verso l'interno della cellula. Tale flusso depolarizza il neurone e ne stimola quindi l'attività elettrica. Nel tempo sono state sviluppate altre opsine in grado di controllare un flusso inverso di carica per mantenere il neurone iperpolarizzato e quindi "spento". In Fig.2 sono illustrate alcune di queste opsine. L'optogenetica è stata utilizzata con successo in organismi e modelli animali sperimentali (*C. elegans*, zebrafish, topo, ratto) per analizzare la relazione tra circuiti neurali e comportamento ed è stata dimostrata con successo anche in primati [4], permettendo di intravedere la futura applicazione sull'uomo. Oltre alla necessità della codifica genetica, l'optogenetica richiede anche tecniche per l'illuminazione dei neuroni transgenici e dato che il cervello è un mezzo dispersivo, e non trasparente, sono state nel tempo proposte modalità di illuminazione attive, con sorgenti ottiche miniaturizzate interne al cervello, e passive, dove invece le sorgenti ottiche quali LED e laser sono esterne al cervello e la luce è trasferita sui neuroni mediante guide d'onda. Questi approcci possono essere divisi nelle

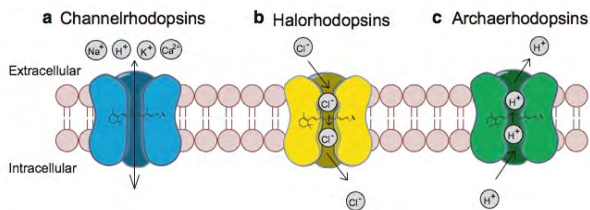


Figura 2: Tre diverse proteine sensibili alla luce utilizzate per optogenetica. a) la ChannelRhodopsin risponde a stimoli che blu che producono un flusso netto di ioni positivi verso l'interno della cellula, depolarizzandola. b) la Halorhodopsin pompa attivamente ioni Cl^- verso l'interno della cellula iperpolarizzandola. c) la archaelhodopsins pompa attivamente ioni H^+ fuori dalla cellula iperpolarizzandola Riprodotta da riferimento [3].

tre grandi macro-categorie illustrate in Fig.3, descritte nel dettaglio nel seguito di questo lavoro.

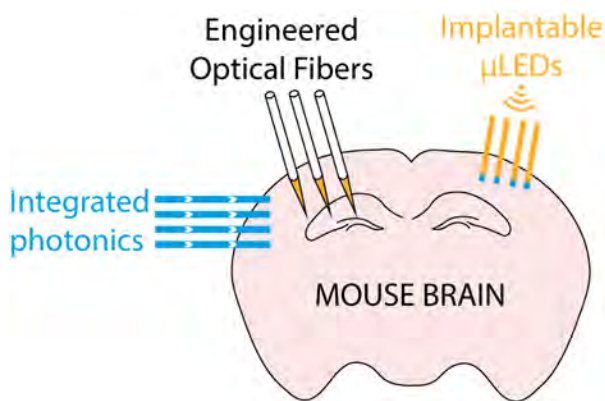


Figura 3: Classificazione in macro-categorie dei dispositivi per portare luce nel cervello. Modificata a partire da riferimento [5].

Fotonica integrata impiantabile

I sistemi impiantabili di fotonica integrata sono generalmente costituiti da vari stadi, rappresentati in Fig.4A [5]. Una sorgente luminosa (i), che tipicamente rimane fuori dal cervello, invia la radiazione luminosa ad un accoppiatore (ii) e ad un selettore (iii, switcher), che dirigono la luce verso un certo numero di guide d'onda. Queste ultime possono essere sia mono- che multi-modali, e tipicamente terminano con un elemento riflettente o diffrattivo, che ha il compito di ridirigere i fotoni guidati nel tessuto. La prima

implementazione di questo approccio risale al 2010 (Fig.4B) [6] e prevedeva di implementare i blocchi (i)-(iii) su un banco ottico, con le guide d'onda impiantabili realizzate in ossinitruro di alluminio ($SiON$) e con un rivestimento dielettrico in SiO_2/Al per limitare le perdite di propagazione. Nella zona terminale delle guide d'onda furono posizionati dei riflettori metallici, in grado di reindirizzare la radiazione a 90° rispetto all'asse ottico della guida d'onda e consentendo la realizzazione di geometrie di fotostimolazione arbitrarie, anche in tre dimensioni [7]. Negli anni successivi sono poi stati integrati dispositivi fotonici più complessi, inclusi reticoli di diffrazione per aumentare l'efficienza di accoppiamento e disaccoppiamento della radiazione (Fig.4C) [8] o reticoli a matrice di guide d'onda in grado di ridirigere lunghezze d'onda diverse nei vari canali, permettendo un'attivazione dinamica dei punti di emissione (Fig.4D) [9]. Di particolare rilevanza ed eleganza è l'approccio di Mohanty et al [10], che permette di integrare il blocco (iii) direttamente nel dispositivo impiantabile. Attraverso l'utilizzo di selettori interferometri attivabili elettricamente (electrically-driven interferometric switches, Fig.4E) è infatti possibile dirigere la radiazione in una guida d'onda piuttosto che in un'altra. I selettori sono realizzati integrando dei micro-riscaldatori che riscaldano localmente una delle due guide d'onda in una configurazione a due porte d'uscita. Il calore generato cambia l'indice di rifrazione locale e la modulazione di fase che ne risulta permette di attivare una o l'altra uscita del dispositivo. La compatibilità della fotonica integrata con tecnologie di micro e nano fabbricazione planari consente di integrare i sistemi descritti con elettrodi per la registrazione del segnale extracellulare, ma anche di ottenere dispositivi con sorgenti luminose "on-chip" (Fig.4F,G) [11, 12]. Tuttavia, i limiti principali di questo approccio sono il numero di guide d'onda che possono essere fabbricate sullo stesso dispositivo e la dimensione minima delle guide stesse, che deve essere tale da consentire un efficiente trasferimento di potenza.

Micro diodi ad emissione di luce

Nel caso dei micro-diodi ad emissione di luce (μ LED), le sorgenti luminose sono direttamen-

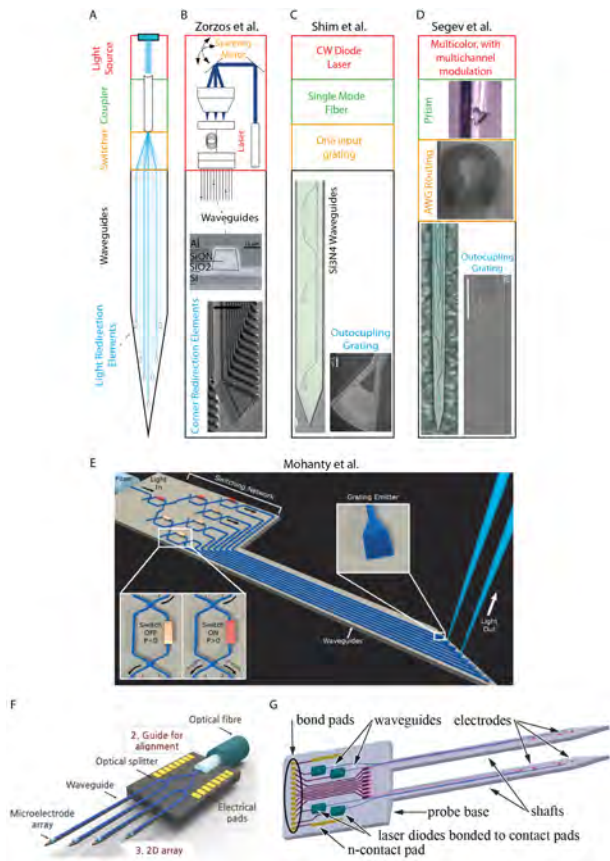


Figura 4: Interfacce ottiche basate su fotonica integrata. Riprodotta da riferimento [5].

te impiantate nel tessuto. Nel 2013 Mc Allinden et al. hanno realizzato una matrice di μ LED impiantabili in nitruro di gallio (GaN) direttamente su substrato di zaffiro [13], ottenendo fino a quattro emettitori in linea che sono poi stati impiegati per eccitare cellule nervose a diverse profondità nella corteccia cerebrale [14]. La distanza minima tra gli emettitori, che definisce la risoluzione del sistema, è definita dal profilo di emissione Lambertiano dei μ LED, che guida la disposizione spaziale dei dispositivi sul sistema impiantabile. Inoltre, benché il substrato di zaffiro garantisca alta trasparenza nel blu e rigidità d'impianto, non consente l'integrazione di elettrodi per registrare l'attività nervosa. Tra il 2015 e il 2016 due diversi lavori [15, 16] hanno superato questo limite integrando μ LED ed elettrodi su un substrato di silicio (Fig.5A-B). In alternativa all'integrazione monolitica sul substrato di fabbricazione, un approccio per ottenere μ LED impiantabili è rappresentato dal metodo pick-and-place. Gli emettitori vengono staccati dal substrato di origine e posizionati su uno strato di un altro materiale, permettendo la realizza-

zione di impianti polimerici flessibili contenenti sistemi optoelettronici attivi. Questo metodo è stato proposto nel 2013 [17], ed ha consentito di integrare oltre ai μ LED anche sensori di temperatura, elettrodi, sistemi di rilascio farmacologico e fotorilevatori [18, 19, 20] (Fig.5C-D). L'utilizzo di substrati flessibili consente di avere dei sistemi impiantabili con una rigidezza simile a quella del cervello, riducendo l'accumularsi di glia ed astrociti intorno al dispositivo. Tuttavia, il limite principale dei μ LED impiantabili rimane il calore generato dal dispositivo nel tessuto che comporta una serie di artefatti sperimentali soprattutto quando sono necessari stimoli luminosi di lunga durata [13, 17].

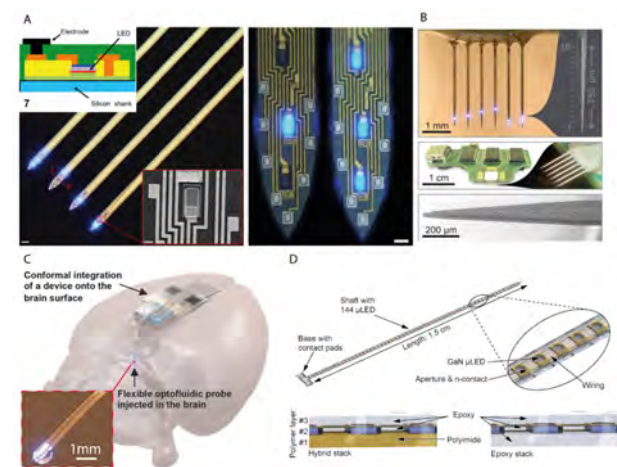


Figura 5: Sistemi basati su μ LED impiantabili. Riprodotta da riferimento [5].

Fibre ottiche ingegnerizzate

Le fibre ottiche sono state le prime guide d'onda utilizzate in esperimenti di optogenetica in vivo [21], e rappresentano ancora il metodo più comune per portare luce nel cervello. Tuttavia, l'utilizzo di una semplice fibra ottica ha una serie di limiti rispetto ai sistemi descritti nei due paragrafi precedenti: ha una dimensione superiore (diametro di circa $200\mu\text{m}$), si può interfacciare con un singolo volume di cervello relativamente piccolo, e richiede l'impianto di un sistema accessorio per il monitoraggio elettrico dell'attività cerebrale. Negli ultimi anni molti di questi limiti sono stati superati impiegando micro e nano tecnologie di fabbricazione per sfruttare le proprietà fotoniche di queste guide d'onda, aprendo

la strada ad una nuova generazione di interfacce ottiche con il sistema nervoso centrale, che possono essere catalogate come: (i) fibre ottiche polimeriche multifunzionali (FOPM) [22, 23], che possono integrare canali per iniezione farmacologica ed elettrodi per monitoraggio dell'attività nervosa, e, (ii) fibre ottiche rastremate, che sfruttano la moltiplicazione a divisione di modo per portare e raccogliere luce dal cervello con risoluzione spaziale [24, 25, 26]. Le FOPM (Fig.6A) sono costituite da vari strati di polimeri soffici, disposti in una preforma cilindrica che viene poi sottoposta ad un tiraggio ad alta temperatura per ottenere il dispositivo finale. Progettando opportunamente la geometria, la disposizione e la composizione degli strati che compongono la preforma è possibile ingegnerizzare la sezione d'impianto, ottenendo così dispositivi multifunzionali. Per esempio, nel 2017 Park e collaboratori hanno realizzato una FOPM in grado di integrare un canale per il rilascio farmacologico, delle guide d'onda e degli elettrodi per monitorare l'attività cerebrale [23]. Il dispositivo è stato poi impiantato cronicamente ed impiegato per una procedura nota come "one-step optogenetics" in cui l'iniezione del virus adenoassociato per l'espressione delle opsine, l'emissione di luce e il monitoraggio dell'attività avvengono esattamente nello stesso volume di tessuto. Un altro vantaggio importante delle FOPM è la loro natura polimerica: la bassa rigidità dell'impianto ben si confà alle proprietà meccaniche del cervello, permettendo di ridurre al minimo le reazioni tissutali avverse sul lungo termine. Tuttavia, la sezione delle FOPM risulta comparabile a quella delle fibre ottiche tradizionali, arrecando un danno da impianto cospicuo, in particolare se paragonato agli approcci basati su fibre ottiche rastremate.

Le fibre ottiche rastremate sono invece delle fibre ottiche la cui parte terminale viene affusolata per una lunghezza di qualche millimetro, con una punta di diametro inferiore ad $1\mu\text{m}$ [27]. La guida d'onda a sezione variabile conferisce al dispositivo una peculiarità importante per gli esperimenti optogenetica: man mano che il diametro si riduce, il numero di modi guidati dalla struttura diminuisce. Questo genera un'emissione graduale della luce iniettata in fibra, che può quindi essere utilizzata per portare luce lun-

go l'intera profondità di regioni funzionali del cervello di topo [25, 27]. Essendo questa emissione basata su una selezione modale, i modi guidati di ordine alto vengono emessi lontano dalla punta, mentre quelli di ordine basso più vicino ad essa. Di conseguenza, selezionando l'ordine dei modi eccitati nella guida (cambiando per esempio l'angolo di iniezione in fibra) è possibile selezionare la regione di emissione e di conseguenza il volume di cervello eccitato (Fig.6B). Quest'approccio è efficiente sia con fibre rastremate puramente dielettriche, ma anche con fibre ricoperte da metallo, che guidano la luce per confinamento metallico. In questo caso lo strato metallico viene rimosso selettivamente solo a sezioni specifiche della rastremazione, generando dei punti di emissione luminosa che possono essere attivati selettivamente variando l'angolo di ingresso in fibra [24, 28, 29]. Le fibre rastremate sono state utilizzate in vivo in animali liberi di muoversi, possono essere accoppiate a sistemi di optogenetica wireless e hanno una sezione di impianto estremamente ridotta [30, 31]. Tutte queste caratteristiche le rendono un importante complemento alle tecnologie basate su fotonica integrata e ai μLED . In aggiunta, le fibre rastremate sono state recentemente proposte per raccogliere fluorescenza funzionale con risoluzione spaziale lungo l'asse dell'impianto, sfruttando ancora una volta le proprietà di moltiplicazione e demoltiplicazione modale della rastremazione stessa. Se quest'ultima caratteristica rappresenta un vantaggio rispetto alle FOPM, l'integrazione di elettrodi e di canali di rilascio farmacologico non è ancora stata dimostrata.

Conclusioni

Le micro e le nanotecnologie combinate all'optogenetica stanno contribuendo alla nascita di una nuova generazione di dispositivi ottici per studiare il sistema nervoso centrale. Fotonica integrata, μLED s e fibre ottiche sono approcci complementari, e stanno permettendo di impostare esperimenti altrimenti impossibili con le classiche tecniche di elettrofisiologia. Queste metodologie stanno convergendo verso un'importante sfida: integrare più funzionalità all'interno dello stesso dispositivo, per ottenere una rap-

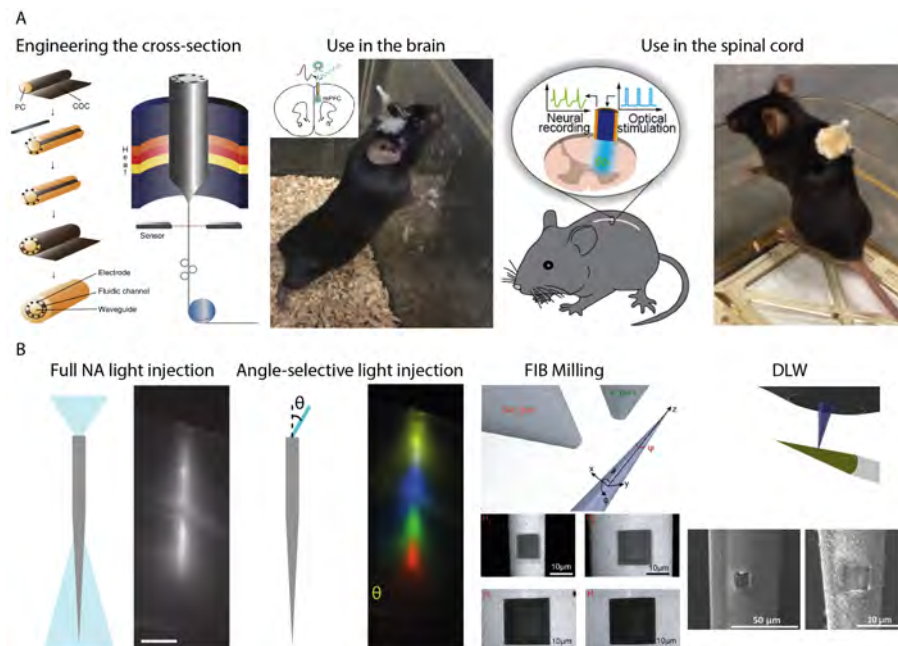


Figura 6: Fibre ottiche ingegnerizzate per il sistema nervoso centrale. Riprodotta da riferimento [5].

presentazione dinamica e ad alta risoluzione dei segnali convolti nei processi cerebrali.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il finanziamento n. 828972 nel contesto programma di ricerca e innovazione Horizon 2020 della Comunità Europea. MDV ringrazia il finanziamento n. 692643 del Consiglio Europeo delle Ricerche (ERC) nel contesto programma di ricerca e innovazione Horizon 2020 della Comunità Europea. FP ringrazia il finanziamento n. 677683 del Consiglio Europeo delle Ricerche (ERC) nel contesto programma di ricerca e innovazione Horizon 2020 della Comunità Europea



- [1] E. Y. Uc and K. A. Follett: "Deep brain stimulation in movement disorders", *Semin. Neurol.* **27** (2007) 170–182.
- [2] E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, and K. Deisseroth: "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity", *Nat. Neurosci.*, **8** (2005) 1263.
- [3] X. Han: "In vivo application of optogenetics for neural circuit analysis", *ACS Chem. Neurosci.* **3** (2012) 577–584.
- [4] X. Han: "Optogenetics in the nonhuman primate", *Prog. Brain. Res.* **196** (2012) 215–233.
- [5] F. Pisanello: "Implantable micro and nanophotonic devices: toward a new generation of neural interfaces", *Microelectron. Eng.* **215** (2019) 110979.
- [6] A. N. Zorzos, E. S. Boyden, and C. G. Fonstad: "Multi-waveguide implantable probe for light delivery to sets of distributed brain targets", *Opt. Lett.* **35** (2010) 4133.
- [7] A. N. Zorzos, J. Scholvin, E. S. Boyden, and C. G. Fonstad: "Three-dimensional multiwaveguide probe array for light delivery to distributed brain circuits", *Opt. Lett.* **37** (2012) 4841.
- [8] E. Shim, Y. Chen, S. Masmanidis, and M. Li: "Multisite silicon neural probes with integrated silicon nitride waveguides and gratings for optogenetic applications", *Sci. Rep.* **6** (2016) 6–10.
- [9] E. Segev, J. Reimer, L. C. Moreaux, T. M. Fowler, D. Chi, W. D. Sacher, M. Lo, K. Deisseroth, A. S. Tolias, A. Faraon, and M. L. Roukes: "Patterned photostimulation via visible-wavelength photonic probes for deep brain optogenetics", *Neurophotonics* **4** (2016) 011002.
- [10] A. Mohanty, Q. Li, M. A. Tadayon, G. Bhatt, E. Shim, X. Ji, J. Cardenas, S. A. Miller, A. Kepecs, and M. Lipschitz: "A Reconfigurable Nanophotonics Platform for Sub-Millisecond", *Deep Brain Neural Stimulation* **5-8** (2018).
- [11] Y. Son, H. Jenny Lee, J. Kim, H. Shin, N. Choi, C. Justin Lee, E. S. Yoon, E. Yoon, K. D. Wise, T. Geun Kim, and I. J. Cho: "In vivo optical modulation of neural signals using monolithically integrated two-dimensional neural probe arrays", *Sci. Rep.* **5** (2015) 1–11.
- [12] M. Schwaerzle, K. Seidl, U. T. Schwarz, O. Paul, and P. Ruther: "Ultracompact optrode with integrated laser diode chips and SU-8 waveguides for optogenetic applications", *Proc. IEEE Int. Conf. Micro Electro Mech. Syst.* **1029–1032** (2013).
- [13] N. McAlinden, D. Massoubre, E. Richardson, E. Gu, S. Sakata, M. D. Dawson, and K. Mathieson: "Thermal and optical characterization of micro-LED probes for in vivo optogenetic neural stimulation", *Opt. Lett.* **38** (2013) 992.

- [14] R. Scharf, T. Tsunematsu, N. McAlinden, M. D. Dawson, S. Sakata, and K. Mathieson: "Depth-specific optogenetic control in vivo with a scalable, high-density μ LED neural probe", *Sci. Rep.* **6** (2016) 1–10.
- [15] F. Wu, E. Stark, P.-C. Ku, K. D. Wise, G. Buzsáki, and E. Yoon: "Monolithically Integrated μ LEDs on Silicon Neural Probes for High-Resolution Optogenetic Studies in Behaving Animals", *Neuron*. **88** (2015) 1136–1148.
- [16] R. Scharf, T. Tsunematsu, N. McAlinden, M. D. Dawson, S. Sakata, and K. Mathieson: "Depth-specific optogenetic control in vivo with a scalable, high-density μ LED neural probe", *Sci. Rep.* **6** (2016) .
- [17] T. Kim et al.: "Injectable, cellular-scale optoelectronics with applications for wireless optogenetics", *Science* **340** (2013) 211–6.
- [18] J. W. Jeong et al.: "Wireless Optofluidic Systems for Programmable In Vivo Pharmacology and Optogenetics", *Cell*. **162** (2015) 662–674.
- [19] L. Lu et al.: "Wireless optoelectronic photometers for monitoring neuronal dynamics in the deep brain", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2018) 201718721.
- [20] E. Klein, C. Gossler, O. Paul, and P. Ruther: "High-density μ LED-based optical cochlear implant with improved thermomechanical behavior", *Front. Neurosci.* **12** (2018) 1–15.
- [21] A. M. Aravanis, L.-P. Wang, F. Zhang, L. A. Meltzer, M. Z. Mogri, M. B. Schneider, and K. Deisseroth: "An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology", *J. Neural Eng.* **4** (2007) S143–S156.
- [22] A. Canales, X. Jia, U. P. Froriep, R. A. Koppes, C. M. Tringides, J. Selvidge, C. Lu, C. Hou, L. Wei, Y. Fink, and P. Anikeeva: "Multifunctional fibers for simultaneous optical, electrical and chemical interrogation of neural circuits in vivo", *Nat. Biotechnol.* **33** (2015) 277–284.
- [23] S. Park, Y. Guo, X. Jia, H. K. Choe, B. Grena, J. Kang, J. Park, C. Lu, A. Canales, R. Chen, Y. S. Yim, G. B. Choi, Y. Fink, and P. Anikeeva: "One-step optogenetics with multifunctional flexible polymer fibers", *Nat. Neurosci.* **20** (2017) 612–619.
- [24] F. Pisanello, L. Sileo, I. A. Oldenburg, M. Pisanello, L. Martiradonna, J. A. Assad, B. L. Sabatini, and M. De Vittorio: "Multipoint-emitting optical fibers for spatially addressable in vivo optogenetics", *Neuron*. **82** (2014) .
- [25] F. Pisanello, G. Mandelbaum, M. Pisanello, I. A. Oldenburg, L. Sileo, J. E. Markowitz, R. E. Peterson, A. Della Patria, T. M. Haynes, M. S. Emara, B. Spagnolo, S. R. Datta, M. De Vittorio, and B. L. Sabatini: "Dynamic illumination of spatially restricted or large brain volumes via a single tapered optical fiber", *Nat. Neurosci.*, **20** (2017) .
- [26] F. Pisano, M. Pisanello, S. Y. Lee, J. Lee, E. Maglie, A. Balena, L. Sileo, B. Spagnolo, M. Bianco, M. Hyun, M. De Vittorio, B. Sabatini, and F. Pisanello: "Depth resolved fiber photometry with a single tapered optical fiber implant", *Nat. Methods* **16** (2019) 1185–1192.
- [27] M. Pisanello, F. Pisano, L. Sileo, E. Maglie, E. Bellistri, B. Spagnolo, G. Mandelbaum, B. L. Sabatini, M. De Vittorio, and F. Pisanello: "Tailoring light delivery for optogenetics by modal demultiplexing in tapered optical fibers", *Sci. Rep.* **8** (2018) 4467.
- [28] A. Rizzo, E. D. Lemma, F. Pisano, M. Pisanello, L. Sileo, M. De Vittorio, and F. Pisanello: "Laser micromachining of tapered optical fibers for spatially selective control of neural activity", *Microelectron. Eng.* **192** (2018) 88–95.
- [29] F. Pisano, M. Pisanello, L. Sileo, A. Quattieri, B. L. Sabatini, M. De Vittorio, and F. Pisanello: "Focused ion beam nanomachining of tapered optical fibers for patterned light delivery", *Microelectron. Eng.*, **195** (2018) 41–49.
- [30] F. Pisanello, G. Mandelbaum, M. Pisanello, I. A. Oldenburg, L. Sileo, J. E. Markowitz, R. E. Peterson, A. Della Patria, T. M. Haynes, M. S. Emara, B. Spagnolo, S. R. Datta, M. De Vittorio, and B. L. Sabatini: "Dynamic illumination of spatially restricted or large brain volumes via a single tapered optical fiber", *Nat. Neurosci.* **20** (2017) 1180–1188.
- [31] M. S. Emara, M. Pisanello, L. Sileo, M. De Vittorio, and F. Pisanello: "A Wireless Head-mountable Device with Tapered Optical Fiber-coupled Laser Diode for Light Delivery in Deep Brain Regions", *IEEE Trans. Biomed. Eng. PP* **1–1** (2018) Page.
- [32] <http://neurobyn.blogspot.com/2011/01/controlling-brain-with-lasers.html>

Massimo De Vittorio: è professore ordinario di elettronica presso il Dipartimento di Ingegneria dell'Innovazione dell'Università del Salento e direttore del Center for Biomolecular Nanotechnologies dell'Istituto Italiano di Tecnologia di Lecce. Ha lavorato per molti anni allo sviluppo di micro e nanotecnologie per la fotonica per le telecomunicazioni; più di recente sviluppa micro e nanotecnologie per il corpo umano e per l'ambiente.

Ferruccio Pisanello: ingegnere delle telecomunicazioni con un dottorato in fisica. Dopo una formazione incentrata su fotonica e ottica quantistica, dal 2012 lavora allo sviluppo di sistemi impiantabili per applicazioni di optogenetica e neuroscienze.

