La Neurotransmisión en la Unión Neuromuscular: Un Viaje Acompañado de la Microscopía Electrónica, la Inmunocitoquímica y las Neurotoxinas

Buenas tardes a todos.

Antes de adentrarme en el contenido de mi discurso de Incorporación a la Academia de Mérida, dedicaré un minuto para agradecer a los distinguidos doctores Eleazar Ontiveros Paolini y Jonás Arturo Montilva Calderón, por su generosa invitación a formar parte esta Prestigiosa Academia. De igual manera agradecer al Dr Ricardo Rafael Contreras por su gentil aceptación a ofrecer el Discurso de Contestación a mi Incorporación como Miembro Estadal Correspondiente en el Área de Las Ciencias Exactas, Naturales y Tecnológicas.

Deseo agradecer **especialmente** a mis padres: Alberto Colasante Buccella y Juven Martínez Marquina por forjar mi carácter en la disciplina y el respeto.

A mis hermanos: Gianfredy, Ugo, Manena, María Luisa y Yuly.

A mi esposa y compañera de vida, Claret, Garrido Saint Pierre y a mis hijos, Luis Alberto y César Alberto, con todo mi amor y admiración.

Dedicado a mis nietitos: Noah, Sasha y Dante Cesare

Deseo esta tarde compartir con ustedes algunos aspectos de la complejidad del sistema nervioso, centrándome en los mecanismos moleculares de la comunicación neuronal. En concreto, deseo compartir los secretos de la Neurotransmisión en la Sinapsis Neuromuscular y más específicamente, algunos de mis hallazgos —fruto de años de investigación— que han revelado la extraordinaria dinámica del reciclaje de las vesículas sinápticas»

Imaginen por un momento que están observando una gran ciudad en plena actividad. Millones de personas se mueven, se comunican, intercambian información y toman decisiones en fracciones de segundo. Esa ciudad, en esencia, es lo que ocurre dentro de nuestras mentes en este preciso instante.

El cerebro humano contiene aproximadamente 86 mil millones de neuronas, y cada una de ellas establece hasta diez mil conexiones sinápticas. Eso significa que tenemos billones de conversaciones ocurriendo

simultáneamente en nuestro cerebro, permitiéndonos estar aquí, escuchar, pensar, recordar y sentir.

Pero, ¿**cómo ocurre realmente esta comunicación? ¿Qué mecanismos moleculares hacen posible que un pensamiento viaje, que un recuerdo se forme, que un músculo se contraiga**?

La historia de la neurociencia moderna está llena de debate, de pasión y de descubrimientos que han cambiado nuestra comprensión de la vida.

En 1873, Camillo Golgi desarrolló un método de tinción que permitió visualizar las neuronas en todo su esplendor por primera vez. Golgi propuso que las neuronas formaban una red continua, una especie de "red nerviosa difusa", lo que llamó la Teoría Reticular.

Pero fue Santiago Ramón y Cajal, utilizando el mismo método de Golgi, quien observó algo diferente. Cajal vio células individuales, independientes, que se comunicaban a través de espacios entre ellas y en 1896 propuso la "Doctrina de la Neurona", estableciendo que las neuronas son unidades morfológica y fisiológicamente independientes, y que el contacto entre ellas ocurre a través de un espacio especializado: **la sinapsis**. Ambos científicos recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1906, compartiendo el escenario pero defendiendo visiones opuestas. No obstante, la historia le dio la razón a Cajal, quien hoy es considerado el padre de la Neurociencia moderna.

La sinapsis, esa palabra acuñada por el neurofisiólogo Charles Sherrington en 1897, Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1932, se convirtió en el centro de nuestra atención.

Pero, **¿cómo ocurre realmente esa transmisión sináptica? ¿Es eléctrica o química?**

En las décadas entre 1910 y 1930, Henry Dale y Otto Loewi descubrieron la "vagusstoff", hoy conocida como acetilcolina, el primer neurotransmisor identificado, demostrando que la transmisión nerviosa podía ser química. En 1936, ambos investigadores recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina.

La pregunta siguiente lógica: **¿cómo se libera el neurotransmisor?**

Hipótesis Vesicular de la Neurotransmisión

Aquí es donde la historia se hace más interesante.

En la década de 1950, los electrofisiólogos Fatt, Katz y Del Castillo del University College de Londres, observaron algo peculiar: la respuesta de la neurotransmisión en la sinapsis neuromuscular ocurre en unidades discretas, como si el neurotransmisor se liberara en "paquetes".

Simultáneamente, Eduardo De Robertis y Stanley Bennett, trabajando en la Universidad de Washington en Seatle, descubrieron, gracias a la microscopía electrónica, que los terminales nerviosos contienen una gran cantidad de nanopartículas esferoidales de cincuenta nanómetros: las vesículas sinápticas.

Bernard Katz unió estas observaciones y propuso en 1957 la Hipótesis Vesicular de la Neurotransmisión, la cual establece que las vesículas sinápticas contendrían el neurotransmisor acetilcolina y lo liberarían en paquetes discretos, en unidades "quantales" —para diferenciarlo del término quantum de la física—, mediante el proceso de exocitosis.

En 1970, René Couteaux y Monique Pécot-Dechavassine de la Universidad Sorbona de París, publicaron las primeras imágenes de microscopía electrónica que mostraban vesículas sinápticas fusionándose a la membrana presináptica en sitios específicos que denominaron "Zonas Activas". Además, demostraron que esta fusión y liberación del neurotransmisor ocurría a pocos milisegundos después de la estimulación nerviosa.

La hipótesis vesicular fue finalmente confirmada como mecanismo principal de la neurotransmisión, siendo Sir Bernard Katz galardonado con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1970.

Hacia finales de los años setenta, la mayoría de los estudios sobre neurotransmisión se realizaban mediante estimulación eléctrica o química de las preparaciones experimentales.

En 1981 me incorporé al proyecto de investigación desarrollado por el Dr. Ernesto Palacios-Prü, Director del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de Los Andes. En lugar de estimulación eléctrica o química, empleamos estimulación fisiológica: el nado forzado de peces Guppies. Queríamos entender cómo ocurre la neurotransmisión durante la actividad neuromuscular natural. La microscopía electrónica mostró una reducción progresiva del número de vesículas sinápticas y una ramificación lamelar de los terminales nerviosos, indicativos de una reorganización estructural adaptativa.

Hoy sabemos que el proceso vesicular de neurotransmisión está mediado por un complejo molecular llamado SNARE, compuesto por proteínas de la vesícula sináptica, de la membrana presináptica y del citoplasma, que interactúan bajo la señal del calcio para la liberación exocítica del neurotransmisor. Este descubrimiento fue reconocido con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 2013 a James Rothman, Randy Schekman y Thomas Südhof, y a Paul Greengard en el año 2000.

Pero, **¿qué ocurre después de la liberación exocítica del neurotransmisor? ¿Cómo recupera la neurona su maquinaria de comunicación?**

Reciclaje de las Vesículas Sinápticas

Uno de los aspectos más interesantes de la neurotransmisión es que las vesículas sinápticas no son estructuras desechables. Por el contrario, son recicladas incansablemente, manteniendo la eficiencia y continuidad de la comunicación nerviosa.

En 1992, en colaboración con Monique Pécot-Dechavassine del Institut des Neurosciences de la Université Pierre et Marie Curie, Sorbona -París VI, exploramos los procesos de exo y endocitosis utilizando técnicas de inmunocitoquímica con microscopía confocal láser y microscopía electrónica.

Nuestros estudios en las uniones neuromusculares de la rana y el ratón revelaron la existencia de múltiples rutas de reciclaje endocítico de las vesículas sinápticas, dependiendo del tipo, frecuencia e intensidad de la estimulación nerviosa:

Una vía ultrarrápida llamada "Kiss and Run" o "Beso y Huída", en condiciones normales o fisiológicas de estimulación, en la cual la vesícula sináptica se fusiona momentáneamente a la membrana presináptica, abre un pequeño poro, libera su contenido y se retira sin integrarse completamente a ésta. Es como un "beso fugaz" que permite una reposición vesicular inmediata.

Una vía más lenta, la Endocitosis Mediada por la proteína Clatrina, en la cual la vesícula se fusiona completamente a la membrana presináptica y es posteriormente recuperada mediante un proceso más elaborado, fuera de las Zonas Activas, que implica una reorganización estructural más profunda.

Y una Endocitosis Masiva o Bulk Endocytosis, luego de una estimulación prolongada o a alta frecuencia, en la cual grandes porciones de membrana presináptica son internalizadas y recuperadas como endosomas o cisternas, a partir de las cuales se forman nuevas vesículas sinápticas.

Demostramos que el reciclaje vesicular no es un proceso único ni uniforme. Es altamente dinámico y organizado, dependiendo de la intensidad y el tiempo de estimulación. Demostramos que el terminal presináptico posee mecanismos adaptativos que le permiten mantener la eficacia de la transmisión neuromuscular. Este hallazgo enriqueció la comprensión de la fisiología sináptica y abrió nuevas vías para entender la plasticidad neuronal.

Seguidamente, en colaboración con el grupo de investigación de William Van der Kloot, de la Universidad del Estado de Nueva York, Stony Brook, aportamos evidencias sobre dos aspectos fundamentales del ciclo vesicular: el reciclaje eficiente de vesículas sinápticas y la variabilidad en el contenido quantal según el tamaño vesicular. Estos hallazgos son fundamentales para la neurociencia celular, ya que amplían la comprensión de cómo las sinapsis mantienen su eficacia y se adaptan a las demandas cambiantes del sistema nervioso.

Neurotoxinas como Sondas Moleculares

Con el fin de profundizar en los mecanismos de fusión y reciclaje de las vesículas sinápticas, utilizamos herramientas extraordinarias que nos provee la naturaleza: **Las neurotoxinas**.

Estas sustancias tóxicas, que interfieren en la comunicación neuronal, se convirtieron en nuestras "sondas moleculares" para desmontar y comprender la maquinaria sináptica. Dos en particular nos ofrecieron información invaluable: la toxina tetánica y la toxina botulínica.

La toxina tetánica, que produce una parálisis espástica, ingresa a través de la unión neuromuscular, viaja retrógradamente por el axón hacia la médula espinal e impide el ensamblaje del complejo SNARE y, por ende, bloquea la liberación de los neurotransmisores inhibitorios GABA y glicina. El resultado: contracciones musculares incontrolables, hasta inducir fallo respiratorio.

En colaboración con el grupo de Philippe Brulet del Instituto Pasteur de París, construimos una proteína de fusión no tóxica y fluorescente, utilizando la porción no catalítica de la toxina tetánica unida a la proteína fluorescente verde. Esta herramienta nos permitió rastrear con una resolución sin precedente el recorrido de la toxina tetánica desde la unión neuromuscular hasta el sistema nervioso central.

Descubrimos que, pocos minutos después de la inyección intramuscular en ratones, la toxina ingresa entre las Zonas Activas e induce la formación de profundas invaginaciones de la membrana presináptica, asociadas a la proteína clatrina, demostrando que la Endocitosis Mediada por Clatrina y la Endocitosis Masiva tienen lugar en dominios yuxtapuestos a los sitios de liberación del neurotransmisor. Además, visualizamos que estas vesículas cargadas con la toxina tetánica utilizan el sistema de transporte axonal retrógrado para comunicar el sistema nervioso periférico con la médula espinal.

La toxina botulínica es la toxina más potente de la naturaleza. A diferencia de la tetánica, ésta produce una parálisis flácida, que lleva también a fallo respiratorio, pero con mecanismos fisiopatológicos opuestos. La toxina botulínica también impide la formación del complejo molecular SNARE de la neurotransmisión, pero en este caso bloquea la liberación de la acetilcolina a nivel de la unión neuromuscular.

En colaboración con los grupos de Cesare Montecucco de la Universidad de Padua en Italia, y de Jordi Molgó del Centro Nacional de Investigaciones Científicas CNRS-Francia construimos otra proteína de fusión: la porción no tóxica de la toxina botulínica y la proteína fluorescente verde.

Los resultados fueron sorprendentemente diferentes: la toxina botulínica ingresa al terminal axónico exclusivamente a través de las Zonas Activas, confirmando que aprovecha el ciclo de exo-endocitosis vesicular rápido del tipo "Kiss and Run", que está acoplado directamente a la liberación de acetilcolina.

Comparando los resultados obtenidos con ambas toxinas, podemos concluir que el reciclaje vesicular no es un proceso único. Esta diversidad de estrategias refleja una presión evolutiva diferencial y demuestra que el terminal presináptico no es un simple repetidor de señales, sino un centro de procesamiento dinámico que recicla vesículas a través de múltiples vías según la demanda y modula su contenido para ajustar su función.

Y... **¿por qué es importante todo esto?**

Permítanme ahora establecer un puente entre estos mecanismos moleculares y aspectos profundamente humanos: nuestra capacidad de memoria y aprendizaje, así como nuestra vulnerabilidad a enfermedades neurodegenerativas devastadoras. La transmisión sináptica es el sustrato físico de nuestra identidad. Cada recuerdo o aprendizaje es un patrón de conectividad sináptica reforzada. Cada emoción que experimentamos

depende de cambios duraderos en la eficacia sináptica, fenómeno conocido como plasticidad sináptica.

Los mecanismos que hemos descrito —reciclaje vesicular, variabilidad del contenido vesicular, dinámica de las zonas activas— son los engranajes moleculares que permiten que una sinapsis se fortalezca o debilite con la experiencia.

En condiciones normales, la proteína tau, clave en la formación de la memoria, se encuentra asociada a los microtúbulos, promoviendo el ensamblaje y estabilización de la estructura del citoesqueleto necesaria para el transporte axonal. Este transporte es vital para la sinapsis, ya que los terminales presinápticos dependen del flujo continuo de mitocondrias, vesículas cargadas de neurotransmisores y proteínas del complejo SNARE que deben ser sintetizadas en el cuerpo neuronal.

Pero **cuando algo falla**, las consecuencias son graves.

En la enfermedad de Alzheimer, la acumulación del péptido beta-amiloide y/o de la proteína tau hiperfosforilada altera el tráfico vesicular, la dinámica de las zonas activas y la disponibilidad de las proteínas SNARE, provocando disfunción en la liberación de neurotransmisores y pérdida de plasticidad sináptica. La proteína tau hiperfosforilada adquiere la capacidad de atravesar las membranas mitocondriales e interactuar directamente con la cadena respiratoria, generando especies reactivas de oxígeno y reduciendo la producción de energía. Se establece así un círculo vicioso entre la patología tau, el daño mitocondrial y, en última instancia, el deterioro de la función neuronal, conducente a la degeneración y pérdida de la comunicación nerviosa.

En la enfermedad de Parkinson, la proteína alfa-sinucleína, que regula la fusión y el reciclaje de las vesículas sinápticas, se agrega patológicamente, secuestrando componentes del complejo SNARE y alterando la endocitosis mediada por clatrina, llevando a una disminución de la liberación de dopamina en los sistemas nigro-striado, mesolímbico y mesocortical.

En la Esclerosis Lateral Amiotrófica, el transporte axonal retrógrado se ve comprometido y el reciclaje vesicular en la unión neuromuscular se desregula, contribuyendo a la atrofia muscular y parálisis.

Lo que deseo enfatizar es que la disfunción en la exo-endocitosis y el reciclaje de las vesículas sinápticas no es un evento aislado, sino el eslabón funcional que traduce la neuroinflamación y el daño metabólico neuronal y glial en una pérdida precoz de la conectividad neuronal.

Comprender cómo modular las vías de endocitosis podría permitirnos diseñar estrategias para proteger las sinapsis en etapas tempranas de neurodegeneración, antes de que la muerte neuronal sea irreversible.

Perspectivas Futuras y Reflexión Final

El conocimiento adquirido sobre el reciclaje vesicular, las neurotoxinas y la plasticidad sináptica abre horizontes prometedores en la biomedicina.

Imaginemos neuroprótesis que integren estos conocimientos para reparar conexiones dañadas. **Pensemos** en la medicina personalizada para trastornos psiquiátricos, basada en el perfil de reciclaje vesicular de cada paciente. **Visualicemos** estrategias neuroprotectoras que utilicen el fragmento no tóxico de la toxina tetánica que construimos, como vehículo de entrega selectiva para transportar factores neuroprotectores al sistema nervioso central.

El cerebro humano, con sus 86 mil millones de neuronas y sus billones de sinapsis, es el objeto más complejo del universo conocido. Cada descubrimiento sobre la sinapsis es un paso hacia entender quiénes somos, cómo pensamos, cómo recordamos, cómo amamos, cómo soñamos y cómo envejecemos.

Cada experimento, cada imagen obtenida al microscopio, nos acerca un poco más a comprender el milagro de la comunicación neuronal.

Cuando comencé este viaje, no podía imaginar la profundidad y belleza de los mecanismos que estábamos desentrañando, los cuales moldean la manera en que se tejen nuestros recuerdos y se deshacen en la enfermedad neurodegenerativa.

Hoy me siento **profundamente agradecido** por este viaje. **A mis** mentores, a mis colaboradores alrededor del mundo y **a ustedes**, por permitirme compartir esta historia.

Recordemos siempre que la ciencia trasciende la mera acumulación del conocimiento; cobra su sentido último al divulgarla, al encender la chispa en las nuevas generaciones y al tejer puentes invisibles entre disciplinas y culturas. Al fin y al cabo, la ciencia es — en la inspiradora visión de Don Santiago Ramón y Cajal— el arte de interrogar a la naturaleza guiados por la **curiosidad, el rigor y la pasión**.

Señores