

INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN CHILE: APRENDIZAJE EN 48 AÑOS DE DIÁLOGO CON LAS PLAQUETAS^a

DR. DIEGO MEZZANO ABEDRAPO^b
Académico Honorario

BIOMEDICAL RESEARCH IN CHILE: LEARNING IN 48 YEARS OF DIALOGUE WITH PLATELETS

Abstract

Biomedical research in Chile is necessary, it positions us at the limit of knowledge and improves the quality, accreditation and ranking of the academic institutions where it is developed. Its financing requires the political commitment regarding its importance for our country and of academic institutions to create a protective microenvironment for its flourishing. Private companies have consistently increased their contribution to R&D, but understandably, with a smaller presence in biomedicine. Specific competencies of the investigators may be highly useful and decisions regarding introduction of new products and technologies in clinical and laboratory grounds. Despite the remoteness of the major research centers, our work will be relevant if we overcome our objective limitations with creativity and extra effort. These include available resources, considering that the fraction of GDP budget for R&D in OCDE countries is 8 times higher than ours; proficiency in English language is a major problem for many of us; establishing trusting relationships with leading researchers in the field is a pre-requisite to grant our insertion in major scientific societies and for creating international collaborations; eagerly evaluate and use the transiently open windows for research; use the benefits of comparative advantages or unique conditions in Chile that enhance the originality of our studies; as physicians, we have privileged access to patients for descriptive or mechanistic studies, including technical advantages, lower cost, and higher appraisal in scientific journals. We will expand on these considerations in our presentation.

Keywords: Biomedical Research; Human platelets; Investigative techniques.

^a Conferencia de incorporación como Académico Honorario de la Academia Chilena de Medicina, pronunciada en sesión pública y solemne realizada el 13 de septiembre, 2023.

^b Profesor titular, Departamento de Hematología-Oncología, Escuela de Medicina, P. Universidad Católica de Chile. Email: dmezzano@med.puc.cl

Resumen

La investigación biomédica en Chile es necesaria, nos posiciona en el límite del conocimiento y mejora la calidad, acreditación y ranking de las instituciones académicas donde se desarrolla. Su financiamiento requiere convicción y compromiso del Estado por su importancia para el desarrollo, y de las instituciones académicas crear un microambiente protector para su ejecución. La empresa privada ha aumentado consistentemente su aporte a I&D, pero comprensiblemente, con menor presencia en biomedicina. Las competencias específicas del investigador son útiles en la introducción de nuevos productos y tecnologías en áreas clínicas y de laboratorio. A pesar de la lejanía de los centros mayores de investigación, nuestro trabajo será relevante si superamos nuestras limitaciones objetivas con creatividad y esfuerzo extra. Entre ellas los recursos considerando que la OCDE tiene un gasto-país en I&D 8 veces mayor que el nuestro; manejar razonablemente el idioma inglés es un problema mayor para muchos de nosotros; establecer relaciones de confianza con los investigadores líderes es un prerequisite para insertarnos activamente en las sociedades científicas mayores y establecer colaboraciones internacionales; reconocer y usar las ventanas que se abren transitoriamente para la investigación; aprovechar ventajas comparativas o condiciones únicas en Chile que favorezcan la originalidad de nuestros estudios; los médicos tenemos acceso privilegiado a plaquetas humanas para estudios descriptivos o mecánicos, incluyendo ventajas técnicas, menor costo y mayor valoración en las revistas científicas. Nuestra presentación ejemplificará estas consideraciones.

Palabras clave: Investigación biomédica; Plaquetas humanas; Técnicas investigativas.

INTRODUCCIÓN: IDEAS GENERALES

Existe amplio consenso en que el desarrollo de investigación científica se justifica plenamente en nuestro país y aquella ejecutada en ambientes académicos universitarios, tan propios de la Medicina, constituye un importante determinante de la calidad, acreditación institucional y ranking de las universidades. Lo anterior es válido para todas las ramas del saber, pero nos enfocaremos en el área de la biomedicina con ejemplos adquiridos haciendo investigación en ambientes académicos.

La investigación produce nuevo conocimiento, pero también confirma/refuta el saber previamente adquirido. Con frecuencia, el lenguaje anglosajón denomina al conocimiento prevalente con el oxímoron “current dogma”, asumiendo lo efímero de una verdad que será superada o complementada por nuevo conocimiento, mediante el ejercicio dialéctico del método científico. Reconociendo esta transitoriedad, la lectura crítica de toda publicación, incluso en las revistas de mayor impacto, debiera incluir cierta dosis de escepticismo y también de intuición para preguntarse por la verosimilitud del nuevo estudio. Un ejemplo se presenta en el punto N° 6.

Teóricamente, cualquier investigador en la vanguardia de su especialidad puede

aportar con nuevo conocimiento y mejor comprensión de su área. A la vocación, capacidad, liderazgo, esfuerzo y originalidad deben asociarse otras cualidades para que la calidad y magnitud de su aporte a la disciplina alcance relevancia. Entre otras, la importancia y apoyo del Estado para la actividad científica, la convicción y estímulo institucional a la investigación, la habilidad para capturar financiamiento privado, la masa crítica de investigadores en cada disciplina, la competitividad y adecuado financiamiento de los proyectos, aceptar que la investigación retribuye materialmente menos que el ejercicio privado de la medicina, detectar y aprovechar oportunidades, reconocer y desarrollar estudios en tópicos que importen ventajas comparativas para el investigador y el país, aumentar la productividad mediante la interacción intra- e interinstitucional y la inserción y colaboración con pares internacionales, seleccionar colaboradores idóneos y estimular el buen ambiente laboral en los equipos de investigación. Si la Academia me ha honrado con mi incorporación a ella, debo destacar que sin la compañía y trabajo conjunto y apoyo mutuo con el Dr. Jaime Pereira en la clínica, laboratorio diagnóstico y en el desarrollo de ideas de investigación y su concreción, probablemente no estaría yo escribiendo este testimonio.

Progresivamente aumentan los investigadores no-médicos, mayoritariamente PhD's compitiendo en proyectos de biomedicina, escenario que décadas atrás era cooptado por médicos. Esto ha estimulado la creación y desarrollo de programas de doctorado en Ciencias Médicas con dedicación exclusiva o protegida de los médicos a la investigación.

Chile está fuera de los circuitos mayores de investigación biomédica, redes de colaboración y formación de investigadores. Un dato de la causa es que la investigación procedente de EE.UU, Canadá, Japón y países europeos es generalmente más valorada que la nuestra: su productividad, densidad de citas, frecuencia de lectura, magnitud del financiamiento y amplitud y organización de los laboratorios son insoslayablemente superiores. Esto limita el desarrollo de investigación competitiva, pero a la vez estimula nuestra inserción creativa en esos ambientes, catalizando así la productividad y calidad de nuestro trabajo. Históricamente, la formación de nuestros académicos con vocación incluye becas de investigación financiadas por instituciones locales o externas en aquellos países. Estos programas son generalmente exitosos durante su ejecución, pero con grandes desafíos a su vuelta en Chile: ¿cómo prolongar acá el impulso adquirido?, ¿cómo mantener la relación con mentores o interlocutores externos y vincularlos en nuestro trabajo?, ¿cómo aportar mayor originalidad en la disciplina escogida detectando y agregando ventajas comparativas propias de Chile? ¿cuándo usar el conocimiento y habilidades adquiridas para implementar nuevas líneas de investigación en nuestros países? Y si las dificultades son mayores y los resultados pobres, ¿por qué no optar por la Medicina clínica y su mayor retribución material? Ilustraré ejemplos relacionados a los comentarios anteriores.

EJEMPLOS

1. La colaboración permite disimular nuestras desventajas materiales

El gasto en investigación y desarrollo en Chile a Junio de 2022 era de 0,34% del PIB, 8 veces menor que el promedio de la OCDE (2,68%), cuyo PIB es bastante mayor que el nuestro. Ajustarse a estos números supone un ejercicio notable de creatividad y credibilidad de nuestro trabajo. Presentar sus resultados en congresos internacionales es fundamental para discutirlos con los pares y visibilizarse ante ellos. Del contacto personal nace la confianza, cuyo paso siguiente es la colaboración. En nuestra experiencia, ésta se ha expresado en revisión conjunta de resultados, diseño de experimentos, visitas a nuestro laboratorio e, importantemente en el traspaso de valiosos reactivos y anticuerpos cuyo costo sería imposible solventar con nuestros proyectos.

2. Privilegiar la investigación en seres humanos

La formación médica otorga una ventaja competitiva para efectuar estudios clínicos o experimentales en pacientes o voluntarios, apreciado por las revistas científicas, que exigen que el título de un trabajo consigne la especie estudiada; además, los hallazgos en animales no pueden ser extrapolados automáticamente a los humanos sin confirmación.

El relato siguiente es informativo al respecto. Entre 1960 y hasta bien entrados los 80's, el "current dogma" estipulaba que las plaquetas de mayor densidad y tamaño eran "plaquetas jóvenes" recientemente liberadas desde la médula ósea y que envejecían en la circulación perdiendo constituyentes propios. Así, devenían en plaquetas "exhaustas", más pequeñas y livianas, removidas y reemplazadas por nuevas plaquetas en 7 a 10 días. Dos autores de laboratorios independientes acumulaban 25 publicaciones sobre este tema, más las provenientes de una pléyade de otros centros. Sin excepción, todos estos trabajos fueron realizados en animales (ratas, conejos, simios).

Mi interés en este tema nació en Chile en 1975 desarrollando estudios de cinética plaquetaria en clínica. Como proyecto para un "Research Fellowship" en el Milwaukee Blood Center (1978-1980) propuse a mi tutor (Richard H. Aster, M.D.) confirmar en seres humanos los hallazgos previos publicados en animales.

Nuestros resultados resumidos en la Figura 1, muestran que el tamaño de las plaquetas circulantes no tiene relación con su edad, y que en contraste con la evidencia prevalente, aumentan su densidad durante su vida útil en la circulación⁽¹⁾. Posteriormente, se reportó que fisiológicamente las plaquetas incorporan proteínas del plasma por endocitosis o pinocitosis en sus gránulos α (ej, IgG, fibrinógeno, albúmina, factores de la coagulación) o ligan en su membrana otras proteínas plasmáticas⁽²⁾. Esta captura de proteínas plasmáticas de alto PM por las plaquetas optimiza su capacidad hemostática o inflamatoria, pero también explica su aumento de densidad específica y descarta la hipótesis

de su agotamiento funcional por envejecimiento en circulación. En consecuencia, esta polémica no sólo se refería al tamaño y densidad específica de las plaquetas circulantes, sino era esencial para dilucidar aspectos importantes de su fisiología.

Esta experiencia valoriza los estudios en seres humanos y nos enseña cómo una hipótesis, racionalmente intachable, no se puede probar con resultados inexactos o mal interpretados. Además, ¿cómo explicar que dichas observaciones se expandan durante 2 décadas sin ser desafiados siguiendo el “principio de autoridad” del investigador inicial! Más de 4 décadas después, nuestros resultados no han sido refutados.

3. Cómo una correcta interpretación de los resultados puede revertir una hipótesis errónea

La serotonina de sangre periférica, independiente de la monoamina cerebral, proviene de las células entero-cromafines del tracto digestivo, se secreta posingestión de

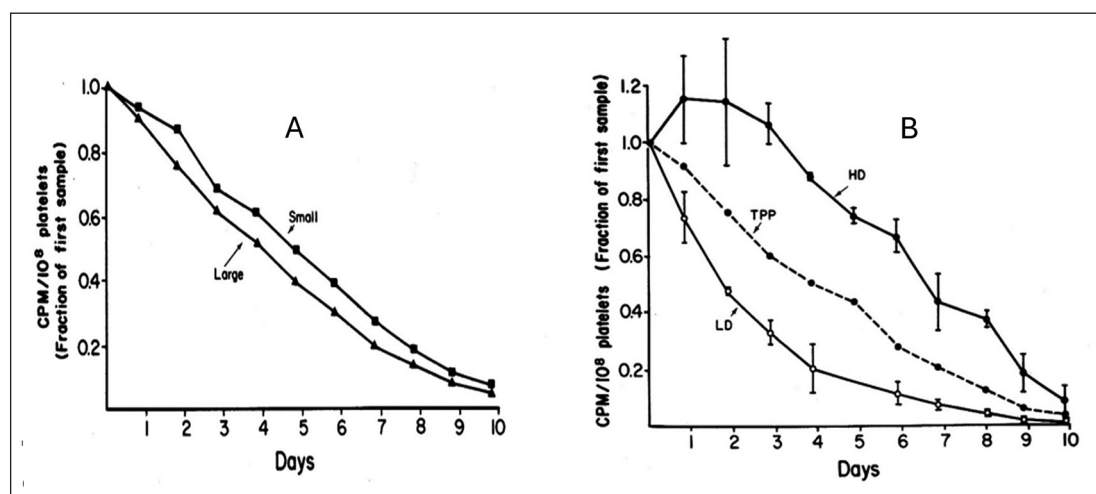


Figura 1. Sobrevida en la circulación de plaquetas de volumen grande y pequeño y de alta y baja densidad. En (A) se inyectan secuencialmente en un mismo sujeto plaquetas grandes y pequeñas marcadas con ^{51}Cr . El decaimiento diario de la radioactividad es similar en ambas poblaciones y sigue una función lineal, propia de plaquetas removidas de la sangre por un proceso de senescencia. No hay diferencia en la sobrevida promedio de ambas poblaciones. (B) Se inyecta una población total de plaquetas marcadas con ^{51}C (TPP), seguida de la extracción de una muestra diaria. En ésta, se cuenta la radioactividad en cuentas por minuto (cpm) cuyo decaimiento en la sangre sigue una función como en (A). Además, en todas de las muestras se usa gradiente de densidad para aislar las plaquetas densas (HD) y livianas (LD), contando las cpm en cada una. Sorprendentemente, durante los primeros 3 días aumenta el conteo en las fracciones HD junto a un rápido decaimiento de las cpm en LD. Este fenómeno se explica porque las plaquetas LD aumentan su densidad en la circulación y pasan a la fracción de HD. Se observa una significativa mayor sobrevida de las plaquetas HD circulantes. (Figura adaptada de Am J Hematol 1984; 17:11-21).

alimentos y produce aumento de la motilidad intestinal. La monoamina en exceso fluye a la circulación venosa y portal y es ávidamente incorporada por las plaquetas, compitiendo con los endotelios hepático y pulmonar, que la desactivan por acción de la monoamino oxidasa (MAO)⁽³⁾. Así, no hay serotonina libre en el plasma y toda la circulante es transportada por las plaquetas en sus gránulos densos. Nuestros estudios en seres humanos y caninos confirmaron nuestra hipótesis que la serotonina aumenta en los gránulos densos a medida que las plaquetas envejecen en la circulación^(4,5), pero este aumento no se relaciona con la densidad de las plaquetas, como habíamos propuesto. La serotonina tiene un peso molecular (PM) de 0,176 kDa y se almacena en gránulos densos, los organelos de mayor densidad en las plaquetas. Sin embargo, el bajo PM de la monoamina no influye en su densidad, especialmente si se compara con el PM de proteínas incorporadas por las plaquetas (ej., fibrinógeno, de PM > 340 kDa).

Por tanto, si bien acertamos en demostrar que las plaquetas humanas circulantes van aumentando de densidad, este aumento no es determinado por la serotonina incorporada en gránulos densos.

4. Aprovechar las ventajas comparativas de nuestro subdesarrollo... (antes del Cólera)

El papel de las plaquetas en las septicemias ha sido extensamente abordado, aunque sin respuestas concluyentes por múltiples razones: entre ellas, muchas morbilidades concomitantes (cirugía, quemaduras, diabetes mellitus, infecciones gineco-obstétricas, quimioterapias, fallas inmunitarias, etc); edad; identidad y patogenicidad de las bacterias involucradas; evolución rápidamente cambiante de la septicemia (ej., presión arterial, equilibrio hidrosalino y ácido-base, hipoxemia, daño endotelial, función renal); etapa de evolución de la sepsis; edad, etc.

En este sentido, la fiebre tifoidea nos pareció una enfermedad ideal para estos estudios: endémica en Chile hasta 1991, anualmente afectaba a miles de individuos previamente sanos y predominantemente jóvenes; la bacteria responsable es única y bien identificada y la sepsis tiene curso predecible y etapas identificables. Además, la enfermedad tiene casi nula presencia en los países llamados del primer mundo y no se estudiaba en países como el nuestro. Por tanto, nuestro estudio sobre el defecto hemostático y participación de las plaquetas en esta enfermedad era original, relevante y exclusivo.

Resultados iniciales indicaron que la fiebre tifoidea cursa típicamente con inflamación sistémica y coagulación intravascular diseminada subclínica, incluyendo activación de la coagulación, fibrinólisis, daño funcional de las plaquetas, además, de disfunción endotelial y estrés oxidativo. Estas alteraciones remiten luego del tratamiento. Sin embargo, el proyecto abortó tempranamente por la llegada del cólera a Chile en 1991. La autoridad sanitaria diseñó un brillante y exitoso programa de política pública eliminan-

do la epidemia que afectó a ± 500 pacientes con 0,2% mortalidad. Se eliminó también aquella endemia centenaria con miles de enfermos/año y mortalidad de 0,7%. En 1992 no hubo pacientes con esta enfermedad en el Hospital de Infecciosos Lucio Córdova.

¡Así, se esfumó nuestra ventaja competitiva!

5. Necesidad de adaptación y otra ventaja comparativa del subdesarrollo

Cambiamos el foco al estudio del defecto hemostático en la uremia. Antes de la introducción de la diálisis los pacientes con insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) fallecían por hemorragias digestivas o infecciones sistémicas. La causa del sangrado se atribuía a alteraciones de la función plaquetaria, que nunca fueron convincentemente identificadas ni se conoció tratamiento efectivo para tratarlo. Era frecuente encontrar revisiones sobre “*Uremic Bleeding*”. Durante los 80’s, este interés ya no fue tema de investigación. En contraste, tempranamente en los países que instauraron la hemodiálisis se observó que los pacientes en esos programas desarrollaban ateromatosis acelerada y morían mayoritariamente de trombosis arterial (ej. infarto cerebral, coronario).⁶

A principios de los 90’s, no teníamos en Chile el programa GES (Garantías Explícitas de Salud) de diálisis y la enfermedad seguía su curso natural en la mayoría de los pacientes sin tratamiento específico. Pudimos así comparar los defectos hemostáticos en la uremia al comienzo y en la etapa final de la enfermedad. Interesantemente, encontramos inflamación sistémica, disfunción endotelial, estrés oxidativo y activación de la coagulación y fibrinólisis, que estaban correlacionados y explicaban el defecto sobre las plaquetas⁷ y las hemorragias. En este contexto, demostramos que el ácido tranexámico, un inhibidor de la fibrinólisis, mejoraba el tiempo de sangría y la función plaquetaria.⁸ ¿Cómo explicar que una misma enfermedad, la IRC, se asocie a hemorragias en su estado terminal y a trombosis arterial en los pacientes en diálisis crónica? Una explicación se muestra en la Figura 2.

Nuevamente, estos estudios se llevaron a cabo aprovechando las ventajas de nuestro menor desarrollo y aprendimos que la vocación por el trabajo de investigación se prueba abriendo una nueva puerta cuando se cierra la que nos tenía ocupados, sea por causas externas, no controlables (el cólera) o porque no tuvimos éxito en el intento anterior.

6. Usar la intuición para identificar lo improbable.

La homocisteinuria es un defecto hereditario muy infrecuente del metabolismo de la cisteína, con niveles plasmáticos de Hcy >100 o $200 \mu\text{M L}^{-1}$. Los pacientes fallecen tempranamente con ateromatosis extensa y trombosis arterial. En los años 90’s ganó aprecio la idea que la concentración de homocisteína (Hcy) en el plasma estaba directamente relacionada con trombosis arterial (infarto cerebral, cardíaco). En 1976 Wilcken y Wilc-

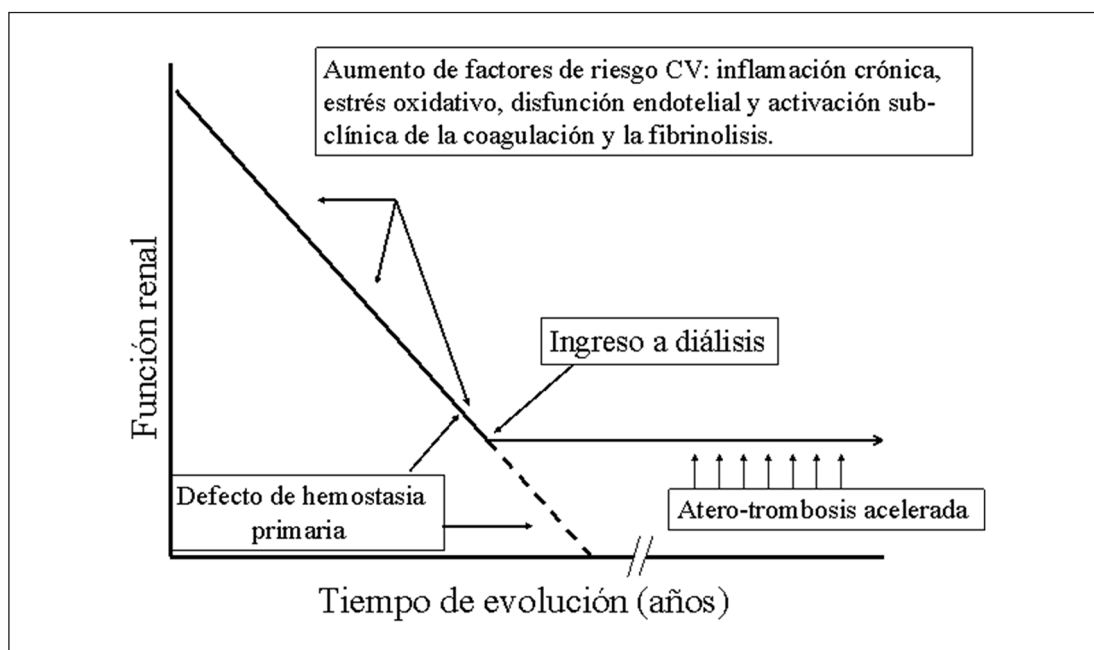


Figura 2. Insuficiencia Renal Crónica Terminal en hemodiálisis, hemostasia y riesgo cardiovascular. En la IRC los factores de riesgo cardiovascular aumentan precozmente en el curso de la enfermedad, y no cambian cuando el paciente entra a programa de hemodiálisis crónica. Estos factores de riesgo determinan la ateromatosis acelerada que sufren estos pacientes y la trombosis arterial. El deterioro rápido de la función renal cuando la enfermedad sigue su curso natural sin tratamiento dialítico descubre el defecto de hemostasia primaria y las hemorragias como causa mayor de muerte precoz en estos pacientes.

ken publicaron en J Clin Invest que pacientes con enfermedad coronaria demostrada por angiografía ($n = 25$) tenían aumento de la Hcy plasmática respecto a controles con coronarias sanas ($n = 22$). Los valores promedio en ambas ramas eran $< 20 \mu\text{M L}^{-1}$ y sus diferencias eran marginales. El título sugería que el metabolismo anormal de la cisteína estaba involucrado en la patogenia de la enfermedad coronaria, pero la información proporcionada era incompleta, el número de pacientes escaso y había gran superposición de los resultados entre pacientes y controles. Sin embargo, el trabajo dio pie para una explosión de interés y estudios sobre el tema. Se postuló que el aumento de Hcy también estaba relacionado con trombosis venosa y la medición de Hcy se incorporó en laboratorios internacionales al panel de estudio de trombofilia.

Como ya se sabía que en la IRC cursa con aumento de la Hcy plasmática bastante mayor que el reportado en enfermedad coronaria, exploramos en pacientes en hemodiálisis su relación con los otros factores de riesgo cardiovascular. La concentración de Hcy en plasma de 64 pacientes ($27,1 [6,5-118] \mu\text{M L}^{-1}$) vs 40 controles ($8,4 [5,0-18] \mu\text{M L}^{-1}$) era muy significativa ($p < 0,0001$). Observamos que los factores de riesgo cardio-

vascularenumerados arriba (activación de la hemostasia, estrés oxidativo, disfunción endotelial e índices de activación de la coagulación/fibrinólisis) correlacionaban con marcadores de inflamación, pero no con Hcy en el plasma⁽⁹⁾ (Figura 3). Actualmente, el interés por la Hcy plasmática y su relación con trombosis están muy reducidos y yano se recomienda medir Hcy en el perfil de hipercoagulabilidad.

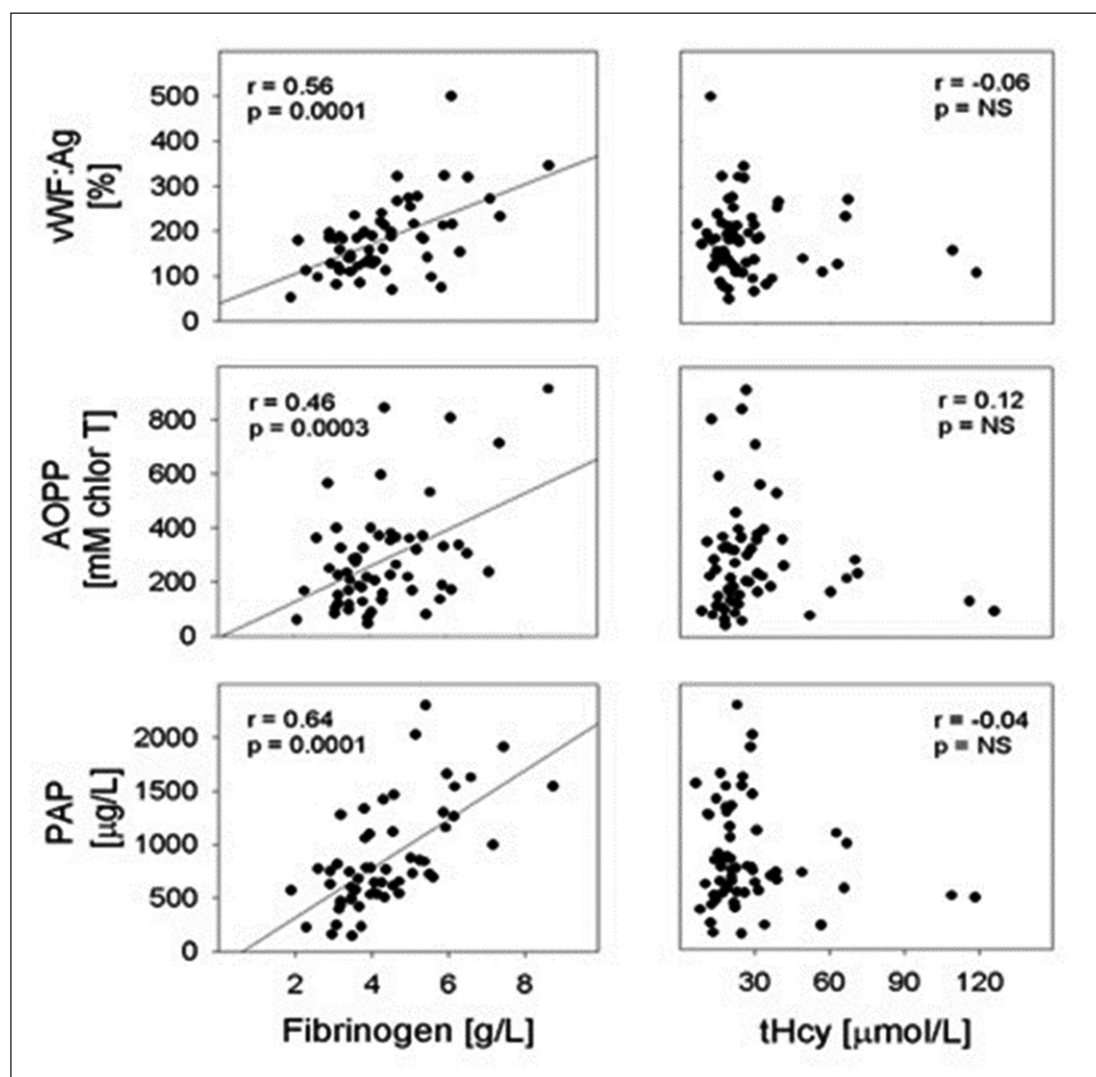


Figura 3. Correlación entre marcadores de inflamación sistémica y homocisteína plasmática en pacientes en hemodiálisis. Los significativos aumentos de tHcy y fibrinógeno (proteína inflamatoria y de la coagulación) en la IRCT no se correlacionan entre sí. Igualmente, no se observa correlación de la tHcy con marcadores de hemostasia primaria (vWF, factor von Willebrand) de estrés oxidativo (AOPP, productos proteicos de oxidación avanzada) y marcador de la fibrinólisis (PAP, complejo plasmina-antiplasmina). El fibrinógeno sí está fuertemente correlacionado con estos marcadores. (Figura levemente modificada de Mezzano, D. et al. *KidneyInt*2001; 60(5):1844-5).

De este estudio aprendimos que la publicación de resultados negativos puede ser una contribución importante al conocimiento y que la lectura crítica y con dejo de escepticismo acerca de un trabajo científico permite desafiar sus resultados con nueva información y modelos experimentales

7. Investigación financiada por la industria. Dieta mediterránea, vino tinto y hemostasia

La participación en investigación biomédica financiada por la industria o las empresas, exceptuando donaciones ciegas o desinteresadas y ensayos clínicos adecuadamente registrados y autorizados es especialmente delicada y debe considerar problemas éticos y conflictos de interés. Afortunadamente se ha ido consensuando las recomendaciones para su práctica establecidas por las Sociedades Científicas, Universidades y también respaldada por la Academia Chilena de Medicina. La propiedad y la decisión de uso de los resultados de este tipo de estudios, ej., comunicación en congresos, publicación, debe quedar al arbitrio del investigador principal.

Participamos en una investigación de este tipo relativa al efecto de las dietas mediterráneas y occidentales, con y sin vino tinto. Toda la organización del proyecto con varias ramas e interacción con los donantes (industria chilena del vino) la llevó el Profesor, Dr. Federico Leighton (1937-2012), quien delegó en mí el estudio de la rama que estudiaba los efectos sobre las plaquetas y la coagulación de la sangre. El concepto de “paradoja francesa”, acuñado por los Drs. S. Renaud y M. de Lorgeril⁽¹⁰⁾, atribuía al consumo moderado de vino tinto por los franceses la notable menor incidencia de enfermedad coronaria e infarto miocárdico comparado con EE.UU. Y esto considerando que la ingesta grasa de los franceses era igual o mayor que la de los estadounidenses.

No confirmamos que la suplementación de la dieta con vino disminuyera la función plaquetaria, como se describía entonces. Tampoco que tuviera un efecto significativo sobre los factores de la coagulación que no hubieran sido reportados previamente⁽¹¹⁻¹³⁾.

En todos estos estudios tuvimos la libertad y el apoyo del Investigador principal y ninguna objeción de la industria para la publicación de sus resultados.

8. Investigación clínica: Buscando bajo la alfombra

El síndrome de sangrado mucocutáneo hereditario (epistaxis, equimosis, menorragia, gingivorragias, cirugía, extracciones dentarias,...) afecta a 1%-2% de la población, usualmente menores de 15 años. Siguiendo la secuencia universal de diagnóstico estudiábamos la Enfermedad de von Willebrand (EVW, considerada el defecto hereditario más frecuente de la hemostasia) y las alteraciones de la función plaquetaria. Fuimos observando con el Dr. Pereira que un número considerable de pacientes, en estudios

repetidos, quedaba sin diagnóstico etiológico o patogénico. Hurgando, descubrimos que esto era una experiencia global, pero al parecer oculta y poco atrayente como tópico de investigación. Estos pacientes eran incluidos al final de las tablas usando distractores o eufemismos como “estudio de laboratorio normal” o “sin diagnóstico preciso”. El sangrado se trataba empíricamente. La Dra. Teresa Quiroga, especialista en Laboratorio Clínico, se interesó y lideró con ejemplar dedicación un estudio incluyendo 280 pacientes y 299 controles. La Figura 4 muestra que 60,7% de los pacientes quedaban en el cajón de Sangrado de Causa Desconocida, que bautizamos BUC (*Bleeding of Unknown Cause*).

Así aprendimos que la investigación clínica descriptiva, sin hipótesis, puede ser importante y novedosa. El trabajo de la Dra. Quiroga permitió visibilizar el BUC como problema clínico frecuente y la Sociedad Americana de Hematología la honró con una Conferencia sobre el tema en 2012. Establecimos colaboraciones fructíferas con centros de Bélgica, España, Francia e Inglaterra. Actualmente en Viena (cuyo Banco Central de Sangre coordina el estudio de los pacientes de la ciudad) y en Holanda se desarrollan proyectos colaborativos enfocados en la patogenia del BUC. En Viena la frecuencia de BUC es de 72% (!). Creemos haber despertado conciencia y haber abierto un campo de investigación que había sido eludido previamente.

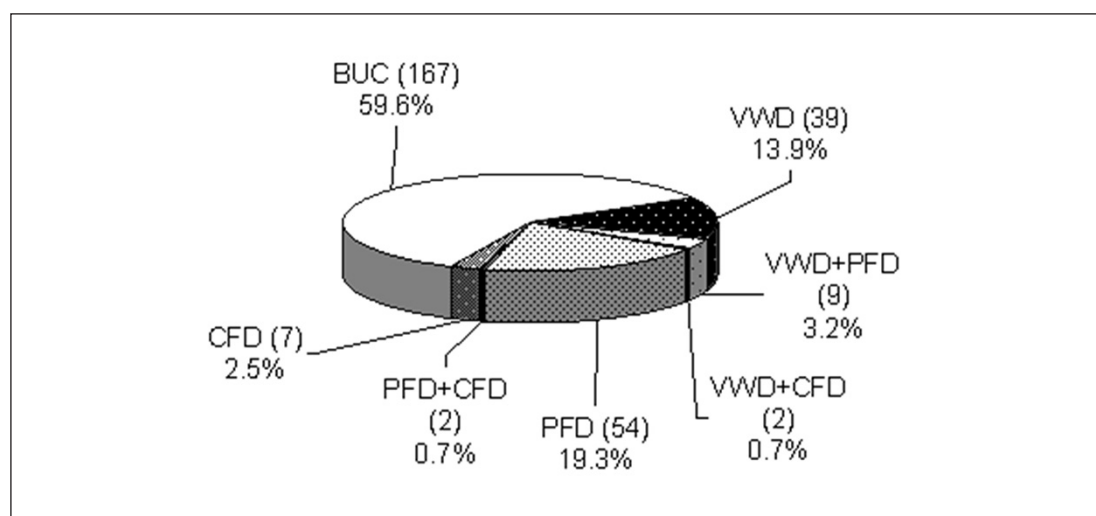


Figura 4. Rendimiento del diagnóstico de laboratorio en pacientes con sangrado mucocutáneo hereditario. Se presenta la patogenia del sangrado en 280. Se diagnosticó positivamente a 113 (40,4%) de ellos. En los 167 restantes (59,6%), que tenían historia de sangrado similar a los anteriores, las pruebas de laboratorio fueron normales. VWD: Enfermedad de von Willebrand. PFD: defectos de la función plaquetaria. CFD: deficiencia de factor de la coagulación. BUC: Sangrado de causa desconocida (Figura modificada de Quiroga, T. et al. *Haematologica*. 2007;92(3):357-65).

9. Buscar explicación a resultados que no coinciden con el conocimiento prevalente

Ocasionalmente, algunos pacientes tenían un defecto exclusivo en la agregación y secreción plaquetarias al ser estimuladas con colágeno, pero no con otros agonistas clásicos. Cuando se describió la glicoproteína VI plaquetaria como receptor del colágeno recurrimos al Dr. Alan Nurden, de Burdeos, quien secuenció el DNA descubriendo la inserción de una adenina en el exón 6 de la *GP6* que detiene la síntesis de la proteína. Este fue el primer homocigoto descrito y reportado junto a otros similares en 2013⁽¹⁴⁾ por Valeria Matus, PhD de nuestro laboratorio. Hasta hoy hemos diagnosticado más de 20 homocigotos distribuidos a lo largo del país. La mutación no ha sido descrita en España ni en otros países latinoamericanos y probablemente proviene de alguno de nuestros pueblos originarios. Steve Watson, PhD, Birmingham U.K., estudió ~1.300 muestras representativas de la población chilena encontrando 2,9% de heterocigotos⁽¹⁵⁾ y estimando que en nuestro país habría más de 4.000 sujetos homocigotos (Figura 5).

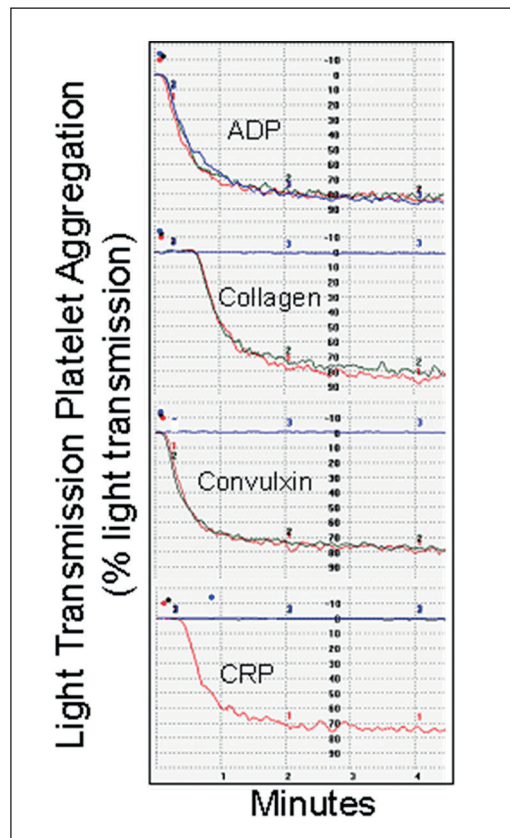


Figura 5. Agregación plaquetaria en la deficiencia homocigota de GPVI en plaquetas humanas. Los trazados muestran las curvas de agregación. Con ADP como agonista, los pacientes y controles exhiben una agregación normal. Lo mismo se observa con ácido araquidónico (precursor de tromboxano A2) y TRAP (*thrombin receptor-activating peptide*), ambos agonistas potentes de las plaquetas. Los agonistas potentes que actúan estimulando la GPVI en la figura, como colágeno tipo I (agonista natural), convulxina (un veneno de serpiente) y CRP (péptido relacionado al colágeno), no inducen agregación y en la figura corresponden a las líneas horizontales después de añadir cada agonista.

La función de la GPVI se postula como el gatillo de la coagulación en vasos sanguíneos arteriales en animales transgénicos y bloqueo farmacológico para estos estudios. Los pacientes chilenos remedan naturalmente el *knock-out* de la GP6 y por ello establecimos colaboraciones con investigadores europeos que han venido a estudiar aspectos puntuales de las plaquetas de nuestros pacientes.

Lecciones aprendidas: no menospreciar hallazgos de laboratorio inexplicables con el conocimiento actual. La colaboración internacional fue decisiva para el diagnóstico temprano de la mutación. Compartir la información y facilitar el estudio de nuestros pacientes a otros investigadores potencia la calidad de nuestra investigación y aumenta nuestra productividad científica.

10. También podemos mejorar, cambiar o desarrollar pruebas diagnósticas de laboratorio largamente establecidas o ¿cómo el sub-desarrollo puede también ser desarrollado?

Desde 1981 evaluamos la secreción plaquetaria mediante una técnica radioisotópica que mide ^{14}C -serotonina secretada por las plaquetas luego de su estimulación por varios agonistas. Este ensayo, introducido en 1969, es hasta hoy designado “*gold standard*” para esta medición: precisa, rápida y de bajo costo. Progresivamente, se fue extendiendo la prohibición de uso de radioisótopos en laboratorios clínicos, que viraron a la determinación de ATP como marcador de secreción plaquetaria. Este ensayo es de alto costo, limita el uso de agonistas débiles y tiene problemas de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Nuestros estudios previos sobre serotonina plaquetaria⁽³⁾ incluyeron su medición por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión o Rendimiento) para medir secreción de serotonina almacenada en gránulos densos y desde hace 10 años lo usamos rutinariamente para diagnóstico clínico. Hemos predicado la bondad de esta prueba en audiencias internacionales, una evangelización no exitosa. Repetidamente se consideró una prueba compleja, de alto costo y con tecnología no apropiada para laboratorios clínicos de hemostasia. Nuestro ensayo fue enteramente financiado mediante Proyecto FONDECYT regular y los insumos usados son de mínimo costo.

Designado por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia revisé este tópico⁽¹⁶⁾ y en seguida diseñé y dirigí una encuesta entre expertos internacionales⁽¹⁷⁾. Finalmente, en 2023 reportamos nuestra experiencia con HPLC, con superioridad respecto a las técnicas isotópicas y de secreción de ATP⁽¹⁸⁾ (Figura 6).

Lecciones: Aportamos avances metodológicos desde Chile y los ensayos desarrollados para investigación se pueden incorporar al diagnóstico clínico y viceversa.

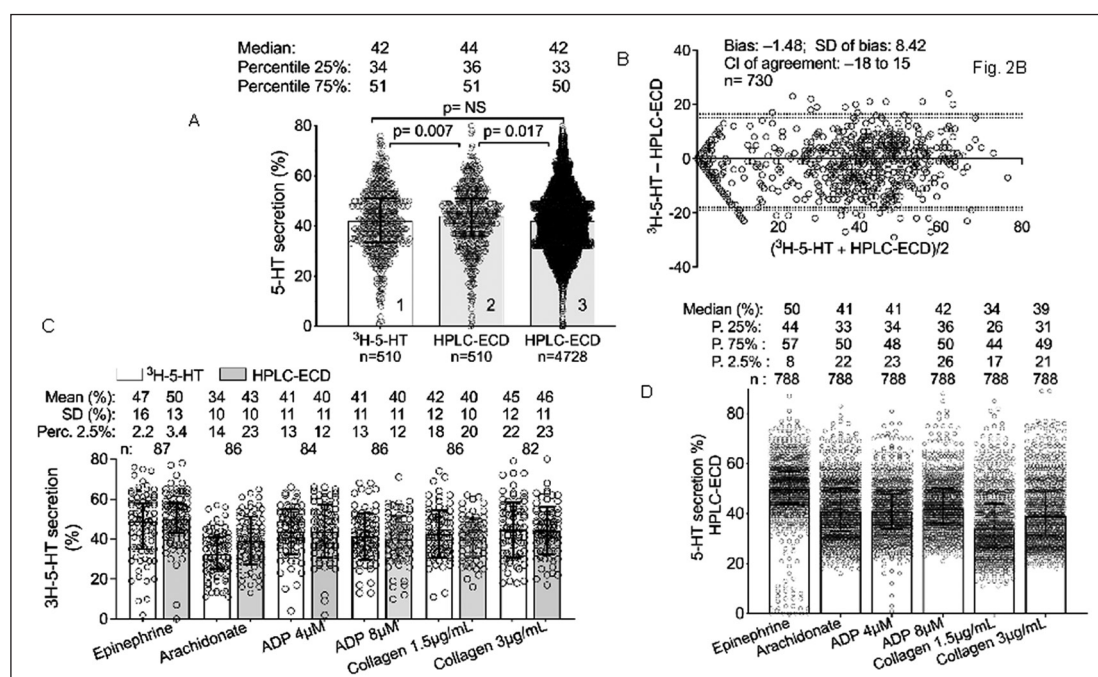


Figura 6. Medición de serotonina plaquetaria. Comparación de HPLC-Detección electroquímica con técnica isotópica. Las plaquetas estimuladas con 6 agonistas diferentes en 510 ensayos de sujetos sanos muestran la serotonina secretada como % del total contenido en las plaquetas. A-1 y A-2 representan la técnica isotópica y la medición con HPLC-ECD. La diferencia estadística, que es funcionalmente insignificante, se explica por una ligera mayor sensibilidad y menor dispersión de los datos con HPLC-ECD que con serotonina tritiada (³H-5-HT). A-3: muestra la consistencia de HPLC-ECD en el uso rutinario diagnóstico en 788 pacientes (4728 mediciones) con secreción de serotonina en rango normal estudiados en 2 años (2020-2022). Los mismos resultados de A1-2 desagregados por cada agonista se muestran en C. En D los mismos datos de A3, segregados por agonista. Las pequeñas diferencias observadas son funcionalmente irrelevantes. En B, se presenta el resultado del análisis en gráfico de Bland-Altman, que refleja visualmente la alta concordancia entre ambos ensayos. (Figura modificada de Mezzano, D. et al. Res PractThrombHaemost 2023;7(5):102156).

11. Factor Tisular en plaquetas: Discusión aún en desarrollo. Cómo resultados inesperados, pero consistentes, obligan a cambiar una hipótesis. Papel de la casualidad (“serendipity”) en la investigación que pueden cambiar un paradigma ¡O cómo un error inocente puede ser el origen estudios de alto impacto!

El Factor Tisular (FT), cuyo nombre deriva de su ubicación exclusiva en los tejidos, gatilla el comienzo de la coagulación sanguínea. Varias décadas después de descubrirlo, se reconoció su presencia en la sangre¹⁹ posiblemente en monocitos circulantes que tienen mRNA de *FT* y sintetizan la proteína. En la sangre, el FT estaría protegido para evitar una activación extemporánea de la coagulación. En el punto 5, enunciamos que

en la uremia hay activación de la coagulación y fibrinólisis, asociados a inflamación. Así, postulamos una sobre-expresión del FT en los monocitos circulantes que daría cuenta de la activación hemostática en la IRC, pero con resultados muy dudosos. Los mononucleares periféricos de la sangre (PBMK), separados clásicamente en gradientes de densidad, están recubiertos con plaquetas adheridas sobre su membrana. Cuando la bioquímica Olga Panes se hizo cargo de estos experimentos, observó que la actividad pro-coagulante de los PBMK's estaba presente o aumentaba en relación directa con el número de plaquetas en las preparaciones de PBMK's. Pensamos absurdo atribuir a las plaquetas la presencia de FT en la sangre, equivalente a circular con una granada pronta a estallar en un depósito de explosivos. Olga confió en la veracidad de su hallazgo y nuevos experimentos nos convencieron: las plaquetas tienen FT con actividad procoagulante. Y no sólo eso, sino también junto a Valeria Matus, PhD, se demostró que tienen mRNA de FT y sintetizan la proteína. Estos resultados, publicados en *Blood*, fueron comentados en un artículo editorial⁽²⁰⁾.

El “azar” entra a escena al estudiar el mecanismo de activación del FT. En nuestra publicación, la actividad procoagulante se inducía estimulando plaquetas con agonistas potentes clásicos. Estudiando la potencia relativa de cada agonista, Olga probó innecesariamente ristocetina, un antiquísimo antibiótico actualmente usado sólo en laboratorios para estudios del FVW y diagnóstico de la EVW. La sorpresa, posteriormente, confirmada en diferentes estudios y plataformas en nuestro laboratorio, fue que la Ristocetina induce 10 a 20 veces más actividad procoagulante que los agonistas fisiológicos potentes. Dilucidamos la vía de transducción, sus inhibidores específicos y la autorregulación del proceso por anticoagulantes naturales secretados por las mismas plaquetas. Todo esto fue posible mediante una virtuosa colaboración de más de una década con Wolfram Ruf, M.D., PhD, de *Scripps Research Institute* y Universidad de Mannheim, Alemania. Presentados en congresos internacionales, estos resultados han sido comentados con motes como “producto de artefactos experimentales” y los como “hallazgos que cambian nuestro paradigma”. Un destacado investigador hindú-estadounidense, observa con equidistancia esta controversia y su sabiduría oriental proclama: “Sólo el tiempo dirá quién tiene la razón”. El manuscrito está en fase final de revisión.

¿Qué aprendimos de todo lo anterior?

- A. Mantener distancia con nuestras propias hipótesis, por plausibles y queribles que sean.
- B. Buscar explicaciones alternativas a resultados consistentemente confirmados que escabullen nuestras hipótesis.
- C. Admirarse por y confirmar resultados aparentemente absurdos obtenidos por azar: podrían cambiar paradigmas.

D. Aceptar positivamente la incredulidad respecto a nuestras observaciones por pares, especialmente cuando refutan sus más queridas creencias. Cualquiera sea la razón, tales críticos no han hecho el esfuerzo de negarlas experimentalmente. Así mirado, la incredulidad de nuestros pares nos ha dado un tiempo adicional para afinar y ampliar este estudio con menos competencia por laboratorios con mayores recursos.

REFERENCIAS

1. Mezzano D, Hwang K, Catalano P, Aster RH. Evidence that platelet buoyant density, but not size, correlates with platelet age in man. *Am J Hematol*. 1981;11(1):61-76. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830110108> PMID: 7270546
2. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev*. 1993 Mar;7(1):52-62. [https://doi.org/10.1016/0268-960X\(93\)90024-X](https://doi.org/10.1016/0268-960X(93)90024-X) PMID: 8467233
3. Van Nueten JM, Janssens WJ, Vanhoutte PM. Serotonin and vascular reactivity. *Pharmacol Res Commun*. 1985 Jul;17(7):585-608. [https://doi.org/10.1016/0031-6989\(85\)90067-0](https://doi.org/10.1016/0031-6989(85)90067-0) PMID: 2931729
4. Aranda E, Pizarro M, Pereira J, Mezzano D. Accumulation of 5-hydroxytryptamine by aging platelets: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs. *Thromb Haemost*. 1994 Apr;71(4):488-92. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1642465> PMID: 8052968
5. Mezzano D, Aranda E, Rodríguez S, Foradori A, Lira P. Increase in density and accumulation of serotonin by human aging platelets. *Am J Hematol*. 1984 Jul;17(1):11-21. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830170103> PMID: 6741929
6. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med*. 1974 Mar;290(13):697-701. <https://doi.org/10.1056/NEJM197403282901301> PMID: 4813742
7. Mezzano D, Tagle R, Panes O, Pérez M, Downey P, Muñoz B, et al. Hemostatic disorder of uremia: the platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost*. 1996 Sep;76(3):312-21. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1650576> PMID: 8883263
8. Mezzano D, Panes O, Muñoz B, Pais E, Tagle R, González F, et al. Tranexamic acid inhibits fibrinolysis, shortens the bleeding time and improves platelet function in patients with chronic renal failure. *Thromb Haemost*. 1999 Oct;82(4):1250-4. PMID: 10544908
9. Mezzano D, Pais EO, Aranda E, Panes O, Downey P, Ortiz M, et al. Inflammation, not hyperhomocysteinemia, is related to oxidative stress and hemostatic and endothelial dysfunction in uremia. *Kidney Int*. 2001 Nov;60(5):1844-50. [https://doi.org/10.1016/S0085-2538\(15\)48065-2](https://doi.org/10.1016/S0085-2538(15)48065-2) PMID: 11703602
10. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992 Jun;339(8808):1523-6. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91277-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91277-F) PMID: 1351198
11. Mezzano D, Leighton F, Strobel P, Martínez C, Marshall G, Cuevas A, et al. Mediterranean diet, but not red wine, is associated with beneficial changes in primary haemostasis. *Eur J Clin Nutr*. 2003 Mar;57(3):439-46. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601558> PMID: 12627181
12. Mezzano D, Leighton F, Martínez C, Marshall G, Cuevas A, Castillo O, et al. Complementary effects of Mediterranean diet and moderate red wine intake on haemostatic cardiovascular

- risk factors. *Eur J Clin Nutr.* 2001 Jun;55(6):444-51. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601202> PMID: 11423921
13. Mezzano D, Kosiel K, Martínez C, Cuevas A, Panes O, Aranda E, et al. Cardiovascular risk factors in vegetarians. Normalization of hyperhomocysteinemia with vitamin B(12) and reduction of platelet aggregation with n-3 fatty acids. *Thromb Res.* 2000 Nov;100(3):153-60. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(00\)00313-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(00)00313-3) PMID: 11108902
 14. Matus V, Valenzuela G, Sáez CG, Hidalgo P, Lagos M, Aranda E, et al. An adenine insertion in exon 6 of human GP6 generates a truncated protein associated with a bleeding disorder in four Chilean families. *J Thromb Haemost.* 2013 Sep;11(9):1751-9. <https://doi.org/10.1111/jth.12334> PMID: 23815599
 15. Dalby A, Mezzano D, Rivera J, Watson SP, Morgan NV. Introduction of an ancient founder glycoprotein VI mutation into the Chilean population. *Blood Adv.* 2022 Nov;6(22):5866-9. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008531> PMID: 35994634
 16. Mumford AD, Frelinger AL 3rd, Gachet C, Gresele P, Noris P, Harrison P, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost.* 2015 Jul;114(1):14-25. <https://doi.org/10.1160/TH14-11-0999> PMID: 25879272
 17. Mezzano DH, Harrison P, Frelinger AL 3rd, Mumford AD, Noris P, Lordkipanidzé M, et al. P.; Frelinger III, A. L.; Mumford, A. D.; Noris, P.; Lordkipanidzé, M.; Gresele, P. Expert opinion on the use of platelet secretion assay for the diagnosis of inherited platelet function disorders: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost.* 2022;20(9):9. <https://doi.org/10.1111/jth.15781>.
 18. Aranda E, Iha S, Solari S, Rodríguez D, Romero V, Villarroel L, et al. Serotonin secretion by blood platelets: accuracy of high-performance liquid chromatography-electrochemical technique compared with the isotopic test and use in a clinical laboratory. *Res Pract Thromb Haemost.* 2023 Jul;7(5):102156. <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.102156> PMID: 37601022
 19. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 Mar;96(5):2311-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2311> PMID: 10051638
 20. Panes O, Matus V, Sáez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood.* 2007 Jun;109(12):5242-50. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-030619> PMID: 17347408.