

In Memoriam

ADOLFO JOSÉ DE BOLD

(1942 / 2021)

Padre de la Endocrinología Cardiovascular

Hugo R. Ramos

División Cardiología, Instituto Modelo de Cardiología Privado SRL. Cátedra de Medicina II, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Adolfo José de Bold falleció en la ciudad de Ottawa, Canadá, el 22 de octubre de 2021. Se podría decir que a partir de ese momento nacía su leyenda, pero es incorrecto porque para la ciencia ya era una leyenda viviente desde hacía muchos años. En su niñez, en la ciudad de Paraná donde nació en 1942, su curiosidad lo llevó a experimentar con una solución con sales y conectar un electrodo a la corriente eléctrica, lo que provocó un cortocircuito que casi acaba con el precoz investigador. Estudió en la Escuela Normal de Paraná, fundada por Domingo F. Sarmiento, a quien admiraba, y posteriormente se trasladó a la ciudad de Rosario para continuar sus estudios universitarios, pero “como era una época muy convulsionada y no se podía estudiar así”, se anotó en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Allí conoció a su futura esposa, Mercedes Kuroski, y obtuvo el título de Bioquímico en 1968; durante sus años de estudio en Córdoba fue Practicante de Histología Normal y Patológica (1964-1967), y fue Residente y Jefe de Residentes en el Laboratorio Central del Hospital Nacional de Clínicas (1966-1968), y como estudiante inmigrante en la ciudad de Córdoba, vivió modestamente en el barrio de Alta Córdoba. La década de 1960 fue la época de oro del folclore argentino, y tal vez por eso, al pasar allí su juventud y escuchar las canciones de la época, es que fue un ferviente admirador de nuestras canciones regionales y sus autores e intérpretes como el Chango Rodríguez, Eduardo Falú, Jaime Dávalos y muchos otros; por ello siempre llevaba en su celular alguna canción que le recordaba a esta tierra.



Adolfo de Bold

Debido a que percibía que en Argentina se hacía muy difícil aprender ciencia y publicar las investigaciones en revistas internacionales especializadas, decidió emigrar a Canadá, adonde arribó con su esposa en 1968. Inició su Maestría en Ciencias en la Escuela de Graduados de Queen's University, Kingston, Ontario, en el Departamento de Patología (1968-1971), y posteriormente obtuvo el Doctorado en Patología y Medicina de Laboratorio en la misma universidad (1971-1973)^{1,2}. Su supervisor de tesis, Sergio Bencosme, un destacado investigador especializado en la morfología funcional del páncreas endocrino, también estaba interesado en

unos gránulos que fueron detectados en los cardiocitos auriculares, pero cuya función era completamente desconocida^{3,4}. En aquel momento, solo se había avanzado en la descripción morfológica de esos gránulos, a los que llamaban “gránulos atriales específicos”, mientras que otros investigadores los consideraban como un remanente evolutivo⁵. Jamieson y Palade sugirieron que esos gránulos no contenían catecolaminas como se creía, y postularon que las células cardíacas altamente especializadas en la contracción, tendrían en el caso de las aurículas, una segunda función presuntamente secretoria⁵. Esto llevó a de Bold a considerar un desafío dilucidar su naturaleza. Tanto de Bold como su esposa Mercedes, conocían técnicas de laboratorio morfológicas y bioquímicas, que llevarían a descubrir el contenido de esas estructuras que las asemejaban a la de las glándulas endócrinas. En aquel tiempo no era frecuente encontrar en una misma persona tales conocimientos, por lo que de Bold siempre recordaba lo útil que fue para su carrera el aprendizaje enciclopédico que tuvo en su escuela secundaria,

y posteriormente en la UNC y en la Cátedra de Patología dirigida por el Prof. Mosquera en el Hospital Nacional de Clínicas. Por otro lado, recordaba como una inspiración la figura de excelencia científica de su compatriota Bernardo A. Houssay, quien con sus investigaciones sobre la función endócrina de la hipófisis anterior, fue galardonado con el Premio Nobel de Fisiología en 1947.

Para 1973, de Bold estableció por primera vez que los gránulos atriales específicos no contenían catecolaminas⁶. En la defensa de su tesis aunque no pudo concluir cuál era el contenido de los gránulos atriales, formuló la hipótesis de que debido a la posición de la aurícula derecha como receptora del sistema venoso y en el centro del sistema cardiovascular, los gránulos podrían intervenir en el sentido de los cambios de volumen intravascular^{6,7}. Terminada su tesis de doctorado, en 1974, el Jefe de Patología del Hotel Dieu Hospital, Nathan Kaufman, le ofreció un cargo como Profesor Asistente de Patología para ayudar a desarrollar la investigación en ese hospital asociado a Queen's University. Sin embargo, a pesar de ser un hospital escuela, era un centro esencialmente asistencial, no específicamente dedicado a la investigación, en donde para comenzar le dieron una oficina sin ventanas ubicada en la morgue, en el sótano, con permanente olor a formol, una mesa, un banco, una incubadora antigua y un microscopio. Contaba a su esposa que "los familiares de los fallecidos se sentaban en su oficina hasta que los de la morgue los pudieran atender"⁸. Ese ambiente solitario y aislado, consideraba que le ayudó a mantenerse centrado en el objetivo de descubrir la función endócrina del corazón y publicó más trabajos acerca de una técnica de tinción y un método preciso de cuantificación de los gránulos^{9,10}. Con el fin de reunir fondos para investigación su primera subvención la obtuvo del *Medical Research Council* para investigar la inervación adrenérgica del corazón en la insuficiencia cardíaca, por lo que desarrolló un modelo experimental original en el guinea pig. También obtuvo fondos de la *Heart and Stroke Foundation* para continuar su investigación con los gránulos auriculares y colaboró con Jack Kraicer para dilucidar la morfología de la pars intermedia, la porción media, avascular, de la glándula hipófisis. Él y su esposa, descubrieron un sistema de canales usando marcadores del espacio extracelular¹¹ y Mercedes Kuroski desarrolló un método de impregnación con plata que permitió descubrir un nuevo tipo de célula de la pars intermedia, las células estrelladas^{11,12}. Cuando se leen esos detallados trabajos relacionados con la morfología de la hipófisis, no resulta difícil comprender por qué años después descubrirían la función endócrina del corazón. Había un respaldo de conocimientos morfológicos y funcionales de una solidez tal, que los frutos de años de investigación aparecerían en algún momento. Pero ese momento tardó 12

años. La nueva técnica de tinción de los gránulos atriales desarrollada por de Bold, la incrustación en plástico para obtener cortes finos y uniformes, permitió no solo establecer la presencia de los gránulos en el microscopio de luz, sino también cuantificarlos cuando se realizaran experimentos con estímulos, ya que su distribución es irregular no solo entre los gránulos de las células atriales sino también dentro de una misma célula¹⁰. Con los análisis histoquímicos y morfométricos ya desarrollados, y evidencia de que el número de gránulos variaba según estímulos que podían regular el volumen intravascular, se planteó la hipótesis de que los gránulos contendrían un polipéptido que regularía el balance del agua y electrolitos y que su blanco serían los riñones^{13,14}. Como no disponía de un modelo experimental en su laboratorio para probar la hipótesis, recurrió a Harald Sonnenberg del Departamento de Fisiología de la Universidad de Toronto, quien tenía un bioensayo en ratas y estaba en la búsqueda de una hormona natriúrica. Aunque no se conocían personalmente, de Bold se comunicó con Sonnenberg y éste lo invitó a dar un seminario en Toronto y aceptó que le enviara los extractos de aurículas para ser probados en su modelo experimental de ratas. Los primeros experimentos fueron un fracaso; los extractos atriales contenían una alta concentración de cloruro de potasio lo que provocaba casi inmediatamente un paro cardíaco en las ratas y su muerte. Entonces, de Bold pidió paciencia al fisiólogo y posteriormente envió nuevos extractos auriculares crudos en una solución de fosfato y también extractos de ventrículos para ser utilizados como control. Algunas semanas después, Sonnenberg le llamó para decir que el extracto auricular provocaba una muy potente diuresis y natriuresis, similar o mayor que la de furosemida; para confirmar el hallazgo, de Bold repitió el experimento en su laboratorio con resultados igualmente sorprendentes, y además agregó una proteinasa que hizo desaparecer el efecto encontrado, lo que confirmó que el contenido de los gránulos atriales era de una hormona polipeptídica. No sucedía lo mismo al inyectar los extractos de ventrículo, confirmando que solo los gránulos auriculares contienen ese polipéptido⁷. Habiendo percibido la importancia de este descubrimiento, fue presentado en la *Canadian Society for Clinical Investigation* y enviado para publicación a una prestigiosa revista, pero el artículo fue rechazado sin contemplaciones el 28 de mayo de 1980, argumentando que "no era considerado adecuado para publicación". Por este motivo fue redirigido a una revista de segunda línea, que recibió el artículo en su forma final el 21 de octubre de 1980 y lo publicó en su número del 5 de enero de 1981¹⁵. Allí se describía por primera vez que la inyección de "un extracto derivado del músculo auricular (cardíaco) causó un rápido aumento, de más de 30 veces en la excreción de sodio y cloro, mien-

tras que el volumen urinario aumentó 10 veces y la excreción de potasio se duplicó” y concluye que “el extracto auricular contiene un inhibidor extremadamente poderoso de la reabsorción tubular del cloruro de sodio”¹⁵. El artículo es aun hoy una síntesis de ciencia pura, escrito en 1.125 palabras, con solo 7 referencias, y ha sido citado más de 26.000 veces por investigadores de todo el mundo (*Classic Citation, Institute for Scientific Information*). El contenido de los gránulos auriculares fue develado finalmente y varios nombres fueron utilizados inicialmente tales como cardionatrina, atrina, atriopeptina, auriculina, *atrial natriuretic factor*, *atrial natriuretic peptide*, y se hizo necesario consensuar un nombre para mejorar la comunicación científica. Por este motivo, un comité conjunto de la *International Society of Hypertension*, *the American Heart Association* y *the World Health Organization* acordaron denominarlo *Atrial Natriuretic Factor* (ANF) y éste es su nombre consensuado oficialmente¹⁶. Con el tiempo, los investigadores japoneses mantuvieron el término *Atrial Natriuretic Peptide* (ANP), el que fue quedando en la bibliografía y aunque ANF no fue cambiado oficialmente hoy se utiliza ANP. A partir de este descubrimiento ocurrió algo que a veces no es extraño en ciencia: hubo quienes reconocieron el logro de sus autores pero otros quisieron arrebatarles el crédito y reclamaban para sí el mérito, ya que se hizo con recursos muy escasos en “el sótano de un oscuro hospital”, considerado así una “presa fácil” por algún instituto de investigación de mayor envergadura¹⁵. Sin embargo, era imposible ignorar la publicación original que precedió en tres años a otras. Otra carrera comenzó entonces, la de secuenciar el péptido auricular; en aquel momento estaba desarrollándose la técnica de high-performance liquid chromatography (HPLC) para el aislamiento de péptidos, pero de Bold carecía de tal tecnología. Afortunadamente, el hospital donde trabajaba había adquirido un equipo para medición clínica de teofilina en sangre, y como bioquímico fue puesto a cargo; durante el día medía teofilina en pacientes y durante la noche reconfiguraba el aparato para adecuarla con una columna cromatográfica para medir péptidos⁷. Nuevamente con pocos recursos, ingenio y mucha dedicación al trabajo, su esposa Mercedes extrajo las aurículas de ratas, de Bold purificó los extractos y un técnico testeó las diferentes fracciones de los extractos, obteniendo así el péptido purificado. El paso siguiente era realizar la secuenciación y la única persona en Queen’s que podía ayudar era Geoff Flynn, entrenado en el análisis de aminoácidos y secuenciación de proteínas pero que contaba con un equipamiento anticuado, por lo que los primeros resultados fueron fallidos. El problema fue resuelto cuando pudieron adquirir un secuenciador en fase gaseosa con fondos provistos por el gobierno de Ontario, y finalmente publicaron la secuencia completa de aminoácidos del ANF en 1983,

un año antes que los investigadores japoneses^{7,17}. El péptido aislado, con un peso molecular de 3.500 y una secuencia de 28 aminoácidos (ANF99-126), se consideró una parte de la molécula mayor de la originalmente denominada por de Bold, Cardionatrina I, que tiene las mismas propiedades diuréticas y natriuréticas descritas originalmente¹⁸. En todo el proceso desde el descubrimiento, se utilizaron aproximadamente 200.000 aurículas de ratas e incontables horas diurnas y nocturnas de estudio y trabajo.

Consecuencias del descubrimiento

Una vez abierta la puerta al ANF se produjo una verdadera catarata de investigaciones y publicaciones de la función endócrina del corazón que permitía comprender la fisiología cardiovascular, renal, endócrina, metabólica y de la hipertensión arterial; sin dudas, los textos de fisiología y medicina cardiovascular tuvieron que ser reescritos¹⁹. El Dr. Eugene Braunwald consideró que Adolfo de Bold está entre los más importantes científicos de los últimos 100 años, y que su trabajo descubrió los procesos normales, cómo ellos se modifican con la enfermedad, cómo se pueden usar para el diagnóstico y el tratamiento de una enfermedad, ya que el conocimiento del sistema de los péptidos natriuréticos llevó a la aprobación por la *Food and Drug Administration* de un nuevo tratamiento de la insuficiencia cardíaca como el de *angiotensin receptor-neprilysin inhibitor* (ARNI)²⁰. Por otro lado, entre muchos otros aportes, descubrió el rol diferencial que tienen ANP y Brain Natriuretic Peptide (BNP), siendo el primero un regulador específico del volumen intravascular y el segundo, además de esa función, como un respondedor ante la inflamación miocárdica y un biomarcador del rechazo de trasplante cardíaco^{21,22,23}. Su último trabajo fue publicado el 17 de noviembre de 2020 y es una extensa revisión del tema con algunos de sus discípulos²⁴.

Familia, amistad y otras anécdotas

Fundó su propia familia con Mercedes y sus cinco hijos: David, Alex, Cecilia, Gus, Paul, y cinco nietos. Visitaba frecuentemente Argentina, y recorría por su cuenta todos los rincones, incluso los más apartados; una vez fue a buscar al creador de la *sacha guitarra* (guitarra del monte), Elpidio Herrera, en el interior de Santiago del Estero, para saber cómo era verdaderamente el instrumento y cómo se creó. Otra vez contaba cómo casi tiene que hacerse cargo de un niño pequeño dejado en el asiento de un ómnibus en un viaje a Jujuy; afortunadamente, la madre regresó a tiempo para recogerlo. En el garaje de su casa en Manotick, en las afueras de Ottawa, construyó con sus propias manos un yate pequeño, que posteriormente navegó con su familia por las aguas del canal Rideau. Pero muy importante, a pesar de tener una personalidad reservada, disfrutaba mu-

cho de la amistad y de los momentos simples compartidos con amigos. En una oportunidad, uno de sus alumnos pasó por un muy difícil momento profesional, que incluso podía indirectamente perjudicar a de Bold. Sin embargo, él mantuvo firme su apoyo negándose a abandonarlo, algo tremendamente valioso dada su posición académica. Felizmente todo terminó bien y demostró una vez más su valía personal. Solía decirle a los jóvenes que deseaban iniciarse en investigación: “*tengan un sueño, no piensen en pequeño, trabajen mucho y crean en Uds. mismos*” y por dentro contó que pensaba “... *y recen para estar en lo cierto*”.

Reconocimientos

Fue nombrado *officer of the Order of Canada*, la máxima distinción civil otorgada por ese país, ingresó al *Canadian Medical Hall of Fame*, recibió el *Grand Prix scientifique de la Fondation Lefoulon-Delalande* del Institute de France y fue nominado al Premio Nobel, entre muchísimos otros. Era muy modesto y no solía hablar de los premios que recibía, pero un momento muy especial vivió cuando fue designado *Doctor Honoris causa* por la Universidad Nacional de Córdoba; ese día, al terminar el acto académico, mientras familiares, amigos y profesores compartían en el salón de grados y en la galería, se apartó solitario del grupo y dirigió unos pasos hacia el patio donde se encuentra en el centro la figura del Obispo Trejo; permaneció en silencio mirando la estatua y recorriendo con la mirada el antiguo patio y al final, con un suspiro, es probable que recordara sus inicios juveniles sin imaginar que aquel ignoto estudiante llegaría a ser un Profesor de su propia universidad y uno de los científicos más respetados del mundo. Unos segundos después de aquel momento mágico y solitario, su esposa Mercedes lo llamó para continuar con las obligaciones sociales que seguían, y allí regresó a la realidad. Fue un momento inolvidable en donde el hombre maduro se reencontró a sí mismo con lo que fue siempre: un niño curioso que a través de la investigación “*trataba de entender a Dios*”⁸.

BIBLIOGRAFIA

1971. M.Sc. (Experimental Pathology) "Studies on the Relationship between the Catecholamine Distribution in the Atrium and the Specific Granules Present in Atrial Muscle Cells". Curriculum vitae, Adolfo J. de Bold, mayo de 2013.
1973. Ph.D. (Experimental Pathology) "The Relationship between Morphology and Function in the Atrial Cardiocyte. A study With Emphasis on the Secretory Characteristics of the Mammalian Atrium". Curriculum vitae, Adolfo J. de Bold, mayo de 2013.
- Kisch B. Electron microscopy of the atrium of the heart. *Exp. Med. and Surg* 1956; 14: 99.
- Palade GE. Secretory granules in the atrial myocardium. *Anat Rec* 1961; 139: 262.
- Jamieson JD, Palade GE. Specific granules in atrial muscle cells. *J Cell Biol* 1964; 23: 151 - 172.
- de Bold AJ, Bencosme SA. Studies on the relationship between the catecholamine distribution in the atrium and the specific granules present in atrial muscle cells. 2. Studies on the sedimentation pattern of atrial norepinephrine and adrenaline. *Cardiovasc Res* 1973; 7: 364 - 369.
- A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Reprinted from *Life Sci* 1981; 28: 89 - 94. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 403 - 409.
- Strauss S. Obituary. Canadian researcher revolutionized our understanding of the heart. *Special to the Globe and Mail*. Published November 5, 2021. Disponible en <https://www.theglobeandmail.com/canada/article-canadian-researcher-revolutionized-our-understanding-of-the-heart/> Acceso 01 de Diciembre de 2021.
- de Bold AJ, Bencosme SA. Selective light microscopic demonstration of the specific granulation of the rat atrial myocardium by lead-hematoxylin-tartrazine. *Stain Technol* 1975; 50: 203 - 205.
- de Bold AJ: Morphometric assessment of granulation in rat atrial cardiocytes: Effect of age. *J Mol Cell Cardiol* 1978; 10: 717 - 724.
- de Bold AJ, de Bold ML, Kraicer J. Structural relationships between parenchymal and stromal elements in the pars intermedia of the rat adenohypophysis as demonstrated by extracellular space markers. *Cell Tissue Res* 1980; 207: 347 - 359.
- de Bold ML, de Bold AJ, Kraicer J. Demonstration of stellate cells of the pars intermedia of the pituitary gland using a new silver impregnation technique. *Stain Technol* 1984; 59: 49 - 52.
- Marie JP, Guillemot H, Hatt PY. Le degré de granulation des cardiocytes auriculaires. Etude planimétrique au cours de différents apports d'eau et de sodium chez le rat [Degree of granularity of the atrial cardiocytes. Morphometric study in rats subjected to different types of water and sodium load (author's transl)]. *Pathol Biol (Paris)* 1976; 24: 549 - 554.
- De Bold AJ. Heart atria granularity effects of changes in water-electrolyte balance. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 161: 508 - 511.
- de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981; 28: 89 - 94.
- Dzau VJ, Baxter JD, Cantin M, de Bold A, et al. Nomenclature for atrial peptides. *N Engl J Med* 1987; 316: 1278 - 1279.
- Flynn TG, de Bold ML, de Bold AJ. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 117: 859 - 865.
- de Bold AJ, Flynn TG. Cardionatrin I - a novel heart peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Life Sci* 1983; 33: 297 - 302.
- Mona Nemer. Citado en Canadian Medical Hall of Fame. Disponible en <https://cdnmedhall.ca/laureates/adolfodebold> Acceso 01 de Diciembre de 2021.
- Braunwald E, de Bold AJ. The discovery of the Natriuretic Peptide System by A J de Bold which as a consequence, made it possible for the Federal Drug Administration to approve the first ARNi on 7 July 2015 is discussed by Eugene Braunwald MD. *Eur Heart J* 2015; 36: 2760.
- Ma KK, Ogawa T, de Bold AJ. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36: 505 - 513.
- Masters RG, Davies RA, Keon WJ, Walley VM, Koshal A, de Bold AJ. Neuroendocrine response to cardiac transplantation. *Can J Cardiol* 1993; 9: 609 - 617.
- Masters RG, Davies RA, Veinot JP, Hendry PJ, Smith SJ, de Bold AJ. Discordant modulation of natriuretic peptides during acute cardiac allograft rejection in humans. *Circulation* 1999; 100: 287 - 291.
- Goetze JP, Bruneau BG, Ramos HR, Ogawa T, de Bold MK, de Bold AJ. Cardiac natriuretic peptides. *Nat Rev Cardiol* 2020; 17: 698 - 717.