

6. Doctor Santiago Grisolía i Garcia: el cicle de la urea i la nutrició

VICENTE ZANON-MORENO

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública i CIBEROBN
de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València,
OBN Unitat d'Investigació Oftalmològica «Santiago Grisolía»
de l'Hospital Universitari Doctor Peset de València

RESUM

El professor Santiago Grisolía i Garcia va començar els estudis de medicina a Madrid, però es va llicenciar a la Facultat de Medicina de la Universitat de València. Posteriorment va emigrar als Estats Units per recomanació del seu mentor, el professor García-Blanco, i va ingressar al laboratori del doctor Severo Ochoa com el seu primer deixeble. Un any després es va traslladar a la Universitat de Chicago i, mitjançant tècniques de marcadors isotòpics, va ser el primer a demostrar el procés de fixació de CO₂ en teixits animals. De Chicago va passar a la Universitat de Wisconsin com a professor assistent i va començar les seues investigacions sobre el cicle de la urea, que li van valer diverses nominacions al Premi Nobel de Química. Uns anys més tard, va aconseguir un contracte de professor associat a la Universitat de Kansas, on arribà a ser catedràtic i director del Departament de Bioquímica, i director de l'Institut d'Investigació Mèdica de la mateixa universitat. En aquesta universitat continuà amb les seues investigacions sobre el cicle de la urea, i va descobrir el mecanisme de degradació de les pirimidines. Finalment, trenta-cinc anys després de la seua arribada als Estats Units, tornà a la seua ciutat natal per fer-se càrrec de la direcció de l'Institut d'Investigacions Citològiques. Va crear la Fundació Valenciana d'Estudis Avançats i va instaurar els Premis Rei Jaume I, d'enorme prestigi internacional.

Fins al gener de 2014, és autor de més de 485 publicacions científiques, 8 llibres, més de 270 articles de divulgació general i una novel·la. El professor Grisolía ha estat i és una figura clau de la investigació a Espanya, i ha aconseguit aïllar al llarg de la seua extensa carrera investigadora més de vint enzims i la cristal·lització de quatre d'ells.

El professor Santiago Grisolía i Garcia va néixer el 6 de gener de 1923 a València (figura 1).

El seu pare era banquer, treballava a Banesto, raó per la qual la família va canviar de residència en nombroses ocasions. Poc després de néixer, es van traslladar a Madrid. Uns anys després, el seu pare va tenir l'oportunitat de fundar el primer banc de Dénia. Van viure després a Xàtiva i a Lorca, i quan va començar la Guerra



FIGURA 1. El professor Grisolí, pocs mesos després de nàixer, amb la seua germana i la majordoma del seu iaio (1923). Fotografia cedida per Santiago Grisolí.

Civil espanyola estaven a Conca, on va estudiar el batxillerat, que acabà a la primera edat de tretze anys. Per aquest motiu i perquè emprés el seu temps en alguna cosa productiva fins a continuar amb els seus estudis, el seu pare el va començar a ajudar un metge, amic de la família, en un hospital. A més, el seu pare estava preocupat perquè era un noi molt alt per a la seua edat i temia que fora reclutat (eren temps de la Guerra Civil), així que el va enviar a un hospital de la Confederació Nacional del Treball (CNT), on li van posar una bata i va començar a treballar. Tal com el mateix professor Grisolí sol dir, va veure «més ferits i malalts abans de començar la carrera de medicina que després» (figura 2).

Acabada la Guerra Civil, el professor Grisolí volia ser marí, possiblement d'aquí li ve el gust per anar amb americana i pantalons blancs. Però, seguint els consells de la seua mare, va començar els estudis de medicina a l'Hospital San Carlos de Madrid. Finalitzats els dos primers cursos, es traslladà a València amb la seua família i continuà els seus estudis a la Facultat de Medicina de la Universitat de València, on finalment es llicencià l'any 1944.

El professor Grisolí, encara estudiant, va començar a treballar al laboratori del professor José María García-Blanco Oyarzábal, catedràtic de fisiologia i bioquímica, el qual li va inculcar la passió per la investigació. Ja llicenciat, empès per l'esperit aventurer de l'investigador, la curiositat científica i les ganes d'aprendre noves tècniques, va marxar als Estats Units amb una de les deu beques per a realitzar estudis a l'estranger que va convocar el Ministeri d'Educació l'any 1945. Als Estats Units, el professor Lorente de No, l'últim deixeble de Santiago Ramón y



FIGURA 2. Carnet d'«auxiliar mèdic» de l'Hospital Provincial de Conca (1937), poc abans de començar els estudis de medicina. Fotografia cedida per Santiago Grisolía.

Cajal, el va posar en contacte amb un jove bioquímic que treballava a la Universitat de Nova York, el professor Severo Ochoa. D'aquesta manera, el 2 de gener de 1946, el professor Grisolía va ingressar al laboratori del professor doctor Ochoa, i va ser el seu primer deixeble, i d'aquesta manera va començar la seua reeixida carrera investigadora en el camp de l'enzimologia. En un primer moment, el laboratori del professor Ochoa estava situat en el Departament de Química, però poc després va ser nomenat cap del Departament de Farmacologia, i va traslladar el seu laboratori a aquest departament. El professor Grisolía va començar uns experiments amb trifosfat d'adenosina (ATP), compartint la bancada del laboratori amb un altre investigador, de més edat, al qual el professor Grisolía no coneixia. Quan aquest altre investigador no era al laboratori, el professor Grisolía apartava les seues coses per tal de tenir més espai. I quan l'altre investigador tornava, col·locava una altra vegada les seues coses al seu lloc i apartava les del professor Grisolía. Era una mena de lluita pel lloc i l'espai. La sorpresa del professor Grisolía va ser majúscula quan, poc després, es va assabentar que l'investigador amb el qual pugnava era Otto Loewi, Premi Nobel de Medicina, a qui li feia gràcia que un jove investigador li disputés la bancada del laboratori.

Posteriorment, per recomanació del professor Ochoa, es va traslladar a la Universitat de Chicago per aprendre les tècniques de marcadors isotòpics. Preci-

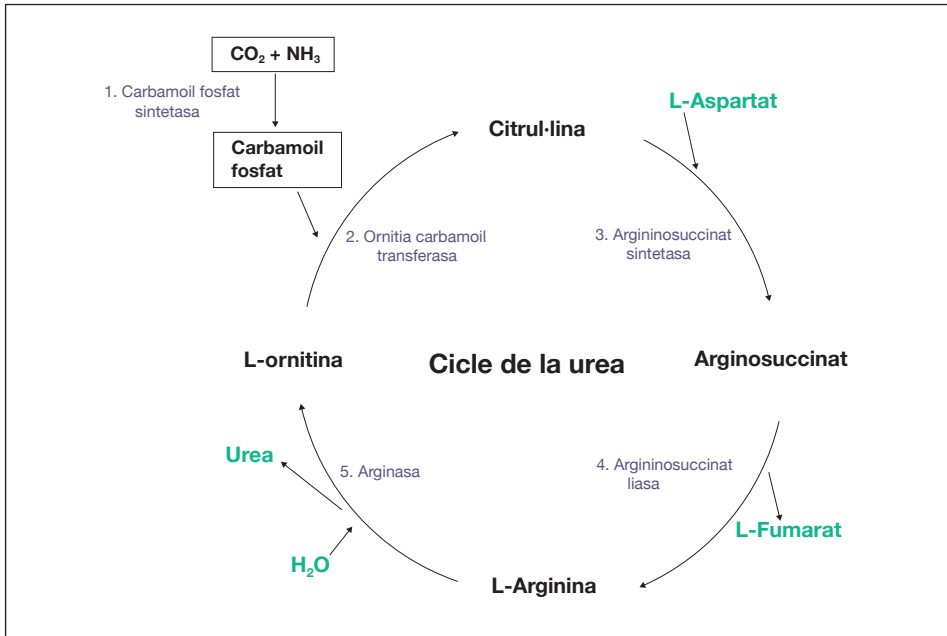


FIGURA 3. Esquema de les reaccions del procés de síntesi de la urea, l'anomenat *cicle de la urea*.

sament, mitjançant aquesta tècnica, el professor Grisolí va demostrar la fixació del diòxid de carboni en teixits animals (Grisolí i Vennesland, 1947), la qual cosa es creia únicament possible en les plantes. El 1948 va aconseguir un lloc de professor assistent en aquesta universitat, i començà els seus estudis sobre les reaccions enzimàtiques del cicle de la urea, i va descobrir metabòlits intermediaris d'aquest cicle.

En aquest mateix any va ser contractat com a professor assistent del professor Philip Pacy Cohen a la Universitat de Wisconsin, on va començar les seues investigacions sobre el cicle metabòlic de la urea (figura 3). Uns anys abans, el 1932, Hans Krebs i Kurt Henseleit van enunciar per primera volta el cicle de la urea, encara que estava incomplet i quedaven algunes llacunes. El professor Grisolí, mitjançant el seu treball al laboratori del professor Cohen, va contribuir al seu aclariment. Entre els seus descobriments relacionats amb el cicle de la urea, destaquen:

- Acetilglutàmic: va demostrar que és un activador al·lostèric positiu de l'enzim carbamoil-P-sintetasa, enzim del cicle de la urea que catalitza la formació de carbamoil fosfat a partir de CO_2 i NH_4 , reacció limitant de la síntesi de la urea. En presència d'aquest modulador, la síntesi de la urea s'accelera. Així mateix, va demostrar que la inactivació tèrmica del sistema enzimàtic que catalitza la síntesi



FIGURA 4. Escut d'armes del marquès de Grisolía, en el qual figura la fórmula de l'acetilglutàmic. Imatge cedida per Santiago Grisolía.

de citrullina és el resultat de la inactivació del sistema de fosforilació (Grisolía, Burris i Cohen, 1951). Com a curiositat, en l'escut d'armes del marquès de Grisolía apareix la fórmula de l'acetilglutàmic (figura 4).

— Citrullina: com a conseqüència de les diferències d'opinió entre els investigadors de l'època, ja que alguns qüestionaven la participació de certs metabòlits en el cicle de síntesi de la urea, el professor Grisolía es va proposar demostrar que la citrullina era el primer estadi en el cicle de la urea, i ho va aconseguir gràcies a un encertat experiment (Grisolía i Cohen, 1951). Aquest experiment va consistir a preincubar una part dels components del cicle i afegir-hi la resta de forma ràpida. Com a conseqüència es va produir una gran acumulació de l'intermediari, cosa que demostrava de manera inqüestionable la participació de la citrullina en el procés de síntesi de la urea. També va aconseguir aïllar els enzims que participen en la síntesi de la citrullina.

— Fixació de diòxid de carboni: no només va demostrar la fixació de CO_2 en teixits animals, sinó que va demostrar que era una fase prèvia a la formació de citrullina (Grisolía, Koritz i Cohen, 1951). Mitjançant experiments amb àcid carbamoilglutàmic marcat amb NH_3 , CO_2 i ^{14}C va demostrar que el carboni i el nitrogen del grup carbamil de la citrullina provenien del NH_3 i CO_2 afegits al medi (figura 5).

— Carbamoilglutàmic: va ser capaç de sintetitzar carbamoilglutàmic (Grisolía i Burris, 1954), la qual cosa és important perquè és capaç de substituir l'ace-

Urea was isolated as the dioxanhydrol derivative and found to contain 0.794 per cent N^{14} excess. This figure, corrected for dilution, as well as

TABLE II
Carbon Dioxide Fixation during Citrulline Synthesis

Experiment No.	Compound isolated	Specific activity of isolated compounds	
		Controls	Experimental
		$\mu\text{m. per } \mu\text{m.}$	$\mu\text{m. per } \mu\text{m.}$
1	Carbon dioxide	2780	2780
	Citrulline	2	2780
2	3-Propionic acid hydantoin	0	2
	Citrulline	392	392

Final substrate concentrations, MgSO_4 , 5×10^{-4} M; phosphate buffer, pH 7.2, 1×10^{-3} M; NaHCO_3 (in Experiment 1 the bicarbonate ions contained C^{14} of specific activity, as indicated), 1×10^{-3} M; NH_4Cl , 5×10^{-2} M; ATP, 5×10^{-4} M; carbamyl-L-glutamate, 5×10^{-3} M (in Experiment 2, C^{14} -labeled carbamyl-L-glutamate was used, the specific activity of which is indicated in Table II); L-ornithine (the control experiments were without ornithine), 5×10^{-4} M; 27 mg. of purified enzyme Preparation B were used in each experiment. Final volume, 4.0 ml.; temperature 28°; gas phase, air; time of incubation, 75 minutes. Under these conditions the system synthesized about 12 $\mu\text{m.}$ of citrulline. In Experiments 1 and 2, no citrulline synthesis was detectable in the control vessels.

FIGURA 5. Taula extreta de l'article en què el professor Grisolí demostra la fixació de CO_2 en la biosíntesi de la citrulina. La taula mostra que l'activitat específica de la citrulina aïllada en l'experiment indica la incorporació total del diòxid de carboni. (Grisolí, Burris i Cohen, 1951)

tilglutàmic inestable com a activador al·lostèric, per la qual cosa pot ser utilitzat per tractar els casos de deficiència d'*N*-acetilglutàmic sintetasa.

Durant tot aquest temps, el professor Grisolí va treballar en la seua tesi doctoral i finalment es va doctorar *summa cum laude* a la Universitat de Madrid l'any 1949, i va ser el president del tribunal el professor Jiménez y Díaz, amb el qual sempre va mantenir una gran amistat.

El seu pas per la Universitat de Wisconsin no només va ser clau en la seua vida professional, sinó també en la personal. Per ajudar-lo en el seu treball, li van assignar una assistent, Frances Thompson, recent doctorada en fisiologia. Segons explica el mateix professor Grisolí, «el resultat no va ser molt reeixit en l'àmbit professional, però sí en el personal». Tant és així que van contraure matrimoni i porten junts des de llavors.

El 1954 tornà a canviar de centre de treball, i es va traslladar a la Universitat de Kansas com a professor associat, on va arribar a ser catedràtic, director del Departament de Bioquímica i director de l'Institut d'Investigació Mèdica de la mateixa universitat. Durant el temps que va passar en aquesta universitat, el professor Grisolí va tenir ocasió de reunir-se amb el professor Hans Krebs, descobridor del cicle de la urea (figura 6). Un cop establert en aquesta universitat, i gràcies als mitjans de l'Institut d'Investigació Mèdica, va continuar amb les seues investigacions



FIGURA 6. El professor Grisolí i el professor Krebs a la Universitat de Kansas (1963). Fotografia cedida per Santiago Grisolí.

sobre el cicle de la urea, i va descobrir el mecanisme de degradació de les pirimidines. També va descobrir i purificar tots els enzims implicats en aquest procés de degradació i la limitada reutilització de les pirimidines, en contrast amb les purines.

Anys més tard, el 1976, després de trenta-cinc anys de treball durament als Estats Units, tornà a la seua ciutat natal per fer-se càrrec de la direcció de l'Institut d'Investigacions Citològiques (IIC), per tal d'impulsar la investigació a Espanya, que, en aquell temps, es trobava molt endarrerida respecte a altres països occidentals. La decisió de tornar a la seua ciutat natal no va ser fàcil. D'una banda, la seua dona era nord-americana, tenien dos fills, molts amics i una bona posició a la Universitat de Kansas. D'altra banda, el professor Grisolí tenia família a València, com la seua mare, i també molts amics i col·legues. Així doncs, va decidir agafar-se un any sabàtic als Estats Units, vindre a València i veure com li anava. Després d'aquest període sabàtic, va veure que podia fer moltes coses a l'IIC i va decidir traslladar-se definitivament a València, però sense perdre la seua relació amb la Universitat de Kansas.

Dos anys més tard, exactament l'11 d'octubre de 1978, va crear la Fundació Valenciana d'Estudis Avançats, amb l'objectiu d'impulsar i divulgar la ciència i la

cultura, i donar-hi suport. Un dels èxits més notables d'aquesta fundació va ser la instauració el 1989 dels Premis Rei Jaume I, atorgats per un jurat d'enorme prestigi i excel·lència internacional, que compta amb diversos premis Nobel (dinou en l'edició de 2014).

El 1988, la UNESCO va nomenar el professor Grisolía president del Comitè de Coordinació per al Projecte Genoma Humà (PGH), i va iniciar una àrdua tasca de coordinació que va culminar amb la finalització d'aquest projecte el 2003. Una curiositat sobre el PGH és la manera com es va decidir el cost econòmic d'aquest projecte. Segons explica el professor Grisolía, als responsables del PGH se'ls va dir que «no demanessin molts diners perquè llavors no els farien cas». Per tant, com que l'ADN humà està compost per tres mil milions de parells de bases, aproximadament, van decidir demanar 1 dòlar per cada parell de bases, és a dir, tres mil milions de dòlars, que finalment els els van concedir.

Per intentar resumir tots els èxits que va aconseguir com a investigador, podríem dir que, en el camp de l'enzimologia, va realitzar una tasca extraordinària en la identificació i caracterització de molècules intermediàries del cicle de la urea. Mitjançant les seues aportacions a l'aclariment de tots els passos d'aquest procés metabòlic, va contribuir a l'avanç en el coneixement d'aquest i també a posar de manifest la importància que té aquest cicle en relació amb la nutrició, ja que aquest guarda una estreta relació amb la nutrició. L'ésser humà necessita incorporar els aminoàcids essencials mitjançant la dieta. En el procés de degradació d'aquests aminoàcids, es produeix amoni, que és tòxic per als humans. El cicle de la urea transforma aquest amoni tòxic en un producte inòcua, la urea. Si hi ha un error en el metabolisme de l'amoni derivat de la degradació dels aminoàcids, es a dir, un error en el cicle de la urea, per un defecte d'un enzim o d'un transportador, alguna de les etapes intermèdies no transcorrerà amb normalitat i els compostos anteriors a aquesta reacció s'acumularan, mentre que els compostos posteriors no se sintetitzaran. Això provocarà un augment d'amoni a la sang i al cervell, condició coneguda com a *hiperamonèmia*. Aquest defecte es tracta mitjançant una combinació de medicaments i mesures dietètiques. Podem distingir dues fases en el tractament de la hiperamonèmia: aguda i crònica. En la fase aguda es pretén normalitzar les concentracions d'amoni al més ràpidament possible, mentre que el tractament crònic, a llarg termini, es basa fonamentalment en recomanacions nutricionals, adaptant la ingesta proteica a la tolerància individual, evitant valors plasmàtics d'amoni superiors a 50 $\mu\text{mol/L}$ (o en el rang dels valors normals per a cada laboratori).

Alguns dels metabòlits intermediaris en el cicle de la urea tenen altres funcions, a més de la de formar part del procés de síntesi de la urea. És el cas, per exemple, de la citrul·lina, que té la capacitat de produir la relaxació de vasos capil·lars. Aquest aminoàcid no proteic és sintetitzat en l'organisme a partir d'ornitina, però també es pot incorporar a l'organisme provinent de certes fruites, verdures o peix.

Per tot això, podem ratificar que el professor Grisolí ha contribuït enormement al coneixement del cicle de la urea, descobrint metabòlits intermediaris, aïllant i caracteritzant enzims i demostrant l'ocurrència de processos, com ara la fixació de diòxid de carboni en etapes intermèdies del cicle. La relació d'aquest cicle metabòlic amb la nutrició es posa de manifest precisament per la funció principal del cicle: eliminar l'amoni generat en la degradació dels aminoàcids, generant un compost inòcua per a l'organisme. I no només el cicle de la urea és important per a la nutrició, sinó que la nutrició també és important per al cicle de la urea, ja que el tractament a llarg termini de malalties causades per errors en aquest cicle metabòlic inclou, a més d'un tractament farmacològic, recomanacions nutricionals encaminades a mantenir un nivell d'amoni en el plasma dins dels límits de tolerància per als individus afectes. D'aquesta manera es pot millorar el pronòstic i la qualitat de vida d'aquests pacients.

Actualment, el professor Grisolí treballa al Consell Valencià de Cultura, organisme del qual és president, i a la Fundació Valenciana d'Estudis Avançats, on exerceix el càrrec de secretari vitalici.

A més dels seus èxits professionals, s'ha de remarcar la gran humanitat, l'honestat, l'amor a les seues arrels i a la seua família. El tracte proper i afable cap als que som els seus admiradors i intentem aprendre d'ell cada dia. El professor té dos fills, James Santiago i Williams, i tres nets, Michael, Francisco i Gianna. El seu fill James va néixer a Wisconsin, va estudiar a la Universitat de Yale i és neuròleg, professor de la Universitat de Califòrnia i cap de Neurologia del Mercy Hospital de San Diego. El seu fill Williams va néixer a Kansas, és advocat i assessor legal a Los Angeles, i està molt introduït en la política americana.

Al llarg de la seua extensa carrera investigadora, el professor Grisolí va aconseguir aïllar més de vint enzims, i va ser capaç d'aconseguir la cristallització de quatre d'ells (figura 7). Tots els seus descobriments han tingut un gran impacte en la comunitat científica. De fet, ha estat nominat diverses vegades al Premi Nobel de Química i ha rebut una gran quantitat de premis, nomenaments i mencions, entre les quals podem destacar:

- títol de marquès de Grisolí;
- Premi Príncep d'Astúries d'Investigació Científica i Tècnica;
- Gran Creu Orde Civil de Sanitat;
- Gran Creu de l'Orde Civil d'Alfons X el Savi;
- Alta Distinció de la Generalitat Valenciana;
- Medalla d'Or al Mèrit en Investigació i Educació Universitària;
- Medalla de Plata del Consell General de Col·legis Oficials de Farmacèutics;
- Medalla de la Unió Internacional de Bioquímica i Biologia Molecular;
- acadèmic honorari de la Reial Acadèmia de Medicina de València;
- acadèmic d'honor de la Reial Acadèmia de Doctors;

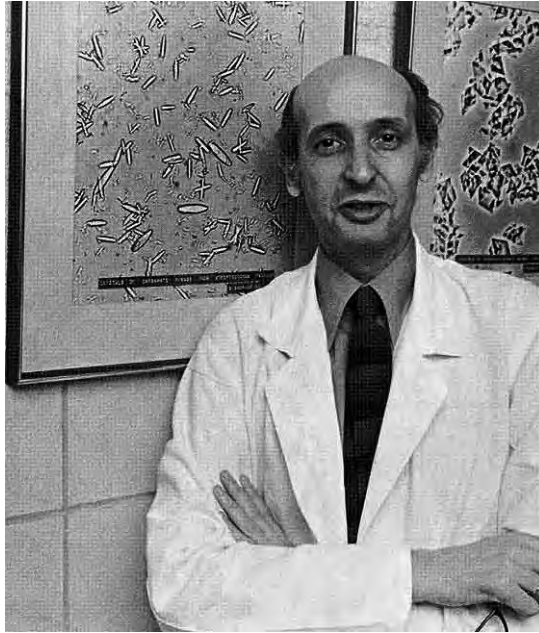


FIGURA 7. El professor Grisolía al costat d'una imatge d'enzims cristal·litzats a la Universitat de Kansas l'any 1960. Fotografia cedida per Santiago Grisolía.

- membre d'honor de la Reial Acadèmia de Medicina de Bèlgica;
- membre d'honor del Col·legi de Metges de Roma;
- membre d'honor de la Societat Espanyola de Bioquímica;
- membre d'honor de la Societat Espanyola de Fisiologia;
- membre d'honor de la Societat Internacional d'Enzimologia;
- doctor *honoris causa* per les Universitats de Salamanca, Barcelona, València, Madrid, Lleó, País Basc, Siena, Florència, Kansas, Las Palmas de Gran Canaria, la Universitat Politècnica de València, la Universitat de Lisboa, la Universitat de Castella - la Manxa, la Universitat de Valladolid i la UNED;
- acadèmic corresponent de l'Acadèmia de Ciències d'Espanya;
- membre de l'Acadèmia Europea de Ciències i Arts;
- Premi de la Societat Espanyola de Nutrició Comunitària a l'Excel·lència Científica;
- Premi a l'Excel·lència Professional en el Camp de la Salut (II Saló de la Dieta Mediterrània).

Fins al gener de 2014, és autor de més de 485 publicacions científiques, 8 llibres, més de 270 articles de divulgació general i una novel·la.

Actualment, el professor Grisolíia ocupa els càrrecs i les funcions següents:

- professor distingit emèrit «Sam E. Roberts» de bioquímica i biologia molecular del Centre Mèdic de la Universitat de Kansas (1996-);
- president executiu dels Premis Rei Jaume I;
- secretari de la Fundació Valenciana d'Estudis Avançats;
- president del Consell Valencià de Cultura (1996-);
- membre del Consell d'Administració de la Ciutat de les Arts i de les Ciències de València (1996-);
- president del Comitè Científic Assessor del Museu de les Ciències Príncep Felip de la Ciutat de les Arts i de les Ciències de València (1998-);
- vicepresident del Patronat del Centre d'Investigació Príncep Felip (1996-);
- president del Consell Assessor del Museu de Ciències de Conca (1998-);
- patró vitalici de la Fundació Museu de les Ciències Príncep Felip de la Ciutat de les Arts i les Ciències de València (2002);
- membre assessor del Ministeri de Sanitat, del Capítol Espanyol del Club de Roma i del Col·legi d'Emèrits;
- membre del Patronat de la Fundació Melchor Hoyos i de la Fundació Focus Abengoa, entre d'altres.

BIBLIOGRAFIA

- GRISOLÍA, S.; BURRIS, R. H. (1954). «Preparation of glutamate and carbamyl glutamate selectively labeled with deuterium». *J. Biol. Chem.*, núm. 210, p. 109-117.
- GRISOLÍA, S.; BURRIS, R. H.; COHEN, P. P. (1951). «Carbon dioxide and ammonia fixation in the biosynthesis of citrulline». *J. Biol. Chem.*, núm. 191, p. 203-209.
- GRISOLÍA, S.; COHEN, P. P. (1951). «Study of citrulline synthesis with soluble enzyme preparations». *J. Biol. Chem.*, núm. 191, p. 189-202.
- GRISOLÍA, S.; KORITZ, S. B.; COHEN, P. P. (1951). «Dissociation of respiration and enzymatic synthesis of citrulline». *J. Biol. Chem.*, núm. 191, p. 181-187.
- GRISOLÍA, S.; VENNESLAND, B. (1947). «Carbon dioxide fixation in isocitric acid». *J. Biol. Chem.*, núm. 170, p. 461-465.