



Rivoira, Giuseppe; Spanu, Antonino; Caredda, Salvatore (1979) *Prime indagini per la ricerca del fattore emolitico in Vicia faba*. Rivista di agronomia, Vol. 13 (1), p. 61-65. ISSN 0035-6034.

<http://eprints.uniss.it/4656/>

*Giuseppe Rivoira, Antonino Spanu, Salvatore Caredda*

Prime indagini per la ricerca del fattore emolitico  
in *Vicia faba*



*Estratto da*  
« RIVISTA DI AGRONOMIA »  
anno XIII - n. 1 - marzo 1979

# Prime indagini per la ricerca del fattore emolitico in *Vicia faba*<sup>(1)</sup>

Giuseppe Rivoira, Antonino Spanu, Salvatore Caredda<sup>(2)</sup>

Il favismo è una manifestazione morbosa che si evidenzia con una intensa crisi emolitica in seguito a ingestione di semi di fava da parte di individui predisposti alla malattia. Secondo alcuni Autori si possono verificare crisi emolitiche da favismo anche per semplice inalazione di polline della specie. Tuttavia tale ipotesi non è condivisa dalla maggior parte degli AA. che si sono occupati dell'argomento.

Il favismo è conosciuto da antica data, come si può rilevare da citazioni dei classici greci fra i quali Pitagora, Empedocle ed Erodoto.

Attualmente il favismo interessa numerose popolazioni distribuite in prevalenza nel bacino del Mediterraneo come indicato nella figura 1 (Sansone, Piga e Segni, 1958). Tuttavia, in relazione ai flussi migratori caratteristici della nostra moderna società la malattia si sta diffondendo anche in areali al di fuori del bacino del Mediterraneo.



Fig. 1 - Disegno schematico sulla diffusione del favismo nelle Nazioni del bacino mediterraneo.


 G-6-PD carenti  
G-6-PD deficient

Fig. 1 - Scheme of favism diffusion in the Nations of mediterranean area.

(1) Ricevuto il 20-6-1978. Comunicazione presentata al XII Convegno annuale della S.I.A. su « Le leguminose da granella », Padova 20-23 giugno 1978.

(2) Rispettivamente: Professore ordinario di Agronomia generale e Coltivazioni erbacee presso l'Università di Sassari; Contrattista Ministero P.I.; Assistente ordinario presso la Cattedra di Agronomia generale e Coltivazioni erbacee dell'Università di Sassari.

In Italia le frequenze più elevate di individui fabici (G-6-PD) carenti si riscontrano in Sardegna come indicato nella figura 2 che ne riporta la di-

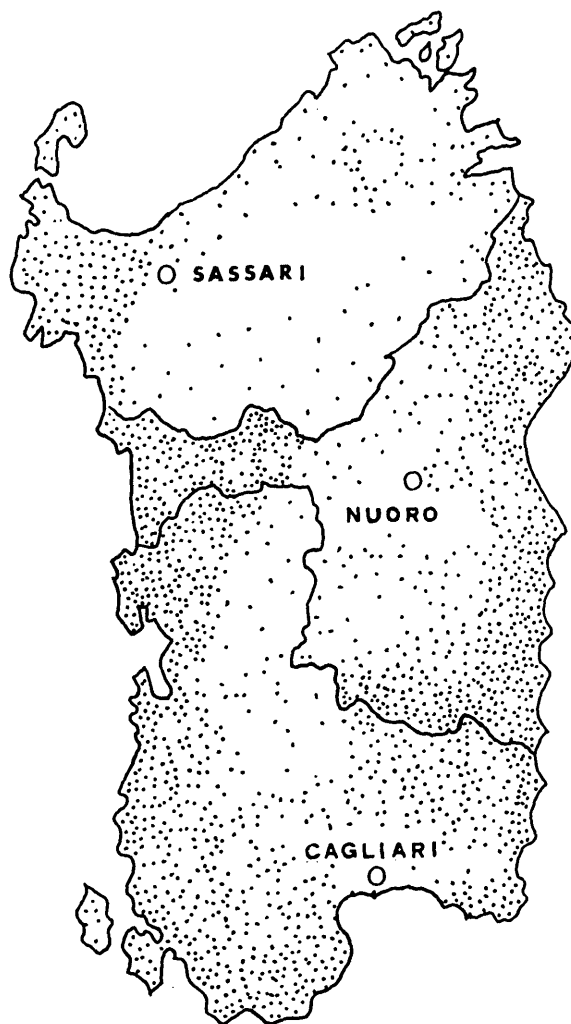


Fig. 2 - Distribuzione ed incidenza degli individui G-6-PD carenti in Sardegna. Su un campione di 3614 individui esaminati, 456, pari al 12,61%, sono risultati G-6-PD carenti.

Fig. 2 - Distribution and incidence of G-6-PD deficient subjects in Sardinia. Out of 3614 screened subjects, 456, equal to 12,61%, resulted to be G-6-PD deficient.

strubuzione e la incidenza. In alcuni centri abitati sono state riscontrate percentuali di circa il 50% di individui fabici. Il decorso della malattia, che come già detto si manifesta con imponenti crisi emolitiche, può avere esito letale se non si interviene in tempo con adeguate trasfusioni di sangue.

La malattia, negli areali caratterizzati da alte percentuali di individui fabici, comporta oneri sociali elevatissimi. Il costo giornaliero di una degenza è stato calcolato in circa 150.000 lire e il ricovero per una crisi emolitica si protrae per alcuni giorni. Sulla base di queste considerazioni il gruppo di lavoro di Ematologia e Immunologia dei Servizi Trasfusionali della Sardegna ha proposto agli organismi regionali la proibizione della coltivazione della *Vicia faba* nell'Isola. A questo punto l'opera dell'agronomo e del genetista è chiamata in causa.

Dal punto di vista clinico l'insorgenza della crisi emolitica in seguito a ingestione di semi di *V. faba* si verifica in individui carenti dell'enzima Glucosio-6-Fosfato-Deidrogenasi (G-6-PD), cioè in soggetti enzimopenici. Secondo l'ipotesi di Beutler fra le sostanze presenti in *V. faba* determinanti l'emolisi lo agente principale è la 3,4-diidrossifenil- $\alpha$ -alanina meglio nota come L(-) DOPA. Tuttavia, non tutti gli individui G-6-PD carenti vanno incontro a crisi emolitiche per ingestione di L(-) DOPA che, d'altra parte, è utilizzata nella cura del morbo di Parkinson. Beutler avanza l'ipotesi che l'L(-) DOPA non sia il diretto responsabile del favismo ma un precursore dell'agente emolitico Dopachinone. La trasformazione dell'L(-) DOPA in Dopachinone sarebbe da imputare ad un enzima: la Tirosinasi, secondo il meccanismo indicato nella figura 3 (Beutler, 1970). La variabilità e il polimorfismo individuale del sistema enzimatico tirosinasi spiegherebbe, secondo Beutler, il fatto che non tutti gli individui G-6-PD carenti siano soggetti a crisi emolitica in seguito a ingestione di L(-) DOPA.

Sulla base della ipotesi avanzata da Beutler è stata impostata la ricerca di cui si riferisce.

Su una collezione di 28 fra varietà e popolazioni di *V. faba* (*major* e *minor*) gentilmente messa

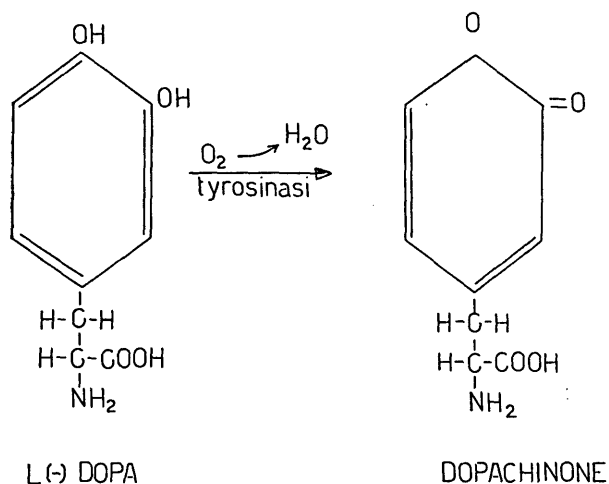


Fig. 3 - Ipotesi del Beutler.

Fig. 3 - Beutler hypothesis.

a disposizione dagli Istituti di Agronomia generale e Coltivazioni erbacee di Catania e Napoli e dal Centro Regionale Agrario Sperimentale di Cagliari, si è proceduto alla determinazione analitica del contenuto di L(-) DOPA<sup>(3)</sup>. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 1.

Il contenuto percentuale di L(-) DOPA sulla sostanza secca oscilla da un massimo di 2,40% nella *V. faba minor* « Favino Scuro Torre Lama » ad un minimo di 0,12% nella *V. faba major* « Motta » a seme verde e baccello tomentoso. Nella varietà di *V. faba major* « Trois fois blanche » non è stata riscontrata la presenza di L(-) DOPA.

A questo punto sulle varietà in esame era necessario il controllo clinico e biochimico che è stato effettuato in collaborazione con la Clinica Pediatrica e l'Istituto di Biochimica della Facoltà di Medicina dell'Università di Sassari. Sono state sottoposte ad analisi solo le tre varietà caratterizzate da contenuto in L(-) DOPA elevato (2,40%), basso (0,12%) e nullo. Il test di verifica *in vitro* è stato effettuato su semi freschi provenienti dalla varietà « Favino Scuro Torre Lama » a contenuto di L(-) DOPA elevato, dalla varietà « Motta » a seme verde e baccello tomentoso a basso tenore di L(-) DOPA e dalla varietà « Trois fois Blanche » caratterizzata da assenza di L(-) DOPA. È questo l'unico test attualmente disponibile per verificare la presenza di sostanze cui può essere imputata l'insorgenza di crisi emolitiche in individui G-6-PD carenti. La sperimentazione clinica purtroppo non dispone di animali cavia G-6-PD carenti nei quali indurre artificialmente l'emolisi, nè è oggi ipotizzabile una sperimentazione in vivo sull'uomo. Tuttavia, dalla letteratura specifica, si ha notizia di due razze di pecora, la « Finnish Landrace » e la « Tasmanian Merino », G-6-PD carenti, che potrebbero proficuamente essere utilizzate come animali cavia (Young e Nimmo, 1975).

Il test bio-chimico *in vitro* utilizzato si basa sul dosaggio del glutatione, totale ed ossidato, nei globuli rossi di enzimopenici a contatto con sostanze determinanti l'emolisi. Il glutatione è un tripeptide (acido glutamico, cisteina e glicina) contenuto in elevata quantità negli eritrociti e svolge funzione determinante nel trofismo dei globuli rossi quale trasportatore di idrogeno. A contatto con particolari sostanze chimiche, fra le quali alcuni farmaci, il glutatione passa dalla forma ridotta (GSH) alla forma ossidata (GSSG) e, nel caso di eritrociti di individui G-6-PD carenti, è bloccato il ritorno dalla forma ossidata alla forma ridotta con conseguente crisi trofica dell'eritrocita e quindi emolisi.

I risultati del test effettuato con gli estratti di semi delle tre varietà sono indicati nella tabella 2.

L'interpretazione dei risultati è stata data dai ricercatori medici che si occupano del problema, per

<sup>(3)</sup> Per la determinazione analitica dell'L(-)DOPA è stato adottato il metodo J. R. Doty (Ann. Chem., 1948-20-1166) modificato nella fase di estrazione per la quale si è proceduto con la seguente modalità: dopo aver sminuzzato finemente il campione con un frantumatore cellulare ed aggiunta la soluzione estraente a 3% di acido acetico, si congela alla temperatura di -12°C fino alla formazione di macrocristalli di ghiaccio. Subito dopo si effettua uno scongelamento brusco e si filtra sottovuoto.

TABELLA 1. - L (-) Dopa nei semi di *Vicia faba* (maior e minor) : % della sostanza secca.

TABLE 1. - L (-) Dopa in *Vicia faba* (maior e minor) : % of dry matter.

Nome	%	Nome	%
Scuro Torre Lama	2,40	Violetta di Poligoro (seme viola, baccello tomentoso)	0,33
Chiaro Torre Lama	1,12	Gesturi	0,32
368 (Prov. Algeria)	1,08	Aguadulce	0,31
Torralba N° 1	0,64	Corleone (seme verde, baccello tomentoso)	0,30
Torralba N° 2	0,59	Mussomeli (seme viola, baccello glabro)	0,27
Bortigali	0,53	Sassari	0,26
Caltagirone (seme verde, baccello tomentoso)	0,53	Linea 18	0,25
Leonforte (seme verde, baccello tomentoso)	0,52	Cuglieri	0,24
Sanluri	0,47	Mussomeli (seme verde, baccello tomentoso)	0,23
Ortacesus	0,44	Caltanissetta (seme verde, baccello tomentoso)	0,20
Mussomeli (seme verde, baccello glabro)	0,38	Linea 86	0,17
Serrenti	0,37	Mussomeli (seme viola, baccello tomentoso)	0,16
Caltanissetta (seme verde, baccello tomentoso)	0,37	Motta (seme verde, baccello tomentoso)	0,12
Suelli	0,37	Trois fois Blanche	assente

TABELLA 2. - Dosaggio in vitro del glutadione su sangue di individuo G-6-PD carente.

TABLE 2. - *In vitro* glutathione dosage on blood of G-6-PD deficient subject.

		Tempo 0° n moli/ml GR	Dopo 180° n moli/ml GR
CONTROLLO	GSH + GSSG	548	567
	GSSG	21,7	22,0
	SURNATANTE	0	0
Scuro Torre Lama L (-) Dopa : 2,40 %	GSH + GSSG	548	450
	GSSG	21,7	124
	SURNATANTE	0	36
Motta (seme verde, baccello tomentoso) L (-) Dopa : 0,12 %	GSH + GSSG	548	373
	GSSG	21,7	38,0
	SURNATANTE	0	0
Trois Fois Blanche L (-) Dopa : assente	GSH + GSSG	503	130
	GSSG	22,0	28,0
	SURNATANTE	0	0

i quali, l'elemento più importante non è la caduta del glutadione totale, che si verifica per tutte le tre varietà, rispetto al controllo, ma le variazioni del glutadione ossidato e del glutadione nel surnatante, cioè il glutadione che è fuoriuscito dai globuli rossi. Da questo punto di vista la varietà « Trois Fois

Blanche », nei cui semi è assente l'L(-) DOPA, potrebbe essere dotata di scarsa attività emolitica che, tuttavia, il test *in vitro* non è in grado di evidenziare.

Per quanto riguarda la caduta del glutadione totale che si è verificata anche nel test nel quale è

stato impiegato l'estratto della predetta varietà, priva di L(-) DOPA, si chiamano in causa altre sostanze presenti nei semi di *V. faba* e coinvolte nel determinismo della emolisi nei fabici (Engel, 1970). Fra queste si ricordano:

la divicina: 2,6-diamino-4,5-diidrossipirimidina  
la vicina: 2,6-diamino-4,5-diidrossipirimidina-5-( $\beta$ -d-glucopiranoside)  
l'isouramide: 2,4,5-triidrossi-6-aminopirimidina  
la convicina: 2,4,5-triidrossi-6-aminopirimidina-5-( $\beta$ -d-glucopiranoside)  
il dopaglusoside: 3,4-diidrossifenilalanina -( $\beta$ -d-glucopiranoside)  
da noi non determinate nelle varietà in esame.

Le risultanze ottenute hanno messo in evidenza una serie di difficoltà da superare nel perseguimento dell'obiettivo propostoci, cioè l'ottenimento di un ideotipo varietale che alle buone caratteristiche agronomiche unisca l'assenza nei semi dei principi attivi agenti del favismo.

I risultati riportati devono intendersi preliminari ad una serie di indagini successive e per le quali saranno necessarie ulteriori collaborazioni, nuovi test-biochimici più idonei ad evidenziare il materiale fitogenetico disponibile. Si prevede, inoltre, l'impiego delle razze di pecore G-6-PD carenti in precedenza citate.

## Riassunto

Il favismo è una manifestazione morbosa che si evidenzia con una intensa crisi emolitica in seguito a ingestione di semi di *Vicia faba* da parte di individui predisposti alla malattia e interessa numerose popolazioni distribuite in prevalenza nel bacino del Mediterraneo.

Dal punto di vista clinico l'insorgenza della crisi emolitica in seguito a ingestione di semi di *V. faba* si verifica in individui carenti dell'enzima Glucosio-6-Fosfato-Deidrogenasi. Secondo l'ipotesi di Beutler fra le sostanze presenti in *V. faba*, determinanti l'emolisi, l'agente principale è la 3, 4-diidrossifenil- $\alpha$ -alanina nota come L(-)DOPA.

In base alla ipotesi di Beutler, su una collezione di 28 fra varietà e popolazioni di *V. faba* (major e minor), è stato determinato il contenuto di L(-)DOPA che ha dimostrato una estrema variabilità.

Su tre varietà caratterizzate da elevato, basso e nullo contenuto di L(-)DOPA (*V. faba* minor: « Favino Scuro Torre Lama » 2,4%; *V. faba* major: « Motta » seme verde e baccello tomentoso 0,12%; *V. faba* major: « Trois Fois Blanche » assente) è stato effettuato un test biochimico *in vitro* basato sulla capacità degli estratti dei semi di *V. faba* ad ossidare il glutatione negli eritrociti di individui G-6-PD carenti.

La varietà caratterizzata da assenza di L(-)DOPA è quella che rispetto alle altre due prese in esame, ha determinato minore ossidazione.

Sulla base dei risultati ottenuti si è impostato un programma di ricerche che, attraverso ulteriori test-biochimici e l'impiego di pecore G-6-PD carenti, consenta l'ottenimento di varietà di *V. faba* priva dei fattori emolitici.

## Summary

FIRST INVESTIGATIONS RELATING THE RESEARCH OF HEMOLYTIC AGENT IN *VICIA FABAE*.  
G. RIVOIRA, A. SPANU and S. CAREDDA

Favism is a morbid manifestation which emphasizes itself by a keen hemolytic crisis, following the ingestion of *V. faba* seeds by subjects disposed to this illness affecting a number of populations mainly settled in the Mediterranean area.

By a clinical point of view, the hemolytic crisis uprising, due to the ingestion of *V. faba* seeds, occurs in G-6-PD deficient subjects. According to the hypothesis of Beutler, the main agent — among the substances found in *V. faba* and causing hemolysis — is 3, 4-Dihydroxyphenyl- $\alpha$ -alanine L(-)DOPA.

On the base of Beutler hypothesis, L(-)DOPA contents showing a high variability were detected out of a number of 28 *V. faba* (major and minor) varieties and populations.

Three varieties characterized by high, low and no content of L(-)DOPA (respectively, *V. faba* minor: « Favino Scuro Torre Lama » 2,4%; *V. faba* major: « Motta » green seed and tomentose pod 0.12%; *V. faba* major: « Trois Fois Blanche » no content) were used to carry out a biochemical test *in vitro*. This is based on the capacity of *V. faba* seed extracts of oxidising glutathione in the erythrocytes of G-6-PD deficient subjects.

The variety characterized by L(-)DOPA deficiency, compared with the other two in question, caused lesser oxidation.

On the base of the achieved results, a research plan was made which, by means of further biochemical tests and by utilizing G-6-PD deficient sheep, allow to get varieties of hemolytic-factors-deficient *V. faba*.

## Bibliografia

- BEUTLER, E., 1970. L(-)DOPA and Favism. Blood, vol. 36, 523.
- BO, G., MAIDA, A., PETTINATO, S. e MURESU, E., 1973. Aspetti epidemiologici della microcitemia, del favismo e della deficienza eritrocitaria di glucosio-6-fosfato-deidrogenasi in un campione della popolazione della Provincia di Sassari in Sardegna. Studi Sassaressi, sez. II, Med. 51.
- BO, G., MAIDA, A., PETTINATO, S. e MURESU, E., 1974. Microcitemia, manifestazioni fabiche e deficienza eritrocitaria di glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G-6-PD) nella popolazione della provincia di Sassari: aspetti epidemiologici e loro rapporti. Igiene Moderna, Fasc. 1.
- CARCASSI, U. e PIZZUS, F., 1957. Distribuzione geografica del favismo in Sardegna. Rapporti con la talassemia e la malaria. Arch. Ist. Sci. Med. Trop. Parass., 38, 357.
- ENGEL, A. B. et Coll., 1968. Methods for the detection of the toxic factor in broad beans (*Vicia faba*) which causes favism. Central Institute for Nutrition and Food Research - Rapport nr. R2765.
- ENGEL, A. B., 1970. Detection of the toxic factors in broad beans (*Vicia faba*). Central Institute for Nutrition and Food Research. Rapport NR. R. 3195.

- FARINA, E., PIU, P. e STRINNA, L., 1974. Estrazione della L(-)DOPA da *Vicia faba* ed altre piante del genere « Leguminose ». Boll. Soc. It. Biol. Sper. vol. 50.
- HUISMANS, J. W., 1971. *Investigations on favism*. Central Institute for Nutrition and Food Research. Rapport NR. R. 3473.
- JAMALIAN, J., 1978. *Favism - inducing toxins in Broad Beans (Vicia faba). Determination of Vicine Content and Investigation of Other Non-protein Nitrogenous Compounds in Different Broad Bean Cultivars*. J. Sci. Fd. Agric. 29, 136-140.
- MAIDA, A., PETTINATO, S. e BO, G., 1973. *Manifestazioni fabiche e Glucosio-6-Fosfato-Deidrogenasi: indagine epidemiologica nella popolazione della provincia di Sassari*. Haematologica, vol. 58, 1265.
- MAGER, J. et Coll., 1965. *Metabolic effects of pyrimidines derived from fava bean glycosides on human erythrocytes deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase*. Biochemical and Biophysical Research, vol. 20, 2.
- MAGGI, N., CASAVECCHIA, G. e CAVATORTA, L., 1969. *Determinazione automatica di L(-)DOPA in estratti di origine naturale*. Il Farmaco, Ed. Pr. vol. 25, fasc. 5.
- MELONI, T. e STANGONI, A., 1968. *Incidenza del deficit eritrocitario di G-6-PD fra i donatori del Centro Trasfusionale dell'Ospedale Civile SS. Annunziata di Sassari*. Studi Sassaressi, Fasc. 2-3.
- RAZIN, A. et Coll., 1968. *The oxidant effect of isouramil on red cell glutathione and its synergistic enhancement by ascorbic acid or 3,4-dihydroxyphenylalanine. Possible relation to the pathogenesis of favism*. Israel J. Med. Sci., 4, 852.
- ROWBOTTON, J., 1954. *The radiolysis of aqueous solutions of tyrosine*. Biol. Chem., 212, 877.
- SANSONE, G., PIGA, A. M. e SEGNI, G., 1958. *Il Favismo*. Ed. Minerva Medica.
- SMITH, J. E., 1976. *Animal Model: Glutathione Deficiency and Partial  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase Deficiency in Sheep*. American Journal of Pathology, vol. 82, n. 1.
- YOUNG, J. D. e NIMMO, I. A., 1975. *GSH Biosynthesis in Glutathione deficient erythrocytes from Finnish Landrace and Tasmanian Merino sheep*. Biochimica et Biophysica Acta, 404, 132-141.
- YOUNG, J. D., NIMMO, I. A. e HALL, J. G., 1975. *The relationship between GSH, GSSG and non-GSH thiol in GSH-deficient erythrocytes from Finnish Landrace and Tasmanian Merino sheep*. Biochimica et Biophysica Acta, 404, 124-131.