

DEFICIT DI G6PDH: Problematiche cliniche, prospettive diagnostiche e farmaci

Donatella Maffi

Dipartimento Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare – Istituto Superiore di Sanità-Roma

INTRODUZIONE

Il deficit di G6PD, nella sua manifestazione clinica nota come favismo, è una patologia conosciuta sin dai tempi dell'antica Grecia, tuttavia i primi riferimenti al favismo come patologia clinicamente definita risalgono al 1800 quando venne erroneamente classificato come fenomeno allergico a carattere familiare. Nel 1923 furono descritti i primi casi di anemia emolitica conseguente all'ingestione della primachina, un potente antimalarico, ma solo circa 30 anni più tardi, nel 1956, fu stabilito su basi scientificamente valide che l'emolisi conseguente alla somministrazione di primachina era dovuta alla carenza di un enzima del ciclo metabolico dei pentoso fosfati: la glucosio 6-fosfato deidrogenasi.

Oggi sappiamo che il deficit di G6PD è una malattia metabolica a carattere ereditario, con ereditarietà legata al sesso, dovuta a mutazioni del gene Gd, localizzato sul cromosoma X. Il gene mutato induce la sintesi di una proteina enzimatica alterata che non è più in grado di svolgere la sua funzione primaria, cioè mantenere nell'ambiente endocellulare un adeguato potenziale riducente per contrastare l'ossidazione dei componenti cellulari. La patologia, che rappresenta il più comune difetto enzimatico nell'uomo, si manifesta con una anemia emolitica che può essere acuta o cronica, a seconda della variante molecolare di g6pd responsabile del deficit, e con l'ittero neonatale, che, in alcuni casi, evolve in kernicterus con esito generalmente infausto. Tuttavia la maggior parte delle persone che ereditano questo difetto non manifestano alcuna sintomatologia in quanto l'anemia emolitica si manifesta solo in conseguenza dell'azione di un fattore esterno, che può essere un farmaco, un alimento o una tossina fortemente ossidanti, sui globuli rossi portatori del deficit enzimatico.

1. Epidemiologia

Le aree geografiche con una forte prevalenza del deficit di G6PD corrispondono alle zone in cui la malaria è stata o è ancora endemica. La malaria è una malattia con una elevata morbilità e mortalità e quindi ha una potente forza selettiva nella popolazione umana. Da queste osservazioni è nata l'ipotesi, poi ampiamente dimostrata, che il deficit di G6PD, conferendo protezione dalla malaria, sia stato da essa selezionato.

Una recente revisione sistematica della letteratura sulla prevalenza globale del difetto enzimatico, dal 1960 al 2008, stima una prevalenza dei soggetti carenti pari al 5% della popolazione mondiale. Le aree in cui il deficit è più diffuso sono: l'Africa, l'Europa meridionale e in particolare il bacino del Mediterraneo, l'India, il Medio Oriente e il Sud-Est Asiatico dove la prevalenza varia in relazione alle regioni e alle diverse etnie e infine il Sud America. La presenza del deficit in Nord America e nell'Europa del nord è dovuta ai flussi migratori, anche recenti. In Italia il deficit di G6PD è particolarmente diffuso nella valle del Po, in tutto il meridione e in Sicilia ma la prevalenza più alta si registra in Sardegna.

2. Struttura dell'enzima

Nel 1996 è stato pubblicato il primo modello della struttura tridimensionale della G6PD e nel 2000 è stata descritta la struttura del cristallo ottenuto dall'enzima umano. La G6PD è costituita da dimeri e tetrameri di una identica sub unità (monomero), l'enzima è attivo sia come dimero che come tetramero in un equilibrio dipendente dal pH. Ogni monomero, enzimaticamente non attivo, è formato da 515 aa ed ha un peso molecolare di 59kDa. Alcune regioni della molecola, critiche per le sue funzioni, sono state individuate perché si sono conservate inalterate durante l'evoluzione. In ciascun monomero sono presenti 2 domini altamente conservati: il dominio N-terminale, più piccolo, in cui è situato il sito di legame per il coenzima (NADP) e il dominio C terminale, di dimensioni maggiori, corrispondente all'interfaccia del dimero. I due domini sono collegati da una struttura ad alfa elica che contiene gli otto residui aminoacidici, totalmente conservati, che costituiscono il sito di legame per il substrato (G6P). Nell'enzima umano è presente un'altra sequenza altamente conservata, lontana dal sito attivo, ma vicina all'interfaccia del dimero, che accoglie una seconda molecola di NADP, detto NADP strutturale perché assolve l'importante funzione di stabilizzare la struttura quaternaria della proteina. Le mutazioni che danno origine alle forme più gravi di anemia, ad esempio l'anemia emolitica ereditaria, tendono a localizzarsi in questa regione.

3. Ruolo metabolico della G6PD

La principale funzione della G6PD è quella di proteggere dal danno ossidativo le proteine, i lipidi e le altre molecole cellulari; funzione che l'enzima, essendo ubiquitario, svolge in tutti i tessuti, ma che solo negli eritrociti, cellule prive di nucleo e mitocondri quindi non più in grado di effettuare la sintesi proteica, diventa essenziale per la sopravvivenza. I globuli rossi, in quanto trasportatori di ossigeno, sono particolarmente esposti alle ossidazioni sia per la continua generazione nel loro interno di radicali dell'ossigeno dovuti alla conversione dell'emoglobina dalla forma desossigenata a quella ossigenata, sia perché esposti, nel torrente circolatorio, a varie fonti di ossidanti esogeni (tossine, metaboliti di farmaci o nutrienti e altre sostanze ossidanti).

La reazione catalizzata dalla G6PD, enzima che dà inizio al ciclo metabolico dei pentoso fosfati, produce NADPH, metabolita essenziale per contrastare le ossidazioni in quanto è un componente strutturale delle catalasi e rigenera il glutatione ridotto (GSH), indispensabile per l'attività della glutatione per ossidasi. Catalasi e Glutatione perossidasi sono enzimi in grado di detossificare il perossido di idrogeno che si produce dai radicali dell'ossigeno. L'attività della via metabolica dei pentoso-fosfati è, dunque, critica per un appropriato funzionamento del sistema antiossidante e nei dei globuli rossi, privi di mitocondri, rappresenta l'unica fonte di NADPH. La regolazione di questa via metabolica, alternativa alla glicolisi, dipende dal rapporto fra le concentrazioni del NADP e del NADPH che si comporta da inibitore parzialmente competitivo della G6PD. Negli individui normali, in condizioni stazionarie, il flusso metabolico del glucosio attraverso la via dei pentoso-fosfati è limitato perché la concentrazione di NADPH è quasi il doppio della concentrazione saturante e inibisce l'attività della G6PD, di conseguenza l'enzima esplica circa il 2% della sua attività potenziale e meno dell'1% del glucosio che attraversa la membrana cellulare viene metabolizzato dal ciclo dei pentosi. In condizioni di stress ossidativo, in seguito al consumo di NADPH impegnato nel contrastare le ossidazioni, viene meno l'inibizione della G6PD e la velocità del ciclo dei pentosi può aumentare fino a 20 volte al fine di produrre maggiori quantità di NADPH. Questa flessibilità del metabolismo soddisfa la particolare esigenza delle cellule rosse mature, incapaci di sintesi proteica, di resistere al danno ossidativo e spiega un aspetto caratteristico del difetto di G6PD a livello clinico: l'assenza di sintomi in condizioni fisiologiche stazionarie e lo sviluppo di crisi emolitiche in seguito a stress ossidativo. Nelle cellule con deficit di G6PD la quantità di NADPH prodotta è sufficiente solo al mantenimento dello stato stazionario, in presenza di uno stress ossidativo il primo evento biochimico cruciale è la diminuzione della concentrazione intracellulare di NADPH cui consegue la diminuzione del glutatione ridotto (GSH) attraverso la sua ossidazione a glutatione disolfuro.

4 Patofisiologia

Quando il GSH si esaurisce il radicale ossidrilico attacca i gruppi SH delle proteine e i lipidi di membrana con ulteriore produzione di radicali liberi, innescando così un processo di propagazione delle reazioni ossidative che danneggiano la cellula sia a livello metabolico che strutturale. I gruppi sulfidrilici dell'emoglobina e probabilmente di altre proteine vengono ossidati a disolfuri o sulfossidi che danno origine a precipitati di emoglobin denaturata (Corpi di Heinz) e alla formazione di emicromi che provocano danni irreversibili alla membrana, in particolare l'attività proteolitica anormale si associa ad un aumento del calcio intracellulare e al legame degli emicromi alle molecole di Banda 3. L'esito finale clinicamente importante è la distruzione dei globuli rossi che è sia intravascolare che extravascolare. Probabilmente i globuli rossi maggiormente danneggiati lisano in circolo, mentre i globuli rossi meno danneggiati sono riconosciuti come cellule anormali e divengono preda dei macrofagi nel sistema reticolo-endoteliale.

Questi fenomeni in condizioni normali, sono reversibili in quanto la metaemoglobina è ridotta per azione del NADH (proveniente dalla glicolisi) e dell'enzima NADH – metaemoglobina reductasi; i gruppi –SH, invece si rigenerano a spese del GSH mediante l'enzima glutatione reductasi. I globuli rossi carenti di GP6PD non sono in grado di rispondere in modo adeguato allo stress ossidativo mantenendo i livelli normali di NADPH e GSH quindi il processo di denaturazione ossidativa è amplificato rispetto alle cellule normali.

Anche quando le riserve di GSH diminuiscono durante il normale processo di invecchiamento dei globuli rossi i fenomeni ossidativi sono responsabili delle alterazioni metaboliche e strutturali che portano al riconoscimento e sequestro dei globuli rossi danneggiati o senescenti da parte dei macrofagi. Le crisi fatiche provocate dalle potenti sostanze ossidanti contenute nelle fave, o le crisi di emolisi acuta causate dai farmaci o da altre sostanze ossidanti possono, dunque, essere considerate come imponenti e rapidi processi di invecchiamento in una considerevole frazione della popolazione eritrocitaria. I GR patologicamente senescenti sono rimossi dal circolo in modo simile ai GR normalmente senescenti, ma la velocità del processo è aumentata.

5 Basi molecolari del Deficit di G6pd

La catena polipeptidica della G6PD è codificata dal gene costitutivo Gd, espresso in tutte le cellule, localizzato nella regione telomerica del braccio lungo del cromosoma X, banda Xq 28. La sequenza del gene è completamente nota, esso si espande per 18,5 kb ed è formato da 13 esoni e 12 introni; gli esoni hanno dimensioni che variano da 38 a 236 bp; gli introni, invece, sono tutti intorno ad 1 Kb di lunghezza fatta eccezione per l'introne II che si estende per 12 kb. Il significato funzionale di questo lungo introne è sconosciuto ma alcune sequenze in esso contenute potrebbero essere importanti ai fini di una trascrizione efficiente. Non tutti gli esoni sono codificanti, infatti esiste una lunga regione di mRNA corrispondente a tutto l'esone I e parte dell'esone II che non viene tradotta. Il codon di inizio della traduzione si trova nel II esone. La regione del promoter del gene Gd si trova nell'esone I e si estende per circa 1200 bp, contenuto in una GpC Island a monte del sito di inizio della trascrizione. Sembra, tuttavia che la porzione funzionale del promoter sia costituita da sole 150 paia di basi, sufficienti a garantire una sostanziale quantità di trascritto. Questa zona è stata denominata "Core del promoter".

Le mutazioni conosciute del gene, che danno origine ad altrettante varianti enzimatiche, sono circa 187 e almeno 35 degli alleli mutanti descritti sono polimorfici. Generalmente sono mutazioni puntiformi, localizzate nelle regioni codificanti del gene, che inducono la sintesi di una proteina meno stabile, se interessano le zone di contatto fra sub unità, o meno efficiente se interessano i siti di legame per il substrato o per il coenzima. Nessuna delle mutazioni descritte induce l'assenza totale dell'enzima che sarebbe incompatibile con la vita. Le delezioni nel gene Gd sono rare e interessano poche basi, generalmente tre o multipli di tre quindi danno sempre origine alla eliminazione di un codone piuttosto che ad un frame-shift. Un solo sito di splicing in 3' all'introne 10, nella giunzione introne 10/esone 11 è coinvolto in 2 mutazioni (G6PD Vansdorf e Zurich); il risultato è una delezione di 9 nucleotidi, dovuta all'attivazione di un sito di splicing criptico alternativo più a valle che non da origine a frameshift. L'unica mutazione nonsense, la G6PD Georgia, che origina una proteina tronca di circa 87 aa, completamente inattiva, è stata individuata in un soggetto eterozigote. Recentemente è stata descritta la combinazione di due mutazioni silenti la c1311C>T nell'esone 11 con la IVS11 T93C che dà luogo a un deficit di G6PD senza produrre alcuna alterazione della proteina enzimatica. In realtà in letteratura sono stati descritti diversi casi di deficit in cui le sequenze nucleotidiche codificanti non mostravano mutazioni; sfortunatamente non sono stati intrapresi ulteriori studi per ricercare altri possibili meccanismi di regolazione dell'espressione del gene, ad esempio il ruolo delle UTR, l'importanza della struttura secondaria dell'mRNA o il ruolo di proteine regolatorie o dei (mi) RNAs. Un solo lavoro descrive 3 SNP nella UTR e l'associazione di uno di essi con l'aplotipo 1311T/93C e ipotizza un ruolo regolatorio dell'SNP sulla stabilità dell'mRNA.

Le varianti di G6PD sono state classificate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, sulla base di criteri clinici e biochimici, in 5 classi. Le varianti di classe I presentano deficit severo (meno del 10-20% dell'attività normale) ed anemia emolitica cronica. Le varianti di classe II presentano deficit ancora più severo (< 10%) e rischio di episodi di anemia emolitica acuta. Le varianti di classe III presentano un deficit moderato (10-60%) e rari casi di anemia emolitica acuta. Le varianti di classe IV non presentano il deficit e sono asintomatiche, appartengono a questa classe la G6PD B e la G6PD A presente in Africa, che differisce dalla B per un aminoacido (asparagina per aspartico) in posizione 126.. Le varianti di classe V, infine, presentano attività enzimatica aumentata e sono asintomatiche

Poiché il gene della G6PD è localizzato sul cromosoma X, il deficit di G6PD viene ereditato come carattere legato al sesso, quindi, completamente espresso nei maschi emizigoti e nelle femmine omozigoti e solo parzialmente nelle femmine eterozigoti. In realtà l'attività enzimatica delle femmine eterozigoti è estremamente variabile da soggetto a soggetto in un intervallo compreso tra valori quasi normali e valori marcatamente deficitari, come nei maschi emizigoti. Questo comportamento è dovuto al fenomeno del mosaicismo, cioè dalla inattivazione di uno dei due cromosomi X che avviene nei primi stadi dell'ontogenesi in tutte le cellule dell'embrione femminile. L'inattivazione può riguardare indifferentemente e con andamento casuale il cromosoma X di origine paterna o quello di origine materna. Una volta avvenuta, l'inattivazione si mantiene nella progenie cellulare. Di conseguenza nelle donne sono presenti, in proporzioni variabili da soggetto a soggetto, due tipi di cellule somatiche che differiscono nell'espressione dei rispettivi geni allelici.

8 Diagnosi

Per la diagnosi del deficit di G6PD è necessario dimostrare la carenza di attività enzimatica nei globuli rossi. In pratica viene saggiata la formazione di NADPH nell'emolisato mediante metodi quantitativi spettrofotometrici. Come test di screening si possono utilizzare diversi metodi qualitativi o semiquantitativi.

L' International Council for Standardization in Haematology ha raccomandato come metodo quantitativo il dosaggio spettrofotometrico dell'attività enzimatica nell'emolisato e per lo screening lo spot test di fluorescenza.

Il dosaggio enzimatico, se applicato alla popolazione maschile, presenta sensibilità e specificità elevatissime. Bisogna però tenere presente che l'attività enzimatica misurata dopo una crisi emolitica, nei neonati e comunque in un campione con reticolocitosi risulta più alta perché le cellule giovani contengono una maggior quantità di enzima efficiente. Questo può comportare una certa quota di risultati falsi negativi quando si utilizzano i test di screening e nel dosaggio delle femmine eterozigoti. Nessun test biochimico è in grado di diagnosticare accuratamente le femmine eterozigoti con fenotipi estremi, cioè quelle in cui l'inattivazione del cromosoma X è fortemente sbilanciata e l'attività enzimatica risulta normale o simile a quella di un emizigote o omozigote. In questi casi si deve ricorrere all'analisi del DNA.

9 Manifestazioni cliniche

Favismo

Il favismo è una malattia emolitica provocata dall'ingestione di fave. La possibilità che si scateni una crisi emolitica dopo il contatto con le piante di fave o l'inalazione del polline è molto controversa, ma l'ingestione del legume è certamente una causa di emolisi acuta, tradizionalmente denominata favismo ittero-emoglobinurico.

Una caratteristica peculiare del favismo è l'erraticità, non tutti gli individui carenti di G6PD vanno incontro a crisi emolitiche dopo un pasto a base di fave e uno stesso individuo può dimostrare sensibilità alle fave solo in certi periodi della sua vita, ad esempio durante l'infanzia oppure in tarda età. Il deficit di G6PD, dunque, è una causa necessaria ma non sufficiente delle crisi faboliche.

Le crisi emolitiche sono scatenate da alcune sostanze ossidanti contenute nelle fave: vicina, convicina, ascorbato, L-DOPA. Le molecole maggiormente coinvolte sono probabilmente vicina e convicina, beta-glicosidi delle pirimidine, che nell'intestino vengono convertite da una beta-glicosidasi nei rispettivi agliconi vicina e isouramile; questi composti vanno incontro ad autossidazione e formano radicali liberi che a loro volta provocano la formazione di specie attive dell'ossigeno e l'ossidazione del GSH, attivando, negli eritrociti carenti di G6PD, la catena di reazioni che porta alla emolisi.

Le reazioni che intervengono sono complesse e diversificate, quindi difficilmente prevedibili. Le beta-glicosidasi, presenti in quantità variabile sia nelle fave che nella mucosa intestinale del consumatore, possono giocare un ruolo importante nel determinare la quantità e la velocità di produzione degli agliconi attivi. Da queste considerazioni si fa strada l'ipotesi che nel favismo oltre alla presenza del deficit siano implicati ulteriori fattori genetici e/o acquisiti, coinvolti nel catabolismo delle sostanze ossidanti presenti nella fave. L'attacco emolitico è improvviso inizia con malessere, debolezza e dolori addominali. Dopo alcune ore o al massimo entro 2/3 giorni si manifestano ittero ed emoglobinuria. L'anemia normocitica, normocromica può essere moderata o estremamente severa. Generalmente il favismo si associa alle varianti di G6PD di classe II che provocano deficit severo, come la G6PD Mediterranea, ma sono descritti casi di favismo anche con la variante G6PD A- di classe III.

AHA indotta da farmaci

La causa primaria dello stress ossidativo provocato dall'assunzione di alcuni farmaci è la reazione del farmaco, o più probabilmente di un suo metabolita, con l'ossiemoglobina da cui si originano molecole con forte potere ossidante. Le crisi emolitiche si manifestano dopo alcuni giorni dall'ingestione del farmaco. Rispetto alle crisi dovute all'assunzione di fave, l'incipit è più lento ma la sintomatologia e il decorso clinico sono molto simili. La gravità delle manifestazioni cliniche, come per il favismo, è molto variabile e dipende sia da caratteristiche individuali che del farmaco. I fattori che influenzano la severità dell'emolisi acuta sono principalmente la dose e le modalità di somministrazione del farmaco, l'attività enzimatica e l'invecchiamento dei globuli rossi. Nel caso di varianti di classe III, come la A-, l'emolisi indotta da farmaci è generalmente autolimitante, perché nelle cellule più giovani l'attività della G6PD è maggiore, quindi man mano che la popolazione eritrocitaria, in risposta all'evento emolitico, si ricostituisce, l'attività enzimatica aumenta e l'emolisi rallenta, si parla in questo caso di "emolisi compensata" o "fase resistente". In presenza di varianti enzimatiche di classe II, come la G6PD Mediterranea, l'emolisi continua senza effetto compensatorio perché l'attività enzimatica è molto compromessa anche negli eritrociti più giovani. Il fenomeno della fase resistente è importante anche per le modalità di somministrazione del farmaco infatti dose frazionate dello stesso farmaco sono meglio tollerate in quanto la prima somministrazione stimola la produzione di reticolciti più resistenti alla dose successiva.

AHA indotta da infezioni

Le malattie infettive che più spesso hanno indotto attacchi emolitici acuti nei pazienti carenti di G6PD sono state la polmonite, l'epatite e la febbre tifoide, ma anche le infezioni virali delle vie respiratorie superiori o quelle gastrointestinali. L'emolisi indotta da agenti infettivi è probabilmente dovuta al rilascio di perossidi durante il processo di fagocitosi da parte dei granulociti.

10 Farmaci potenzialmente emolitici per i portatori di deficit di G6PD

Dopo i primi studi sulle proprietà emolitiche della primachina, per anni i farmaci con proprietà ossidanti sono stati considerati la causa principale delle crisi emolitiche nei pazienti con deficit di G6PD, da ciò è nata l'esigenza di elencare tutte le sostanze che potevano rappresentare un rischio di emolisi.

Il primo elenco dei farmaci segnalati come emolitici per i soggetti con deficit di G6PD è stato pubblicato sul bollettino dell'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 1989. Da allora sulla base di dati clinici e di laboratorio disponibili sono state proposte dalla letteratura scientifica liste di farmaci, classificati secondo diverse categorie di rischio. Nel corso degli anni le liste sono state spesso revisionate, alcuni farmaci sono stati eliminati semplicemente perché non più in uso, altri, in particolare gli antibatterici, perché gli episodi di AHA inizialmente attribuiti al farmaco erano più probabilmente dovuti all'infezione stessa.

Recentemente è stato pubblicato un lavoro di revisione sistematica della letteratura sul potenziale emolitico dei farmaci in soggetti con deficit di G6PD. Gli autori concludono che i farmaci per i quali l'effetto emolitico nei pazienti con deficit di g6pd è sostenuto da evidenze robuste sono solo 7 (Dapsone, Blu di metilene, Nitrofurantoina, Fenazopiridina, Primachina, Rasburicasi, Blu di tulidina). Luzzatto nel suo ultimo lavoro presenta una lista leggermente più lunga ritenendo che la medicina basata sulle evidenze sia un approccio valido per stabilire l'efficacia di un farmaco, ma per quanto riguarda gli effetti collaterali anche un caso isolato, se ben documentato, deve essere preso in seria considerazione.

Particolare menzione come farmaci emolitici meritano il blu di metilene e la rasburicase. Il primo usa per il trattamento della metaemoglobinemia perché favorisce la trasformazione della metaemoglobina in emoglobina per mezzo della metaemoglobina reduttasi NADPH dipendente. Se un paziente con deficit di G6PD presenta metaemoglobinemia, il trattamento con blu di metilene non fa che peggiorare la situazione provocando AHA. Recentemente il blu di metilene è stato usato in combinazione con l'artemisina come antimalarico per la sua azione gametocida contro il Plasmodium Falciparum, una dose di 15mg/pro Kg/pro die ha provocato episodi emolitici significativi in bambini con deficit di G6PD in Burkina Faso.

La rasburicasi (enzima urato ossidasi prodotto con tecniche di ingegneria genetica) è un farmaco, licenziato circa 10 anni fa per il trattamento della iperuricemia associata alla sindrome da lisi tumorale (TLS). Come per le altre ossidasi uno dei prodotti della reazione enzimatica della rasburicasi è il perossido di idrogeno, di cui si produce una molecola per ogni molecola di acido urico che viene catabolizzato. Nelle cellule normali il perossido di idrogeno è prontamente degradato dalla glutatione per ossidasi (GSHPX) o dalla catalasi, ma nelle cellule con deficit l'attività della GSHPX è ridotta dalla mancanza di adeguate quantità di GSH e anche l'attività della catalasi è ridotta a causa della bassa concentrazione intracellulare di NADPH. Come risultato di questo meccanismo è presumibile che nei pazienti con deficit si sviluppi AHA e metaemoglobinemia. Inoltre bisogna considerare che la rasburicasi è utilizzata in pazienti con sindromi tumorali (leucemia, linfoma, tumori solidi) che, in seguito alla chemioterapia possono sviluppare TLS. Questo significa che il farmaco è somministrato a malati gravi che possono già essere anemici e a rischio di insufficienza renale. Dunque l'uso di questo farmaco è fortemente controindicato nelle persone affette da deficit di G6PD e prima della sua somministrazione si dovrebbe sempre effettuare il test per la G6PD, perché non sempre la presenza del deficit è desumibile dall'anamnesi. I centri per il trattamento di leucemie e linfomi dovrebbero essere equipaggiati per effettuare il test della G6PD così come i centri di neonatologia dove la rasburicasi si usa per il trattamento del danno renale acuto.

11 Valutazione del potenziale emolitico di un farmaco

Studi preclinici

Nessuno dei metodi attualmente disponibili per stabilire il potenziale emolitico di un farmaco in soggetti con deficit di G6PD si può considerare affidabile. Sono disponibili diversi metodi *in vitro* che valutano il potenziale emolitico del farmaco messo a contatto con eritrociti normali e/o carenti attraverso diversi tipi di indicatori, quali: misurazione del livello di emolisi, del livello di glutatione ridotto, dell'attività della ciclo metabolico dei pentoso fosfati oppure della quantità di Hb precipitata sotto forma di corpi di Heinz.

Benché i test *in vitro* siano stati e siano tuttora uno strumento utile all'industria farmaceutica per studiare il rischio di emolisi associato ai farmaci, tuttavia spesso hanno dato luogo a risultati sia falsamente positivi che falsamente negativi; probabilmente perché gli eritrociti vengono messi a diretto contatto con il farmaco, ma

non con i suoi metaboliti diversamente da quanto avviene *in vivo*. Sono stati messi a punto quindi metodi *in vitro* in grado di simulare il più possibile le condizioni fisiologiche mettendo a contatto gli eritrociti normali e/o carenti con i metaboliti del farmaco in esame. Benché alcuni di questi test, come il test di Welt, siano stati validati mediante l'analisi di farmaci di cui è noto il potenziale emolitico *in vivo*, il loro impiego nella fase preclinica della valutazione di nuovi farmaci non è molto diffuso.

Una nuova frontiera nel campo della valutazione *in vitro* del potere ossidante di un farmaco in cellule carenti di G6PD potrebbe essere l'impiego delle linee cellulari G6pd Δ , linee cellulari embrionali di topo in cui il gene G6PD è stato inattivato per mezzo di ricombinazione omologa, prodotte da gruppo di Filosa nel 2003. Queste cellule potrebbero essere usate per generare linee cellulari murine portatrici delle più comuni varianti di G6PD con le quali testare *in vivo* gli effetti di nuovi farmaci

Studi clinici

Gli studi clinici mirati alla valutazione degli effetti emolitici di nuovi farmaci nei soggetti portatori del deficit di G6PD sono di difficile attuazione, sia per la quota di rischio dovuta all'esposizione, seppur volontaria, dei carenti al trattamento farmacologico, sia per la difficoltà di reclutare un numero statisticamente valido di soggetti rappresentativi delle varianti di G6PD predominanti nel bacino di utenza del farmaco.

Un buon compromesso è rappresentato da un protocollo per i trial clinici descritto da Beutler per i farmaci antimalarici nelle zone a rischio.

Il protocollo propone nella fase iniziale della sperimentazione clinica di un farmaco, da diffondere in popolazioni con prevalenza del deficit di G6PD, la valutazione del potenziale emolitico mediante il test di Welt che presenta un buon potere predittivo. Successivamente si passa alla sperimentazione clinica propriamente detta (studi clinici di fase II o III) saggiando il farmaco su gruppi di soggetti portatori. Per limitare la gravità degli eventuali eventi emolitici, nel trial clinico si arruolano donne eterozigoti per il deficit di G6PD di tipo A- (classe III), nelle quali sia presente una frazione di cellule carenti superiore al 50%, stabilito sulla base di test biochimici o citochimici, per poi passare a successivi trials su gruppi di soggetti maschi emizigoti e/o femmine omozigoti e quindi a carenti portatori di varianti maggiormente emolitiche per confermare o meno i risultati negativi.

Questo tipo di trial clinico ha avuto l'approvazione dei comitati etici, ma è difficilmente realizzabile per la difficoltà di reclutare un numero statisticamente valido di volontari.

Uno dei possibili strumenti utili per ulteriori conoscenze sull'effetto dei farmaci nei portatori di deficit enzimatico è l'attività di farmacovigilanza. Molti dei dati in letteratura sono infatti report di segnalazioni di reazioni avverse.