

DOPING: SOSTANZE E METODI

La definizione di doping secondo la LEGGE 14 dicembre 2000, n°376 (art. 1) del Ministero della Salute è la seguente:

Costituiscono doping: la somministrazione o l'assunzione di farmaci o di sostanze biologicamente o farmacologicamente attive e l'adozione o la sottoposizione a pratiche mediche non giustificate da condizioni patologiche ed idonee a modificare le condizioni psichiche o biologiche dell'organismo al fine di alterare le prestazioni agonistiche degli atleti”

DOPING

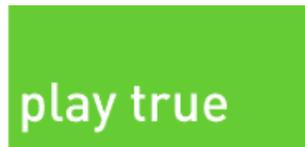
E' l'uso (o abuso) di sostanze o medicinali con lo scopo di aumentare artificialmente il rendimento fisico e le prestazioni dell'atleta.

Il doping è vietato dai regolamenti sportivi che:

- Regolano l'utilizzo dei farmaci
- Stabiliscono controlli anti-doping

Il Comitato Internazionale Olimpico e le Federazioni Nazionali, nel 1998 formarono l'**Agenzia Mondiale Anti-Doping:**

WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA)



WADA emette e aggiorna costantemente il

Codice Mondiale Anti-Doping

DOPING

IL RENDIMENTO SPORTIVO PUÒ ESSERE IMPLEMENTATO CON SOSTANZE

che aumentano il rendimento muscolare



- Ormoni steroidei (androgeni, estrogeni, progestinici)
- Eritropoietina
- Ormone GH
- IGF-1

che agiscono a livello del SNC



- Amfetamine
- Cocaina
- Efedrina
- Metilefedrina

UNA DELLE MAGGIORI SFIDE PER I LABORATORI ANTI-DOPING È QUELLA DI :

RICONOSCERE e RILEVARE l'abuso di sostanze illecite

Sostanze Proibite sempre

«in e out» competizione:

- S.1 Agenti anabolizzanti
- S.2 Ormoni e sostanze correlate
- S.3 Beta-2 agonisti
- S.4 Agenti con attività anti-estrogenica
- S.5 Diuretici ed agenti mascheranti



Sostanze Proibite in competizione:

- S.6 Stimolanti
- S.7 Narcotici
- S.8 Derivati della cannabis
- S.9 Farmaci Corticosteroidi

Sostanze proibite in particolari discipline sportive

P1.Alcool, proibito nelle competizioni di automobilismo (>0.10 g/L), arco (>0.10 g/L), biliardo (>20 g/L), karate (>0.10 g/L), ecc.

P2.Beta-bloccanti (es. atenololo, labetalolo, metoprololo, nadololo, sotalolo, timololo, ecc.) , proibito nelle competizioni di automobilismo, arco, bridge, ginnastica, nuoto sincronizzato, ecc.

**L'uso di qualsiasi sostanza
dopante è accompagnato da
effetti collaterali.**

Meccanismi d'azione e reazioni
avverse delle principali sostanze
dopanti

SOSTANZE PROIBITE E REAZIONI AVVERSE

Sostanze Proibite sempre

«in e out» competizione:

- S.1 Agenti anabolizzanti
- S.2 Ormoni e sostanze correlate
- S.3 Beta-2 agonisti
- S.4 Agenti con attività antiestrogenica
- S.5 Diuretici ed agenti mascheranti



Sostanze Proibite in competizione:

- S.6 Stimolanti
- S.7 Narcotici
- S.8 Derivati della cannabis
- S.9 Farmaci Corticosteroidi

Steroidi anabolizzanti: Testosterone, Nandrolone....

S1. Anabolizzanti

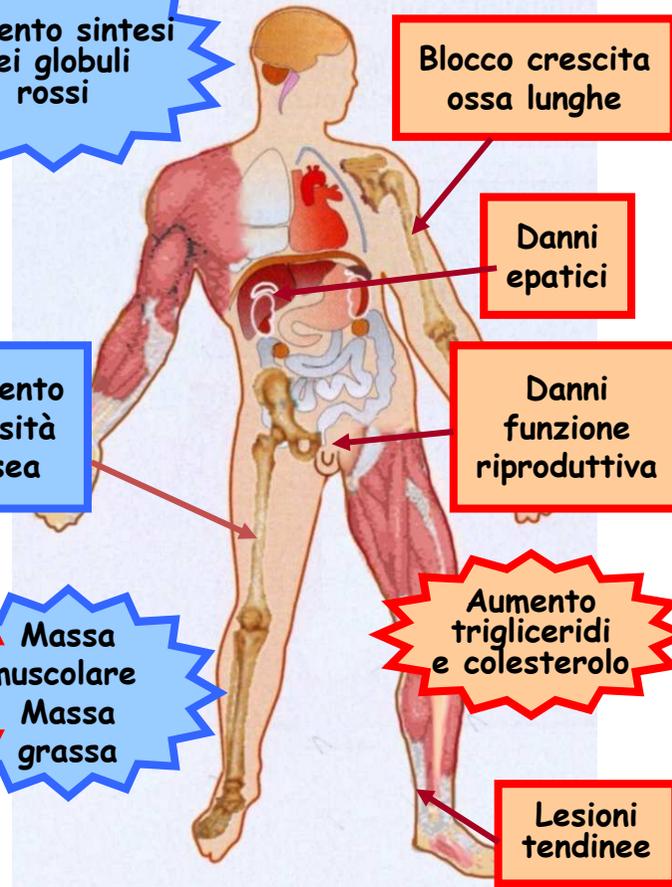
Effetti

- Aumento della massa muscolare
- Diminuzione della massa grassa
- Aumento della resistenza alla fatica
- Diminuzione azione catabolica dei glucocorticoidi
- Aumento della sintesi dei globuli rossi
- Aumento della densità ossea

Aumento sintesi dei globuli rossi

Aumento Densità ossea

↑ Massa muscolare
↓ Massa grassa



Acne

Blocco crescita ossa lunghe

Danni epatici

Danni funzione riproduttiva

Aumento trigliceridi e colesterolo

Lesioni tendinee

Reazioni avverse

Nel maschio (età pre-puberale)

- Blocco crescita ossa lunghe
- Inibizione della spermogenesi

Nel maschio (età adulta)

- Oligospermia/azospermia
- Atrofia testicolare
- Ipertrofia prostatica
- Alterazione della funzione epatica con possibilità di tumori
- Aumento dei lipidi plasmatici

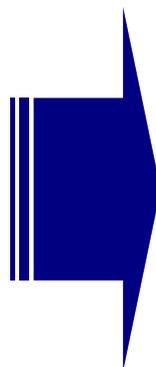
Nella donna

- Soppressione della funzione ovarica
- Atrofia della ghiandola mammaria
- Virilizzazione
- Alterazione della funzione epatica con possibilità di tumori

Gli steroidi anabolizzanti



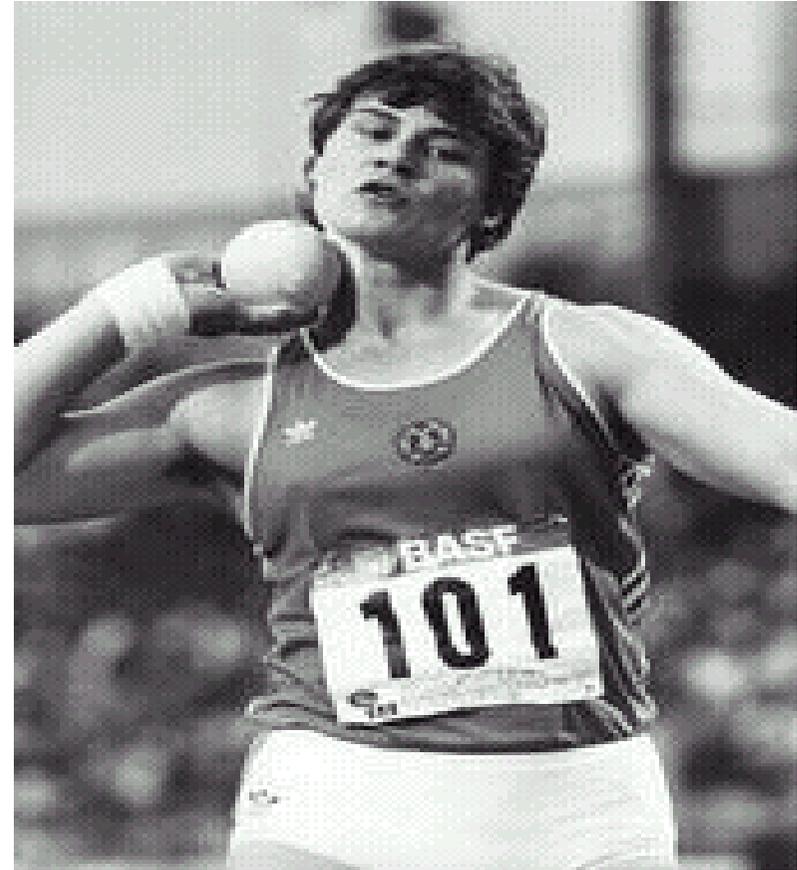
Jennifer Capriati



Possono trasformare un atleta
in meno di due anni

Qualche volta sono così efficaci...

....da trasformare
direttamente una
donna in un uomo
come Heidi
Krieger





**Heidi Krieger oro
nel lancio del peso
agli Europei 1986
all'età di 21 anni**



Oggi Andreas Krieger

S2. ORMONI E SOSTANZE CORRELATE

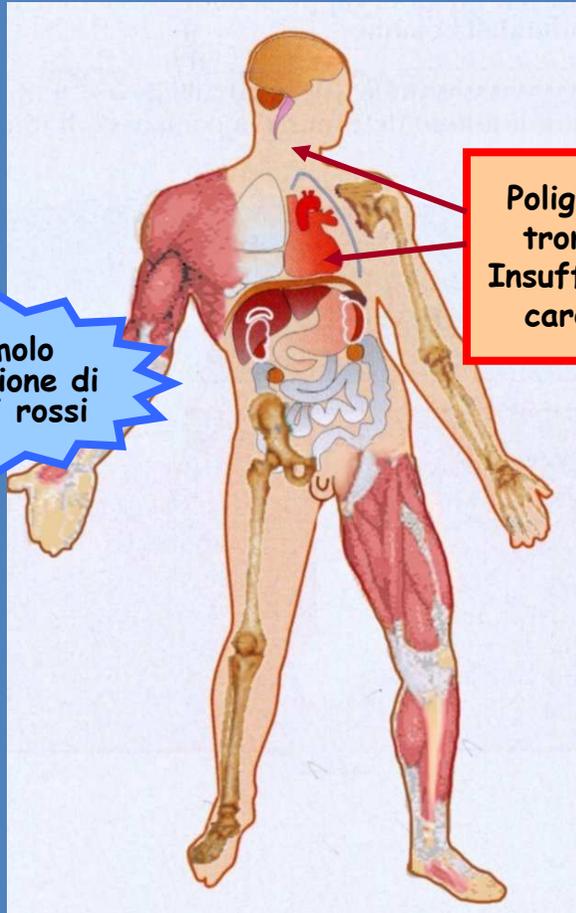
1. Agenti stimolanti l'eritropoiesi [es. **eritropoietina EPO**];
2. Gonadotropina corionica (CG) e Ormone luteinizzante (LH) proibiti negli uomini;
3. **Insuline**;
4. Corticotropine;
5. Fattori di crescita: **Ormone della crescita (GH)**, fattore di crescita insulino-simile (IGF-1), Fattori di crescita meccanici (MGF), fattori di crescita di derivazione piastrinica (PDGF), fattori di crescita del fibroblasto (FGF), fattore di crescita vascolare-endoteliale (VEGF) e fattore di crescita degli epatociti (HGF) ed altri fattori di crescita riguardanti muscoli, sintesi/degradazione delle proteine dei tendini o dei legamenti, vascolarizzazione, utilizzazione di energia, capacità rigenerativa o commutazione del tipo di fibra

S2- Eritropoietina (EPO)

Effetti

- Stimola la produzione dei globuli rossi
- Aumenta la capacità di trasporto dell'ossigeno

Stimolo
produzione di
globuli rossi



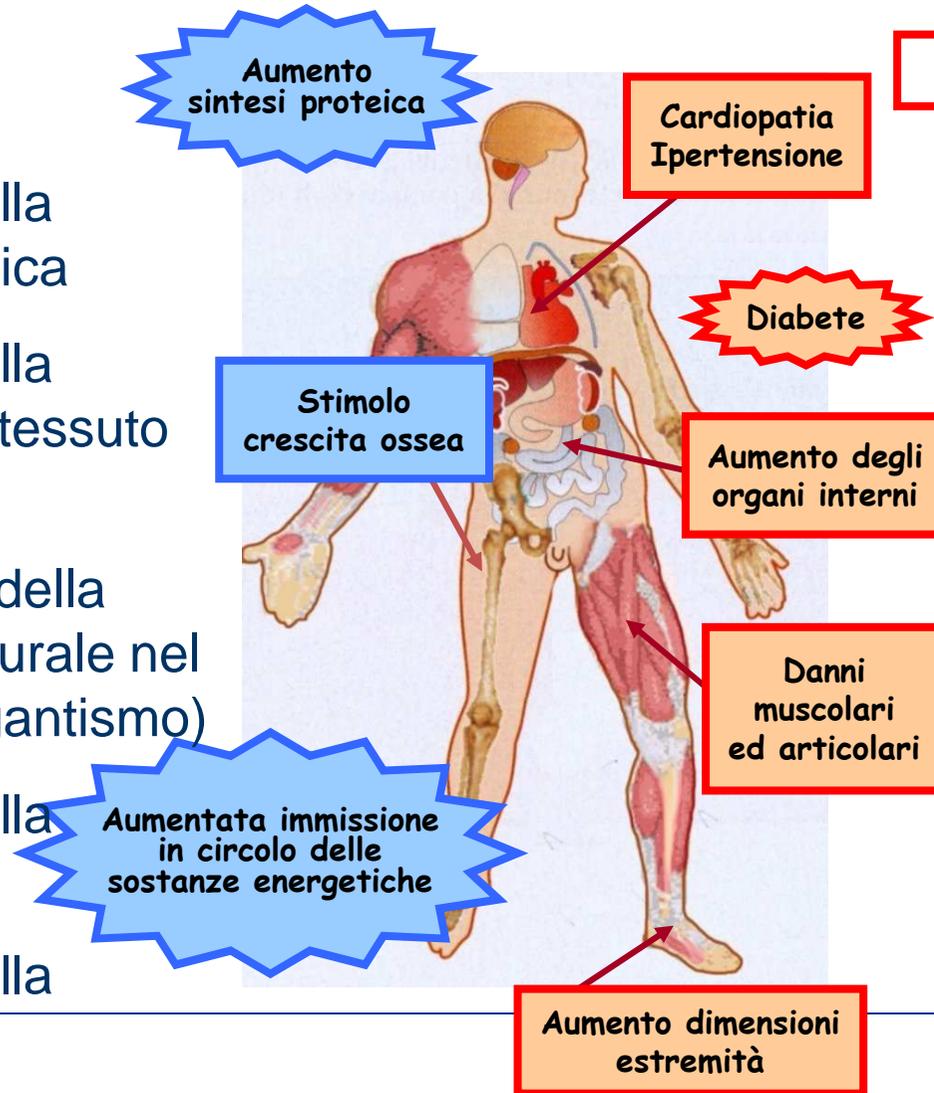
Reazioni avverse

- Poliglobulia
- Aumento della viscosità del sangue
- Infarto del miocardio
- Trombosi
- Ictus
- Embolia polmonare
- Convulsioni

S2. Ormone della crescita (GH)

EFFETTI

- Aumento della sintesi proteica
- Aumento della crescita del tessuto muscolare
- Incremento della crescita staturale nel giovane (gigantismo)
- Aumento della lipolisi
- Aumento della glicemia



REAZIONI AVVERSE

- Acromegalia nell'adulto (gigantismo)
- Ritenzione idrica ed edema (generalizzato e periferico)
- Artropatie; sindrome del tunnel carpale
- Cardiomiopatia
- Ipertensione arteriosa
- Iperglicemia
- Diabete

S2. Ormone della crescita (GH)

Flo Jo” Griffith morì a 38 anni nel 1998 per aver assunto l’ormone della crescita al fine di migliorare la propria massa muscolare. In quel periodo non esisteva ancora la formulazione artificiale e il rischio che si correva con l’utilizzo di ormone estratto da cadavere era di contrarre la malattia di Creutzfeldt-Jacob, Encefalopatia Spongiforme Bovina, comunemente detta malattia della “mucca pazza”, un virus a lenta azione che si può manifestare anche dopo parecchio tempo. Questo fu un caso clamoroso, ma si contano ben 150 altri decessi fra coloro che hanno assunto l’ormone estratto da cadavere.



(December 21, 1959 – September 21, 1998)

Esempi di morte da doping

“Flo Jo” Griffith (1959-1998) contrasse una malattia infettiva per abuso di ormone della crescita estratto da cadavere.

Aveva detto:
“quando arrivi sempre seconda, puoi accettarlo o tentare di diventare la numero uno”.



R. Rossi

S.3 BETA-2 AGONISTI

Sono anabolizzanti non ormonali:
antiasmatici o broncodilatatori

Beta 2 agonisti Azione stimolante e anabolizzante

EFFETTI

- Broncodilatazione
- Aumento dell'efficacia contrattile del miocardio
- Azione lipolitica (aumento degli acidi grassi liberi)
- Ipertrofia delle fibre muscolari tipo II

Azione
cardiostimolante

Broncodilatazione

Azione
lipolitica

Ipertrofia fibre
muscolari tipo II

Agitazione
Irritabilità
Insonnia

Disturbi ritmo
cardiaco

Iperidrosi

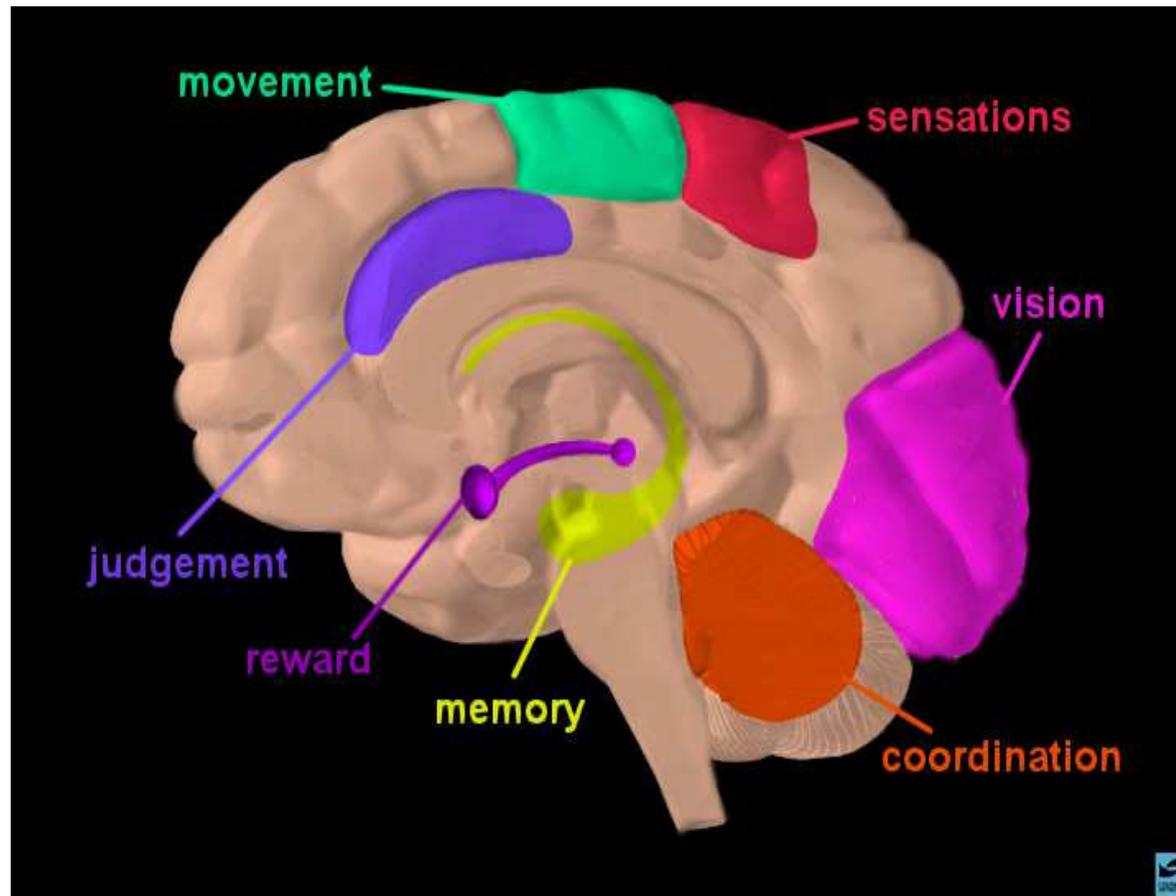
Ritenzione
urinaria

EFFETTI INDESIDERATI

- Tremori, agitazione, irritabilità e insonnia
- Iperidrosi
- Scialorrea
- Ritenzione urinaria
- Anoressia
- Ipopotassiemia
- Alterazioni della pressione arteriosa
- Tachicardia e disturbi del ritmo
- Dispnea

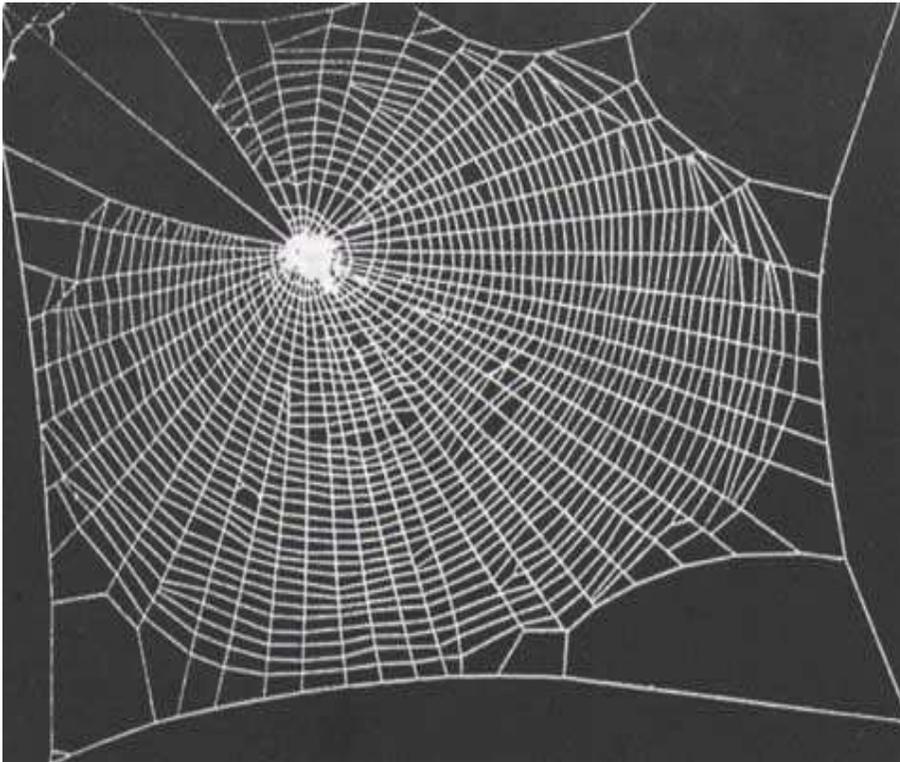
S6. STIMOLANTI

Gli stimolanti (es. cocaina, oppioidi, amfetamine, cannabinoidi) alterano le aree cerebrali che mediano le sensazioni di motivazione e di piacere: **area “reward”** cioè della gratificazione.



S6. STIMOLANTI

Effetto dell'ecstasy sulle capacità del ragno a tessere la tela



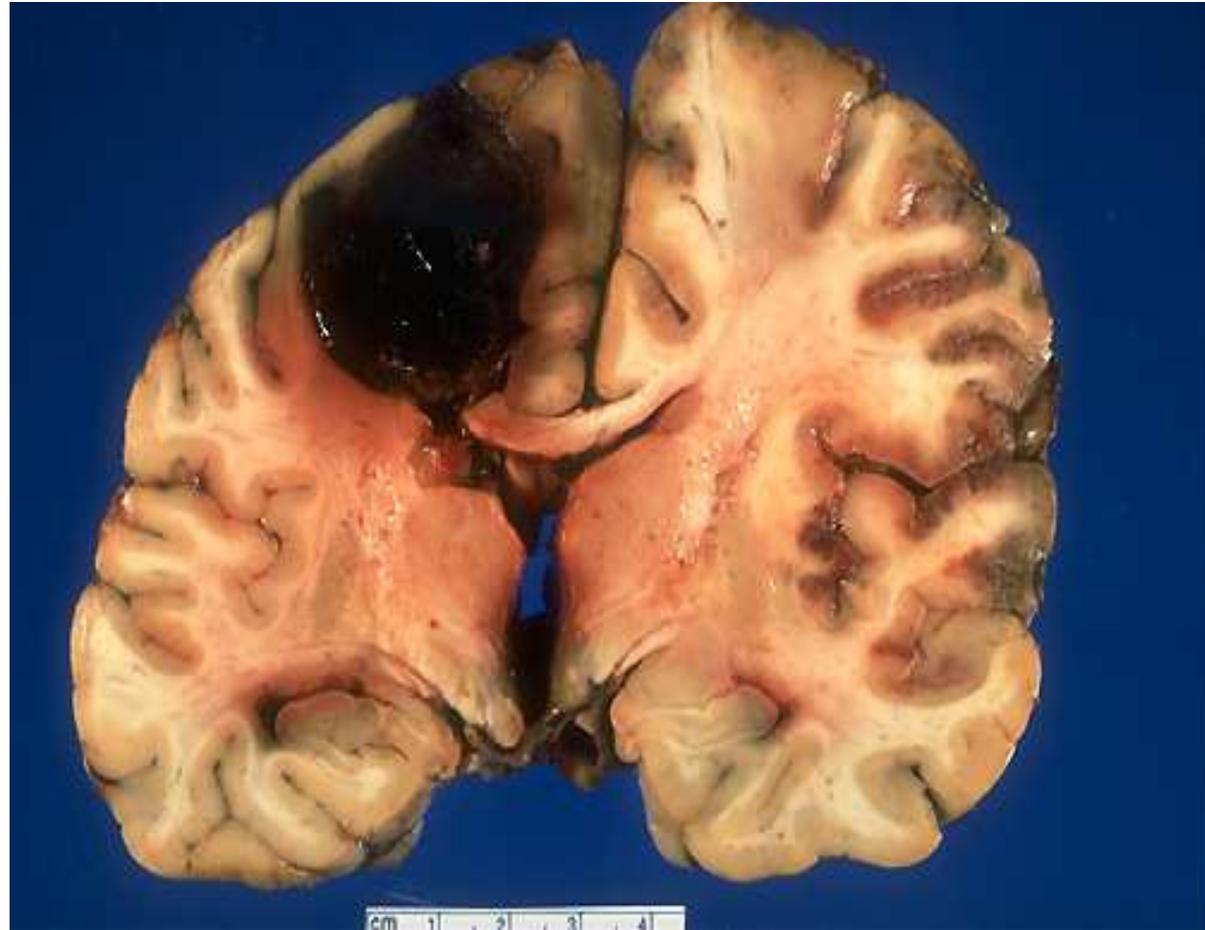
Condizioni basali



Dopo ecstasy

S6. STIMOLANTI

Emorragia cerebrale da cocaina



S6. Stimolanti: Amfetamina, Efedrina, Cocaina...

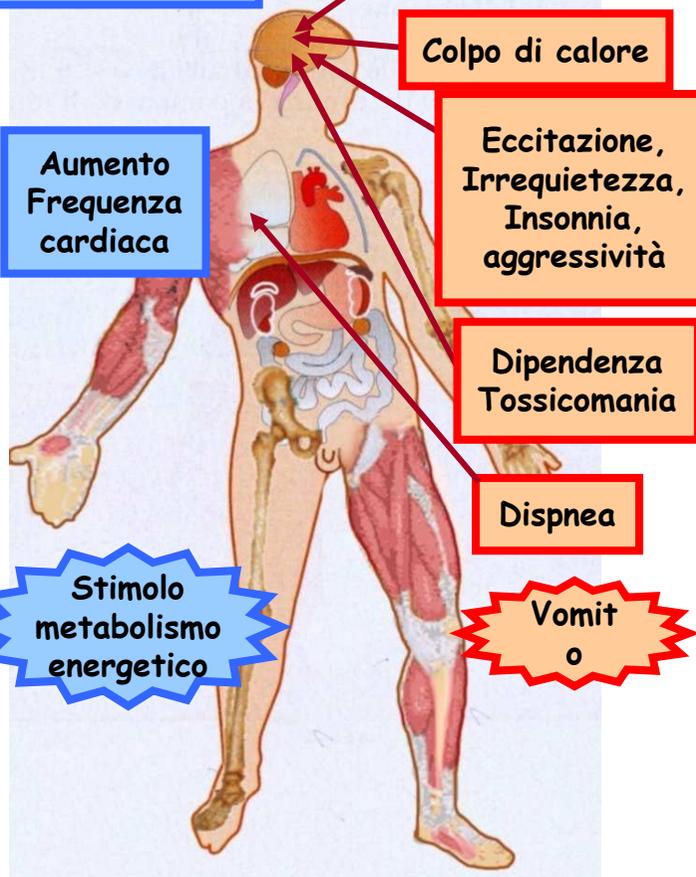
EFFETTI

- Spiccata azione stimolante sul sistema nervoso centrale (aumento dell'attenzione della competitività, senso di benessere, euforia, riduzione del senso di fatica)
- Aumento della frequenza cardiaca
- Aumento della glicemia e degli acidi grassi liberi
- Riduzione del senso di fame (effetto anoressizzante)

Riduzione fatica, euforia

Aumento Frequenza cardiaca

Stimolo metabolismo energetico



Ictus

Colpo di calore

Eccitazione, Irrequietezza, Insonnia, aggressività

Dipendenza Tossicomania

Dispnea

Vomit

EFFETTI INDESIDERATI

Sistema nervoso centrale

- Tremori, eccitazione, aggressività
- Perdita del senso critico
- Cefalea
- Insonnia
- Vomito, anoressia
- Iperpiressia (colpo di calore)
- Convulsioni
- Forte stato depressivo, psicosi

Sistema cardiocircolatorio

- Vasocostrizione
- Iperensione
- Tachicardia
- Disturbi del ritmo
- Infarto del miocardio

S9. Glucocorticosteroidi

farmaci anti-infiammatori e analgesici

Proibiti per via orale, rettale, im. o ev. per le altre vie è richiesta certificazione medica

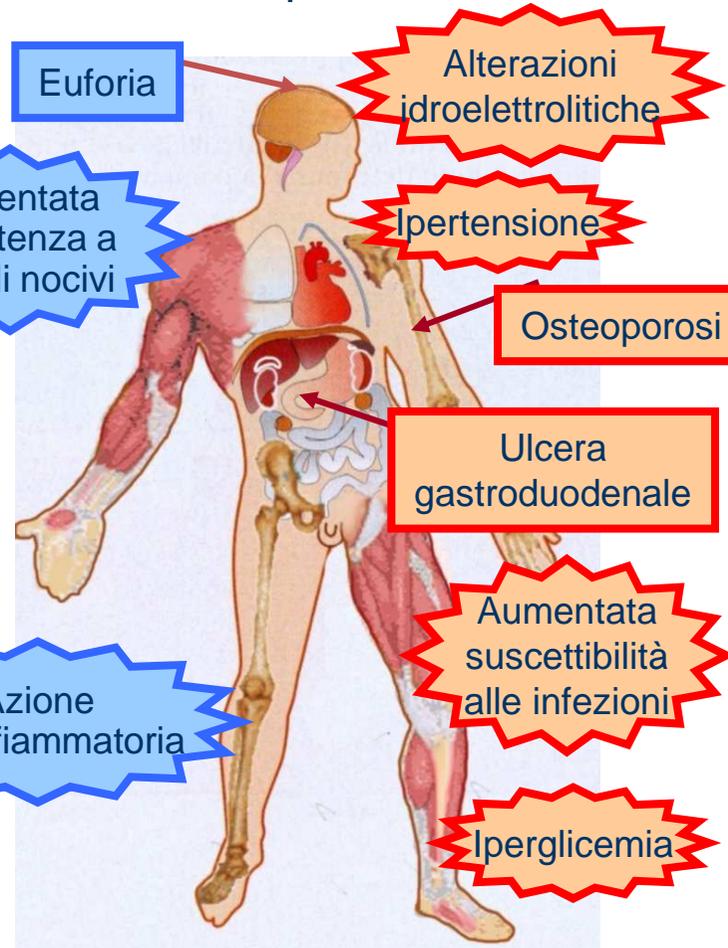
EFFETTI

- Potente azione anti-infiammatoria
- Effetto euforizzante
- Aumentata capacità di resistere a stimoli nocivi

Azione anti-infiammatoria

Euforia

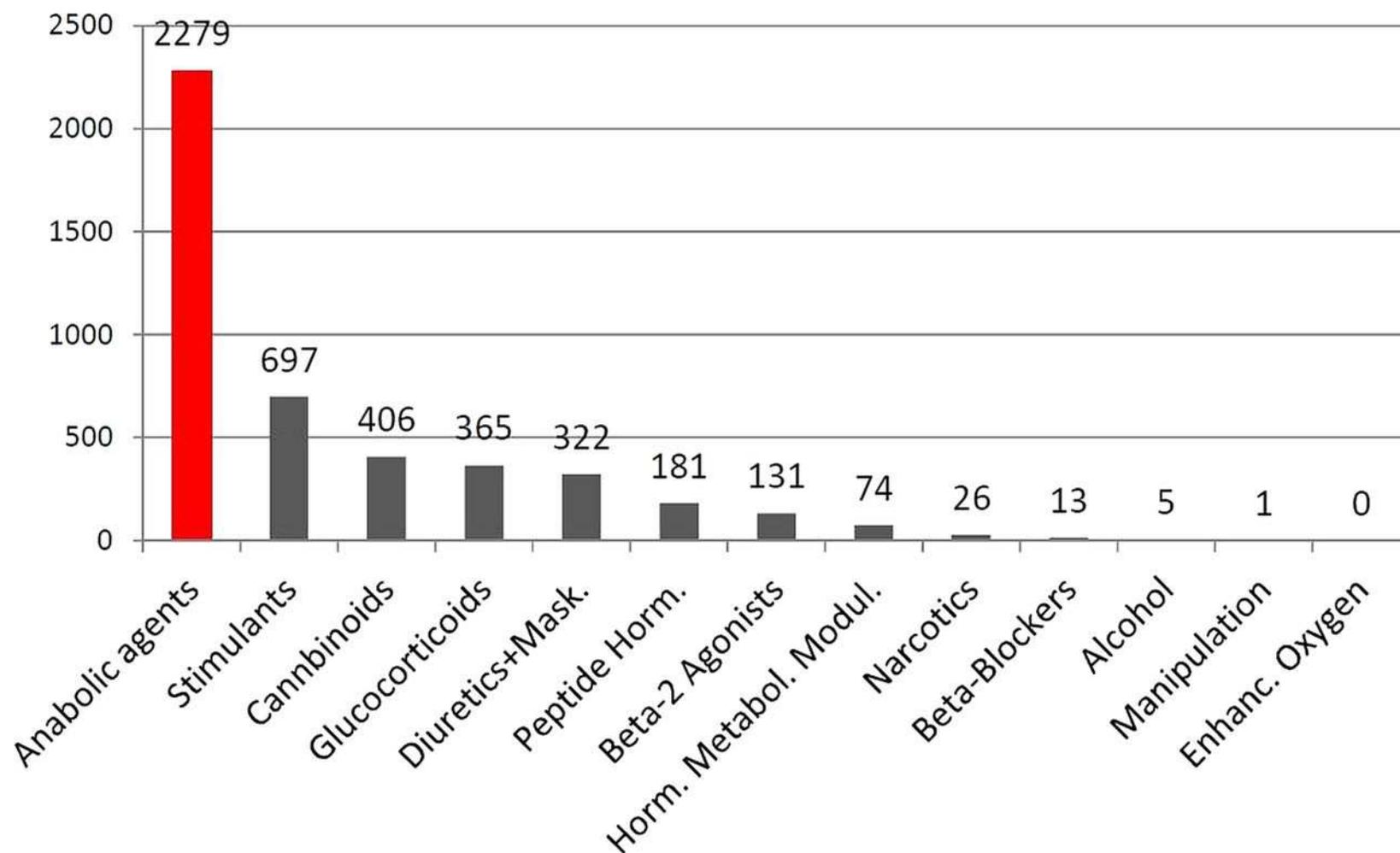
Aumentata Resistenza a stimoli nocivi



EFFETTI INDESIDERATI

- Alterazione del bilancio elettrolitico
- Ipertensione
- Iperglicemia
- Iperlipidemia
- Iperuricemia
- Aumento della suscettibilità alle infezioni
- Ulcera peptica
- Osteoporosi
- Insonnia
- Cataratta

Risultati (2012) dei laboratori accreditati dell'Agenzia mondiale antidoping (WADA) tramite antidoping Amministrazione e Management System (ADAMS).



METODI DI DOPING

Metodi vietati in e fuori competizione

M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

- ✓ Doping ematico
- ✓ Uso di prodotti che aumentano l'assorbimento, il trasporto o il rilascio dell'ossigeno
- ✓ Camera ipobarica

M2. MANIPOLAZIONE FARMACOLOGICA, CHIMICA E FISICA

uso di sostanze e metodi che possano alterare l'integrità e la conformità dei campioni raccolti nei controlli antidoping

M3. DOPING GENETICO uso non terapeutico dei geni, elementi genetici e/o cellule, che hanno la capacità di migliorare la prestazione sportiva

M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

Doping Ematico

- a. Emotrasfusione**
- b. Uso di Emoglobine sintetiche**
- c. Utilizzo della Camera ipobarica**

M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

Doping ematico

a. Emotrasfusione



- Due possibilità:
 - **Doping ematico omologo** (sangue proveniente da un'altra persona)
 - Sangue e sostituti plasmatici utilizzati in medicina
 - "Donor Doping" (generalmente compagni di squadra)
 - **Doping ematico autologo** (autotrasfusione)
 - Estrazione di es. 900 ml sangue - 5 sett. prima della gara
 - Infusione del sangue centrifugato (cellule impaccate) 1 o 2 giorni prima della gara

M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

a. Emotrasfusione

Vantaggi e svantaggi del doping ematico omologo

(sangue proveniente da un'altra persona)

- Vantaggi
 - Nessuna diminuzione della performance
- Svantaggi
 - **Possibilità di essere individuati!!!**
(individuazione degli antigeni minori dei GR del donatore)
 - Contrarre malattie dal donatore
 - Reazioni da trasfusione

M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

a. Emotrasfusione

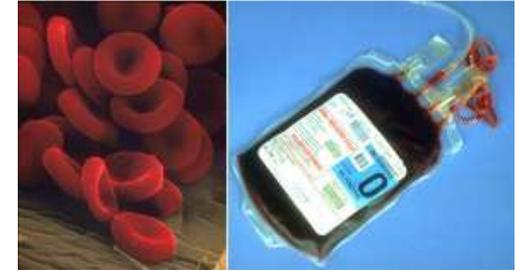
Vantaggi e svantaggi del doping ematico autologo (autoemotrasfusione)

- **Vantaggi**
 - **“Nessun metodo di detenzione”**
 - Evitare patologie tipo AIDS ed epatiti
 - Evitare reazioni da sangue non compatibile
- **Svantaggi**
 - Diminuita performance durante l'allenamento dopo l'estrazione del sangue

M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

a. Emotrasfusione

Doping ematico: Autoemotrasfusione



In Italia, questa tecnica nasce a Ferrara nella prima metà degli anni 80 (1984: F. Moser record dell'ora) con l'autoemotrasfusione



M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

a. Emotrasfusione

Doping Ematico

Autoemotrasfusione (per sport di resistenza)

Un mese prima della gara vengono estratti 700-900 ml di sangue, che vengono poi conservati e rimessi in circolo uno o due giorni prima dell'impegno agonistico.

In seguito alla trasfusione si verifica un repentino miglioramento della capacità aerobica e della prestazione nelle prove di resistenza (ciclismo, maratona, nuoto di durata, triathlon, sci nordico ecc.).

- L'autoemotrasfusione non determina significativi benefici agli atleti impegnati in discipline anaerobiche (sollevamento pesi, gare di salto e di sprint, lancio del peso, ecc).

M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

b. Uso di Emoglobine sintetiche

Doping ematico

Eritropoietina ricombinante (r-HUEPO)

- ▶ **Nel 1987 è stata introdotta l'EPO ricombinante (r-HuEPO) con struttura ed azione sovrapponibili a quella endogena.**
- ▶ **La somministrazione di r-HuEPO consente di aumentare la massa eritrocitaria e i livelli di emoglobina per 3-4 settimane, con aumento del VO₂max (*il massimo volume di ossigeno consumato per minuto*) pari al 10%.**
- ▶ **La somministrazione di r-HuEPO consente quindi di migliorare la capacità aerobica dell'atleta. Gli effetti sono additivi a quelli dell'allenamento, che consente di aumentare il VO₂max fino ad un massimo del 20%.**

M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

b. Uso di Emoglobine sintetiche

Doping ematico

Darbepoietin α

Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (NESP)

Eritropoietina sintetica analoga all'eritropoietina ricombinante umana

EPO iperglicosilata:

cinque catene carboidratiche
elevato contenuto in acido sialico
elevato peso molecolare.
clearance plasmatica rallentata
Laboriosa metabolizzazione

Lunga emivita plasmatica
darbepoietin α = 25 ore
rHuEpo = 8,5 ore
(*MacDougall et al, 2001*)

La NESP può produrre in breve tempo un aumento dell'ematocrito dai valori normali di 42%-44% fino a valori del 60% mantenendoli elevati a lungo.

M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

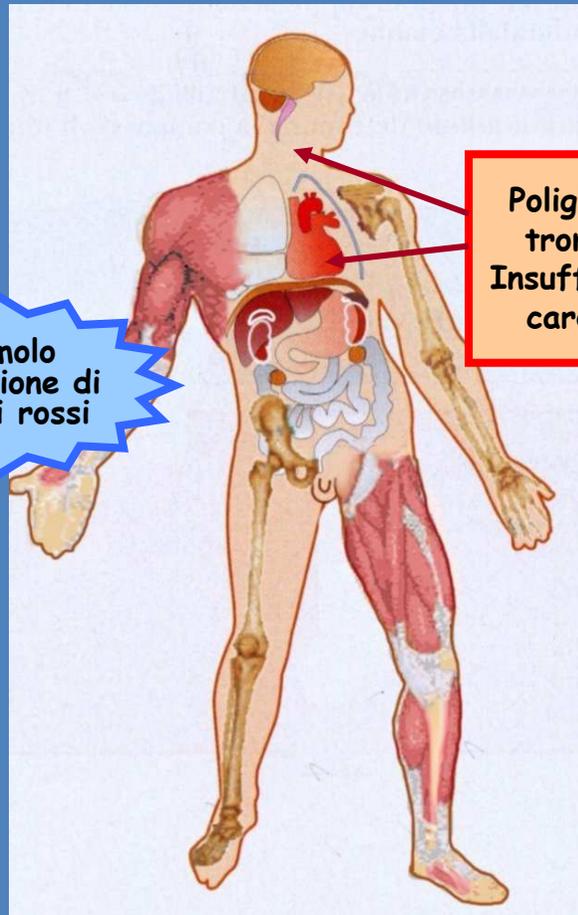
Effetti

S2- Eritropoietina (EPO)

Reazioni avverse

- Stimola la produzione dei globuli rossi
- Aumenta la capacità di trasporto dell'ossigeno

Stimolo
produzione di
globuli rossi



Poliglobulia
trombosi
Insufficienza
cardiaca

- Poliglobulia
- Aumento della viscosità del sangue
- Infarto del miocardio
- Trombosi
- Ictus
- Embolia polmonare
- Convulsioni

M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

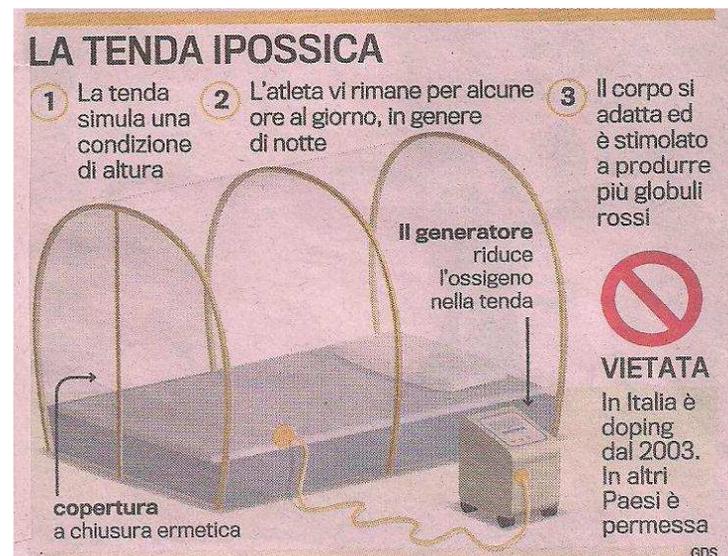
c. Camera ipobarica

Doping Ematico

La camera ipobarica riduce la percentuale di ossigeno presente nell'aria.

L'organismo quindi viene stimolato a produrre globuli rossi, aumentando la massa plasmatica.

Dunque aumenta la resistenza, crea l'effetto altitudine, migliora anche la capacità di recupero.



M2. MANIPOLAZIONE FARMACOLOGICA, CHIMICA E FISICA

Uso di sostanze e metodi che possano **alterare l'integrità e la conformità dei campioni raccolti nei controlli antidoping**

Le manipolazioni vanno **dallo scambio dei campioni** d'urina alla diluizione con altri liquidi, fino all'inserimento in vescica, tramite catetere, dell'urina altrui. Possono inoltre essere usati i **diuretici** chiamati mascheranti, perché in grado di eliminare più velocemente, favorendo la diuresi, le sostanze proibite rintracciabili ai test antidoping. Inoltre, la prima cosa che si esamina nei campioni di urina è il pH, in quanto è possibile facilitare l'eliminazione di farmaci vietati alcalinizzando o acidificando l'urina; la seconda è la densità: un'urina con basso peso specifico, può indicare una manipolazione finalizzata ad abbassare la concentrazione di un farmaco al di sotto della soglia di rilevazione.

M3. DOPING GENETICO

Il WADA ha inserito nella lista dei metodi proibiti il
DOPING GENETICO



E' definito come “ l'uso non terapeutico di cellule, geni, elementi genici o la modulazione dell'espressione genica che possano aumentare la performance sportiva”.

Il **DOPING GENETICO** usa le stesse tecniche della **TERAPIA GENICA** allo scopo di migliorare la prestazione sportiva.

Modelli di terapia genica

- ✓ Definizione e background
- ✓ Sistemi di rilascio
- ✓ Strategie di terapia genica
- ✓ Esempi di trials clinici
- ✓ Prospettive future

Terapia Genica: perché ?

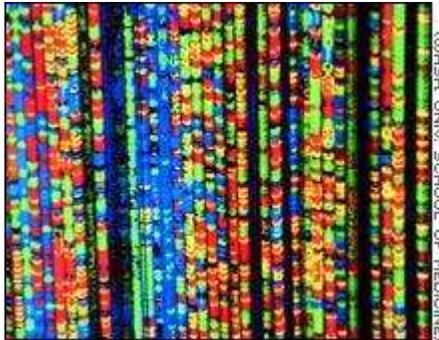
Molte patologie, dovute a proteine malfunzionanti, non sono trattabili con terapie tradizionali

Negli anni '70 nasce l'idea della **Terapia Genica**

(rilascio intracellulare di materiale genetico per generare un effetto terapeutico, con diverse strategie di intervento a seconda dello scopo prefissato)



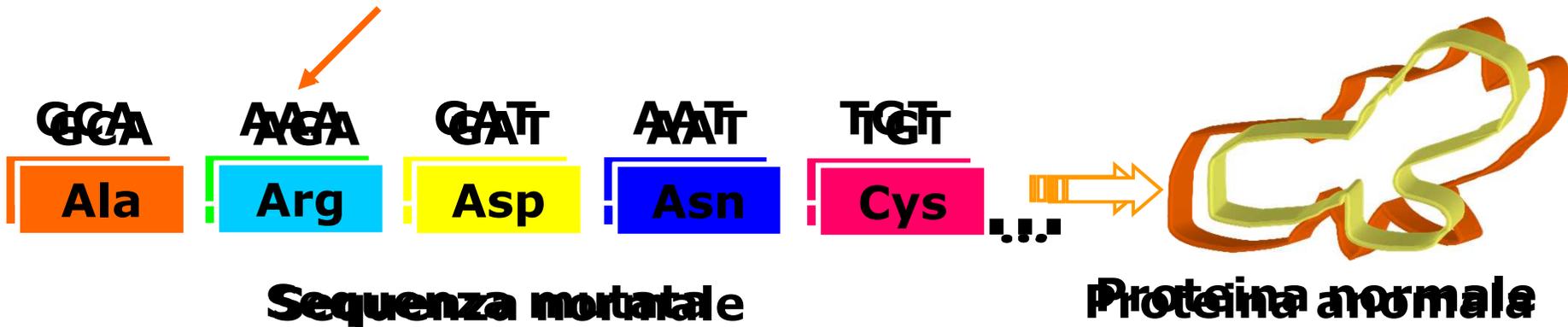
DNA e mutazioni



A
C
G
T

GENOMA UMANO

- ✓ 3 miliardi di basi (A,C,G,T)
- ✓ circa 30.000 geni
- ✓ circa 250.000 proteine



MUTAZIONI

- ereditarie (patologie genetiche)
- acquisite (tumori)
- dovute a virus (malattie infettive)

Patologie bersaglio

➤ **Monogeniche**

Immunodeficienze - Distrofia muscolare - Fibrosi cistica - Emofilie
Retinopatie - Emoglobinopatie - Ipercolesterolemia fam -
Xeroderma pigmentosum

➤ **Multifattoriali**

Malattie cardiovascolari e neurodegenerative - Diabete -
Artrite reumatoide

➤ **Tumoriali**

Leucemie - Carcinomi

➤ **Infettive**

AIDS - Epatite B e C

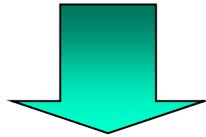
➤ **Acquisite**

Traumi (fratture ossee, ferite, ustioni) - Ischemie

Terapia genica: quale tipo?

SOMATICA

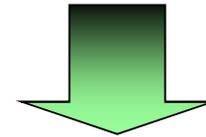
manipolazione dell'espressione genica in cellule differenziate dell'individuo adulto



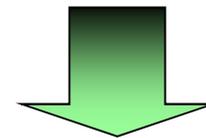
l'alterazione genica riguarda esclusivamente il paziente su cui è stata realizzata

GERMINALE

manipolazione dell'espressione genica in cellule riproduttive



eventuali modificazioni geniche verrebbero trasmesse alla progenie



non autorizzata !!!!

Terapia genica: un po' di storia



Rogers et al.
papilloma virus
3 pazienti affetti da arginemia:
nessun risultato

Blase e Bordignon
pazienti affetti da ADA-SCID:
risultati parziali in termini di cura definitiva

Cavazzana-Calvo et al
2 pazienti affetti da X-SCID:
correzione completa difetto
immunitario

1970

1980

1990-92

1999

2000

2002-3

Cline et al
2 pazienti con β -tal Maj:
presenza per 3-9 mesi
del transgene nel m.o.

Morte del paziente
(Jesse G.) dopo
trial clinico con
AdV per deficit
OTC



Aiuti et al
2 pazienti con ADA-SCID:
reversione completa
fenotipo clinico fino a 1
anno



Casi di leucemia cellule T
dopo 3 anni da trial
clinico con RV per X-
SCID (2/15)

Terapia genica: come?

ex vivo

Le cellule bersaglio (es. SC) sono prelevate dal paziente, modificate geneticamente in laboratorio e reintrodotte nello stesso individuo



- ✓ no problemi immunologici
- ✓ efficienza delle metodiche di trasduzione in vitro
- ✓ solo alcune malattie (immunologiche, ematologiche, metaboliche)

in situ

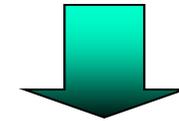
il transgene viene rilasciato localmente nel sito di azione mediante iniezione i.m. o intratumorale o per inalazione ecc...



- ✓ tumori localizzati; patol. dell'apparato respiratorio (es. FC); tessuto cutaneo ecc...

in vivo

il transgene viene somministrato per via sistemica e.v. nel corpo del paziente

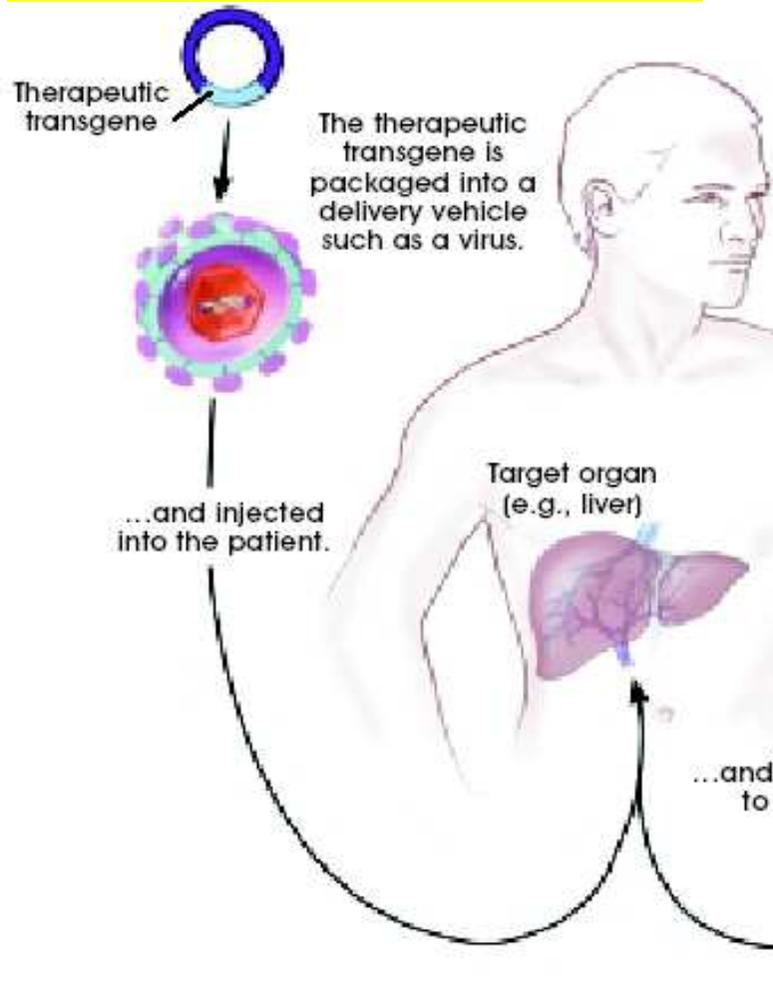


- ✓ cellule e tessuti poco accessibili
- ✓ scarsa efficienza di trasduzione, barriere

TERAPIA GENICA: come ?

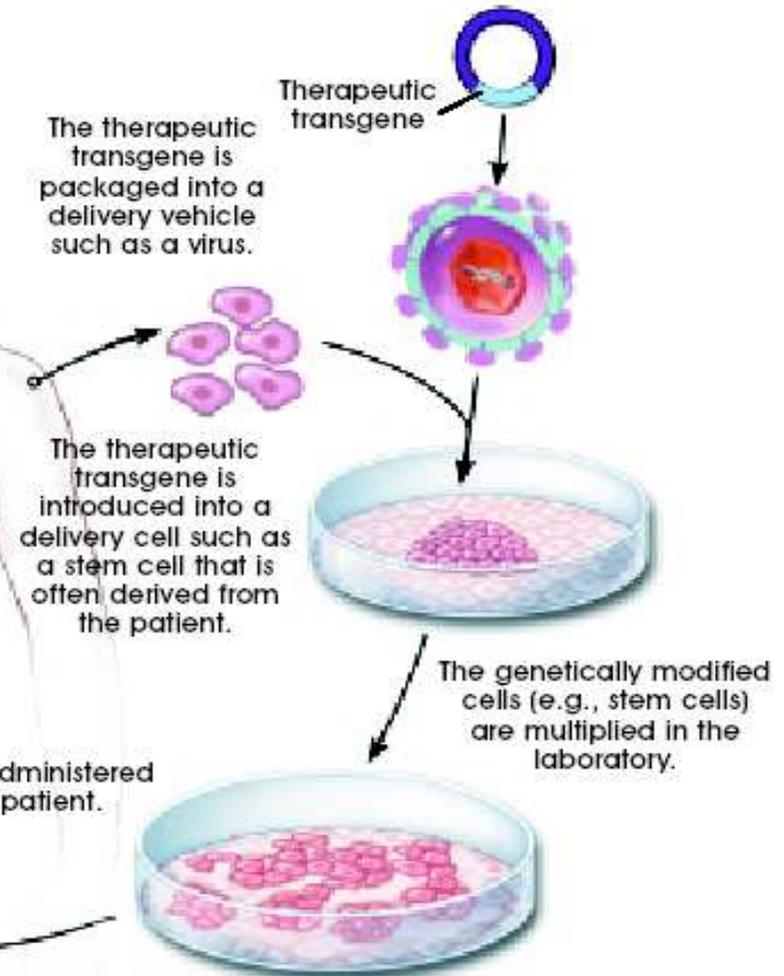
IN VIVO

Rilascio gene modificato

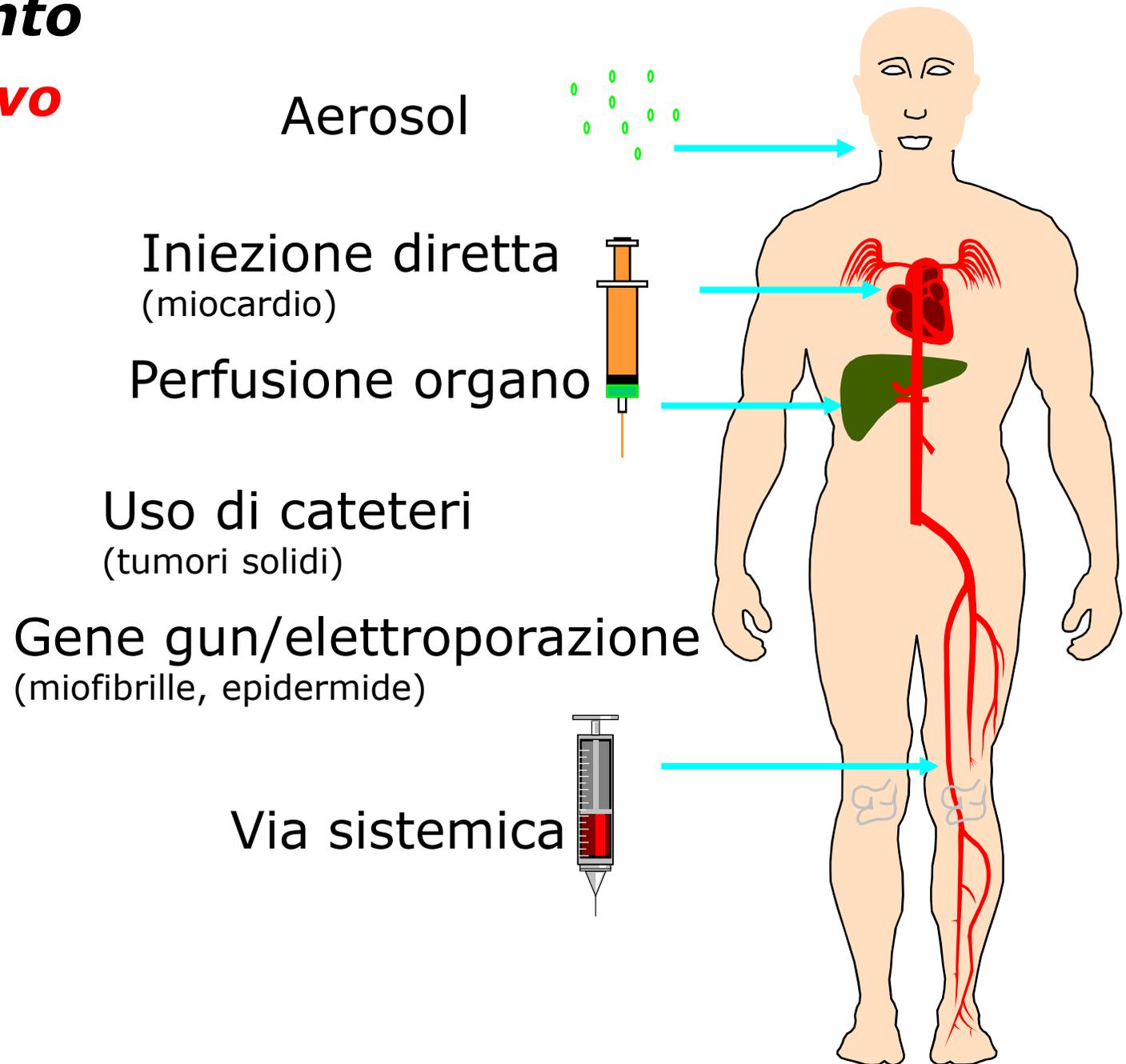


EX-VIVO

Rilascio cellule modificate



Trasferimento Genico *in vivo*

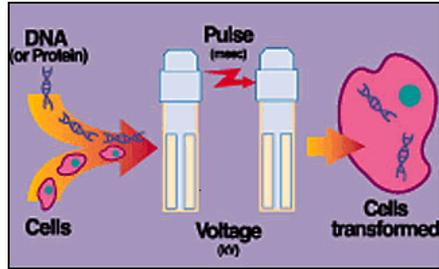


TERAPIA GENICA: come ?

DNA nudo



elettroporazione



pistola genica



microiniezione



liposomi

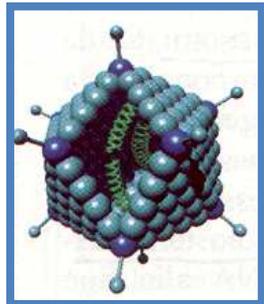


non-virali



Vettore per rilasciare e proteggere il gene terapeutico

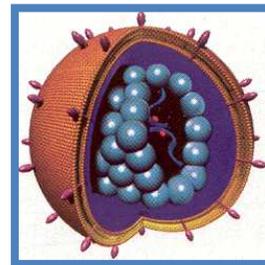
virali



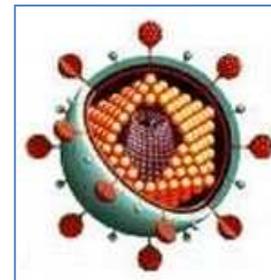
adenovirus



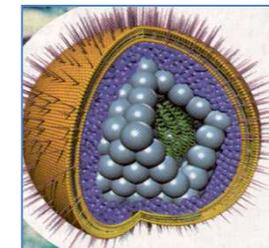
adenoassociati



retrovirus



lentivirus



herpesvirus

VETTORI PER TERAPIA GENICA

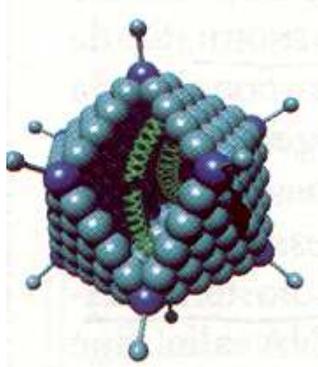
Vettori virali:

- Adenovirus
- Retrovirus
- Virus adeno-associati
- Lentivirus (derivati da HIV)
- Herpesvirus

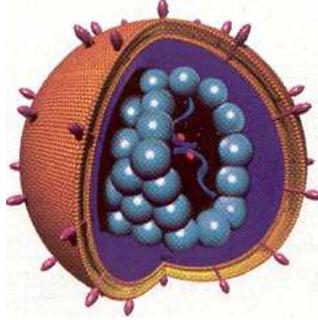
Vettori non virali:

- Plasmidi nudi
- Liposomi e polimeri
- Elettroporazione in vivo

Vettori virali



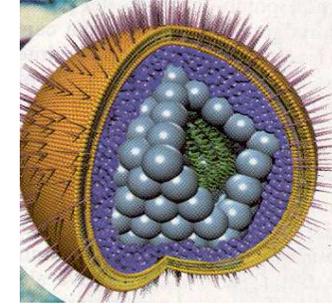
Adenovirus



Retrovirus*



Lentivirus*



Herpes-simplex
virus

Vantaggi

- ✓ altamente efficienti nel trasferimento genico
- ✓ espressione a lungo-termine*

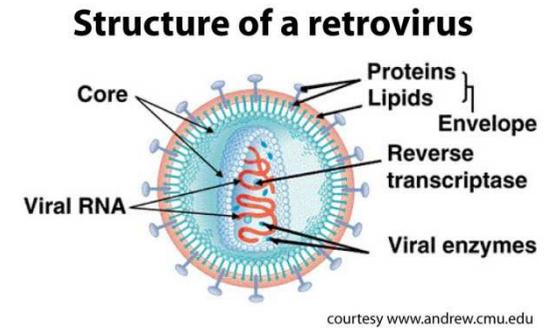


AAV*

Svantaggi

- ✓ reazione immunitaria
- ✓ tossicità
- ✓ integrazione random/mutagenesi inserzionale*

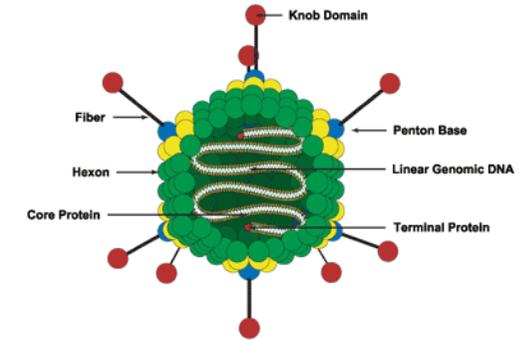
Retrovirus



- Genoma di RNA singolo filamento.
- Possono infettare solo cellule proliferanti
- Integrazione casuale nel genoma.
- Difficile produrli in grandi quantità (titolo elevato).
- **Poco immunogeni.**
- L'espressione può andare incontro ad attenuazione nonostante la persistenza del virus nel genoma.

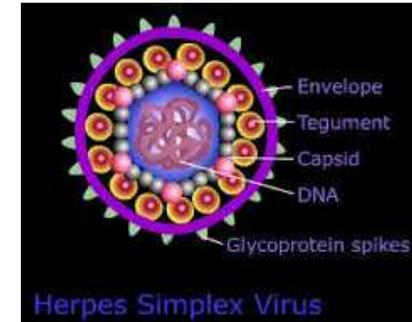
In assoluto sono i vettori più utilizzati per la terapia genica.

Adenovirus



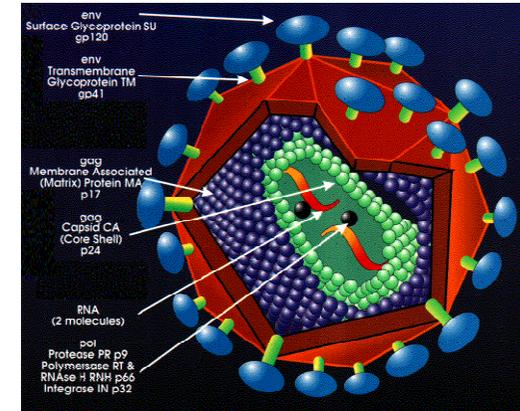
- **Genoma di DNA doppio filamento.**
- **infettano le vie respiratorie,**
- **Possono infettare cellule proliferanti e post-mitotiche.**
- **Non si integrano, ma vengono mantenuti in forma episomica. Pertanto non determinano mutagenesi inserzionale, ma sono necessari trattamenti ripetuti.**
- **Relativamente facile produrli in grandi quantità (titolo elevato).**
- **Forti reazioni immunologiche.**

Herpes Simplex Virus (HSV)



- ❖ Genoma di DNA doppio filamento molto grande (152 kb) e complesso (>70 geni).
- ❖ Spiccato neurotropismo (infettano preferenzialmente le cellule nervose).
- ❖ Nelle cellule infettate spesso rimane in uno stato latente in forma episomica.
- ❖ Possibile inserire geni molto grandi.
- ❖ Forti reazioni immunologiche.
- ❖ Presenza di anticorpi contro il virus in un'elevata percentuale di casi.

Lentivirus

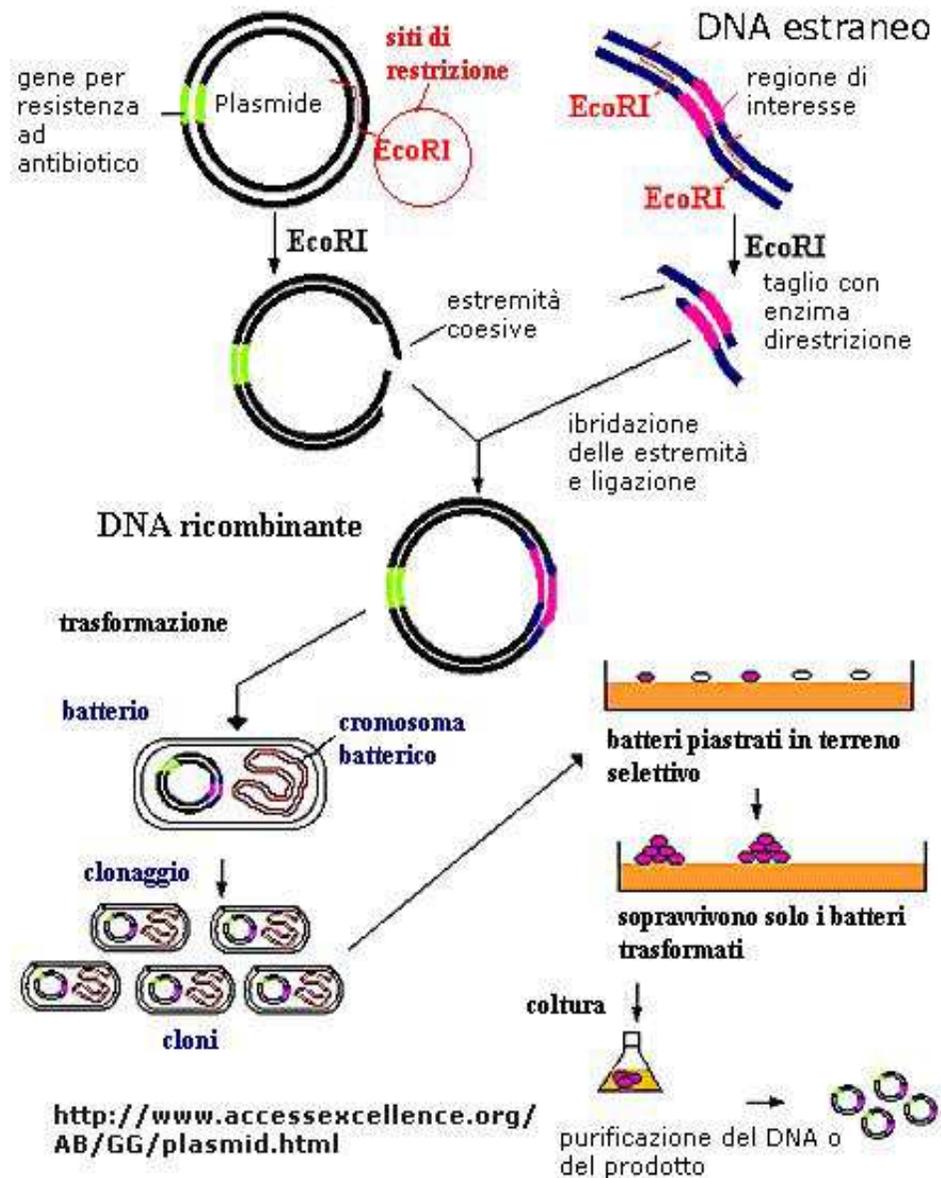


- **Genoma ad RNA.**
- **A differenza degli altri retrovirus possono infettare cellule proliferanti e post-mitotiche.**
- **Integrazione casuale (mutagenesi inserzionale)**
- **Scarsissime reazioni immunologiche.**
- **Elevata efficienza di trasduzione.**
- **Ottime prospettive per la terapia genica in vivo.**

Vettori non virali: PLASMIDI

La conoscenza degli enzimi di restrizione in grado di tagliare il DNA in corrispondenza di sequenze specifiche, hanno portato i biologi molecolari ad utilizzare i plasmidi per introdurre del DNA estraneo, al fine di produrre proteine oppure per amplificare tratti di DNA. Inserendo un gene in un plasmide, ed immettendo il plasmide in un batterio, posso **AMPLIFICARE E PRODURRE** quantità enormi del DNA **RICOMBINANTE**.

Qui vediamo uno schema dei processi di clonaggio di un plasmide in una cellula batterica.



Vettori non virali



DNA nudo – Elettroporazione - Microiniezione

Vantaggi

- ✓ assenza di immunogenicità
- ✓ alta efficienza *ex-vivo*
- ✓ rilascio di grossi geni
- ✓ utile per le vaccinazioni a DNA

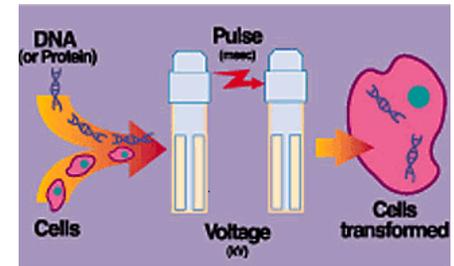
Svantaggi

- ✓ inefficiente nel trasferimento genico
- ✓ instabilità nella maggior parte dei tessuti
- ✓ espressione transitoria
- ✓ *in vivo* solo per tessuti superficiali (cute), muscolo, cuore, fegato

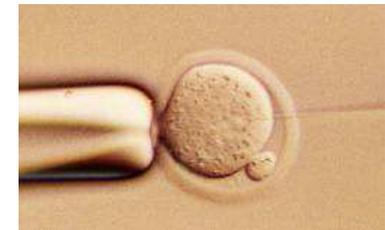
Iniezione diretta



Elettroporazione



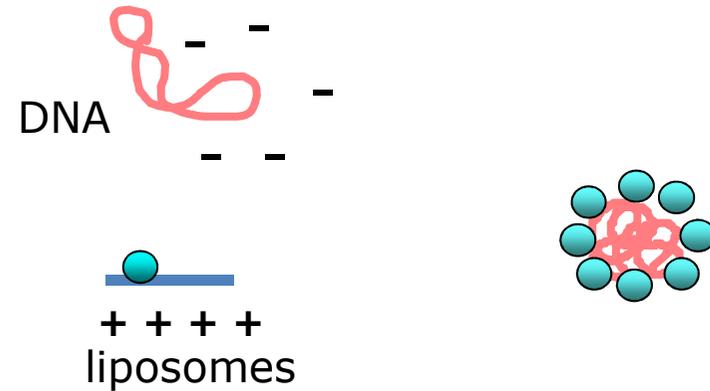
Microiniezione





Vettori non virali

➤ **Liposomi:** minuscole sfere cave costituite da una membrana lipidica

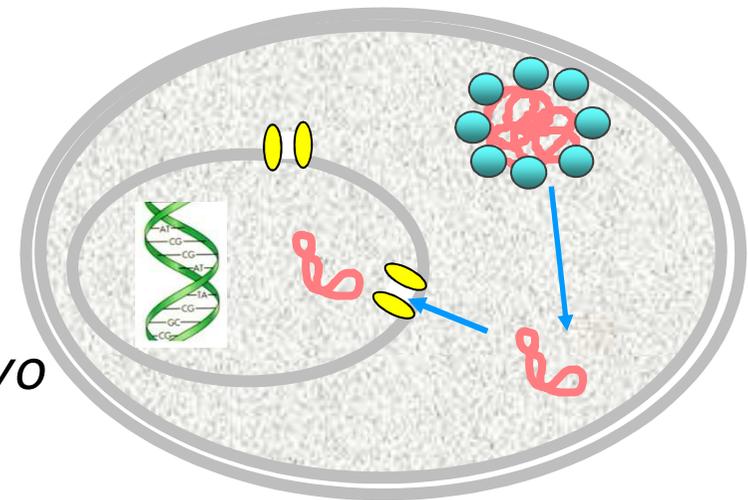


Vantaggi

- ✓ non contengono geni virali
- ✓ limitata immunogenicità
- ✓ anche costrutti molto grandi

Svantaggi

- ✓ poco efficienti nel rilascio genico *in vivo*
- ✓ espressione transitoria
- ✓ difficoltà a rilasciare il DNA nel nucleo



Cosa succede al DNA quando è entrato nella cellula ospite?

1. Vettori virali

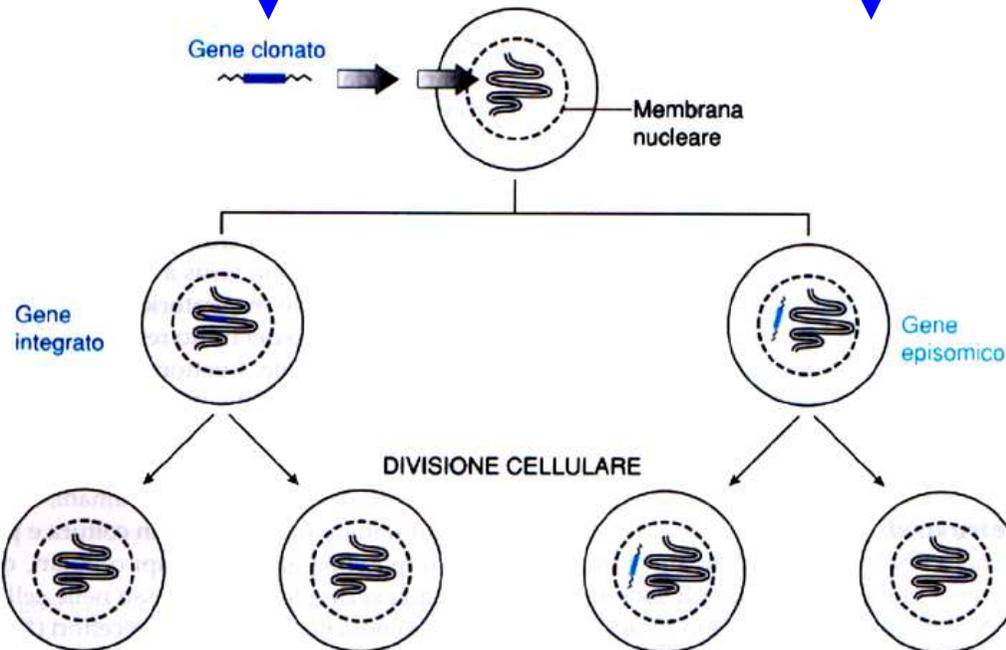
2. Vettori non virali

Gene clonato



Membrana nucleare

Integrazione casuale
O sito-specifica



integrazione del transgene nel
genoma ospite →
espressione stabile

il transgene non si integra nel
genoma → **espressione
temporanea**

Vettore ideale

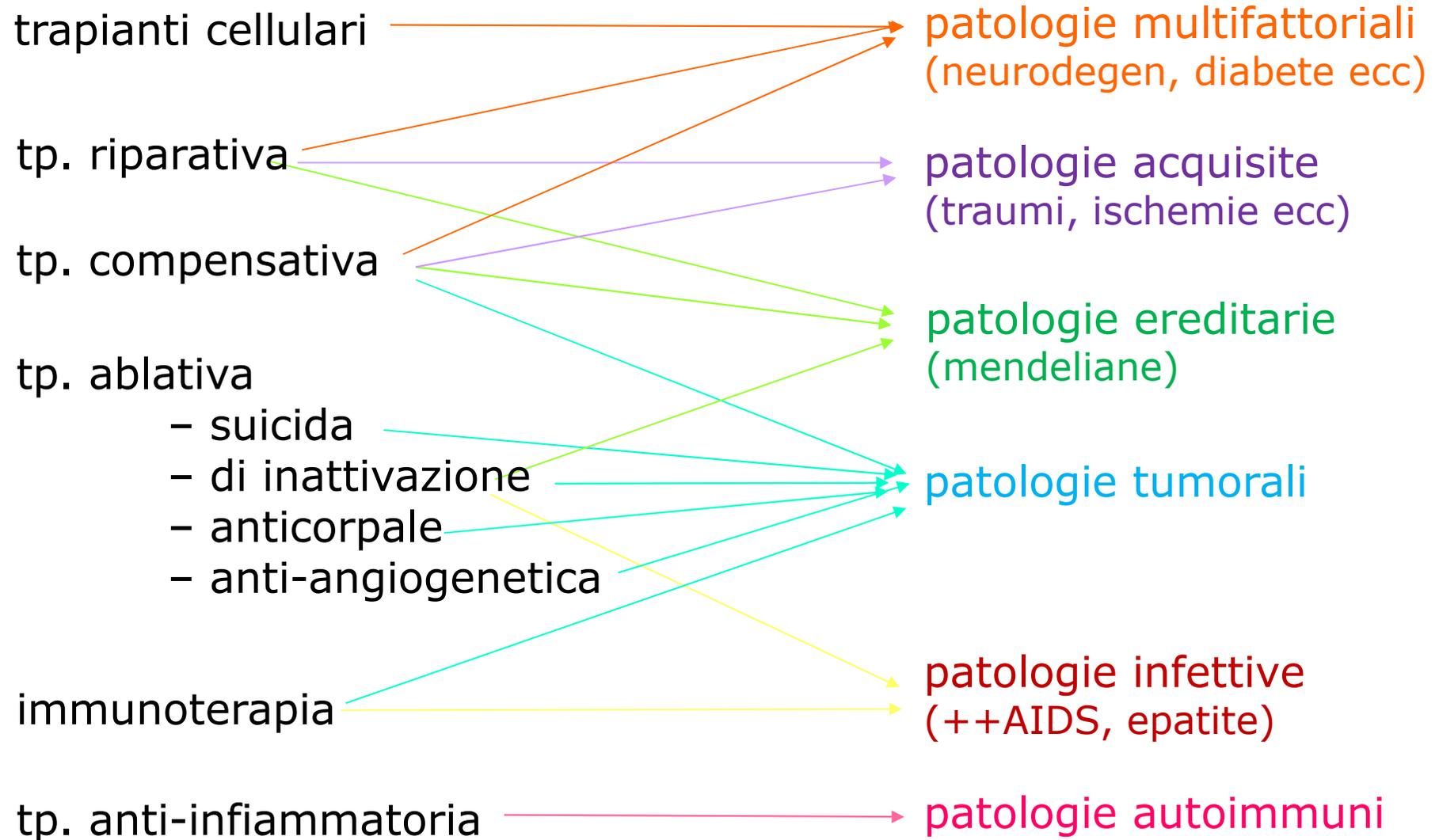


- ✓ di facile produzione e in elevate quantità
- ✓ esprimibile per un lungo periodo e regolabile
- ✓ sicuro, cioè inerte dal punto di vista immunologico
- ✓ selettivo per determinati tipi cellulari
- ✓ capace di trasportare geni piccoli e grandi
- ✓ capace di integrarsi in siti specifici del genoma
- ✓ capace di infettare sia cellule in divisione che quiescenti

Strategie di terapia genica

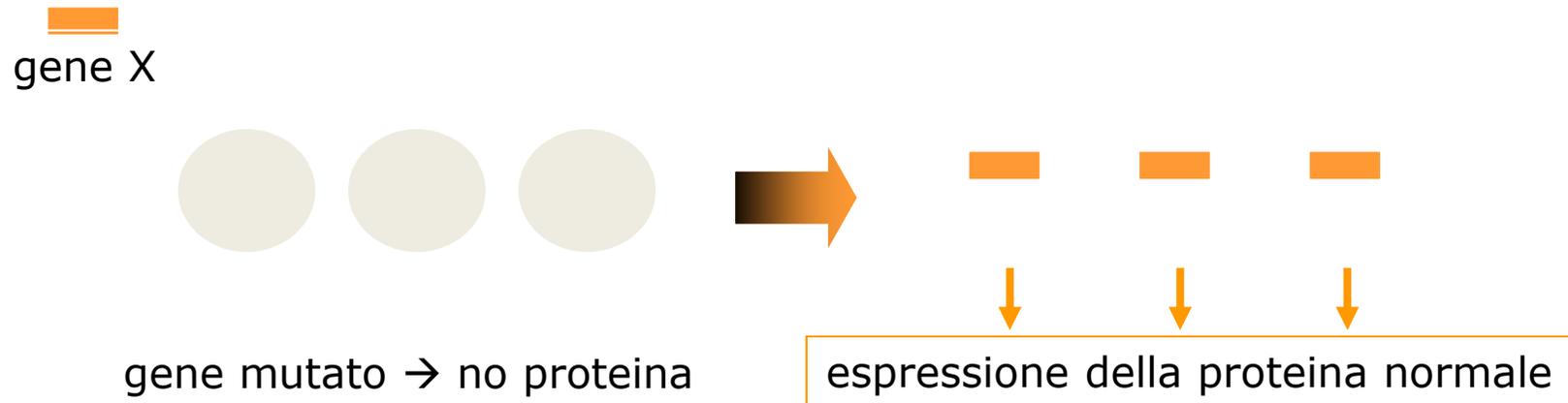
- ✓ Compensazione genica introduzione di copie funzionali del gene difettivo o assente
- ✓ Riparo genico correzione del gene difettivo
- ✓ Inattivazione introduzione di RNA antisenso per inibire l'espressione genica
- ✓ Suicida introduzione di "geni suicidi" che producono tossine o pro-farmaci
- ✓ Anti-angiogenica interruzione del nutrimento ai tumori
- ✓ Anticorpale introduzione di geni che producono anticorpi intracellulari
- ✓ Anti-infiammatoria prevenzione del riconoscimento dei tessuti da parte dell'organismo
- ✓ Vaccinazione introduzione di geni che inattivano agenti infettivi
- ✓ Terapie cellulari trapianto di cellule geneticam modif

Strategie e patologie

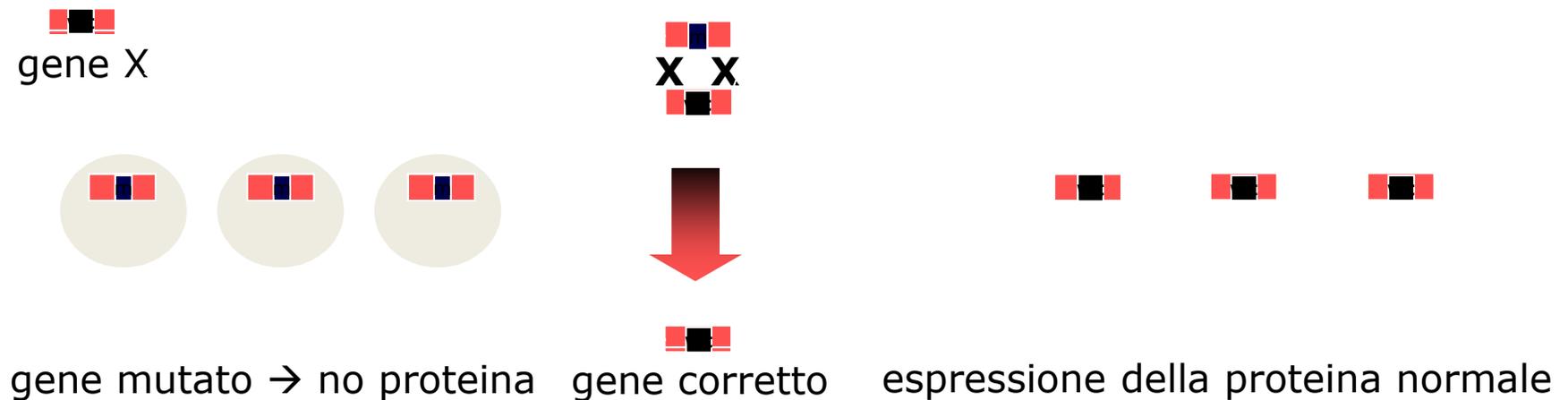


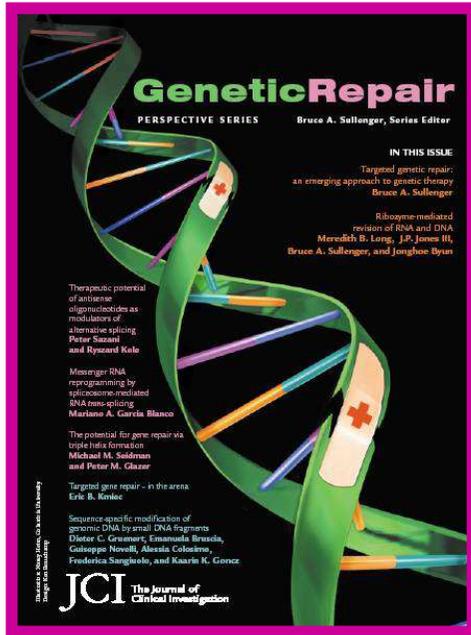
Strategie a confronto

Compensativa (x patologie AR. Trials clinici: FC, emofilia, SCID)



Riparo (anche x patologie AD da gain-of-function)





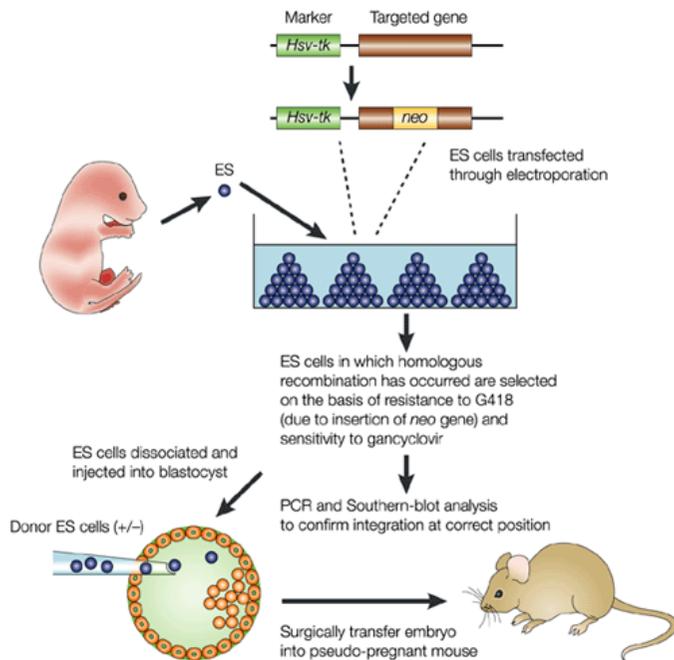
Riparo genico

Vantaggi

- ✓ Mantiene il gene integro
- ✓ Mantiene la relazione tra sequenze regolatrici e codificanti
- ✓ Assicura un livello di espressione accurato
- ✓ Dovrebbe essere a lungo-termini

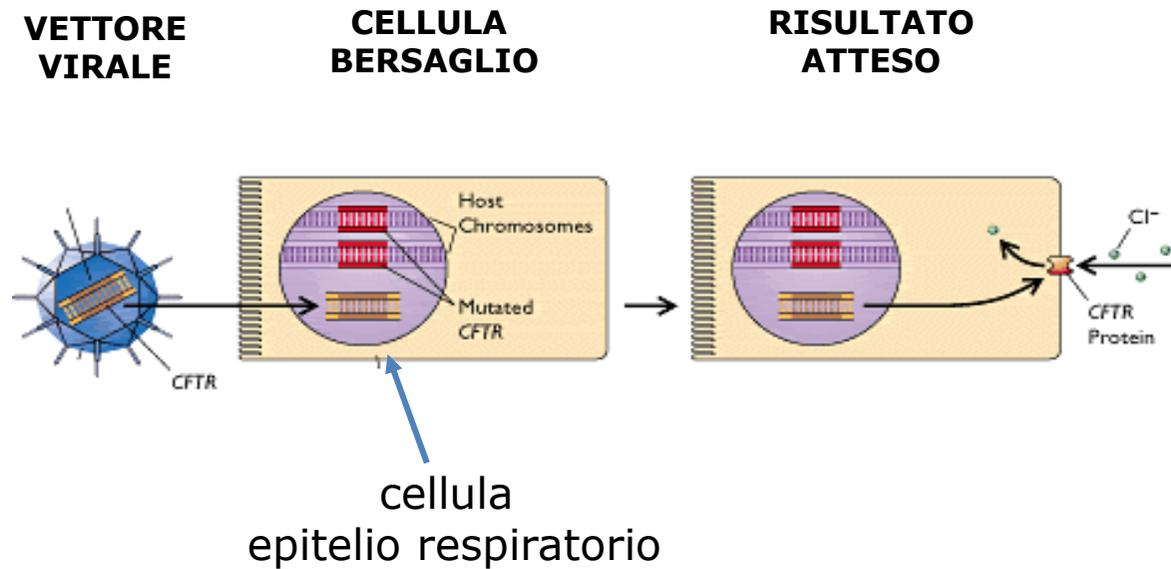
Svantaggi

- ✓ Efficienza può essere bassa
- ✓ Rischio di mutagenesi inserzionale
- ✓ Degradazione del DNA terapeutico

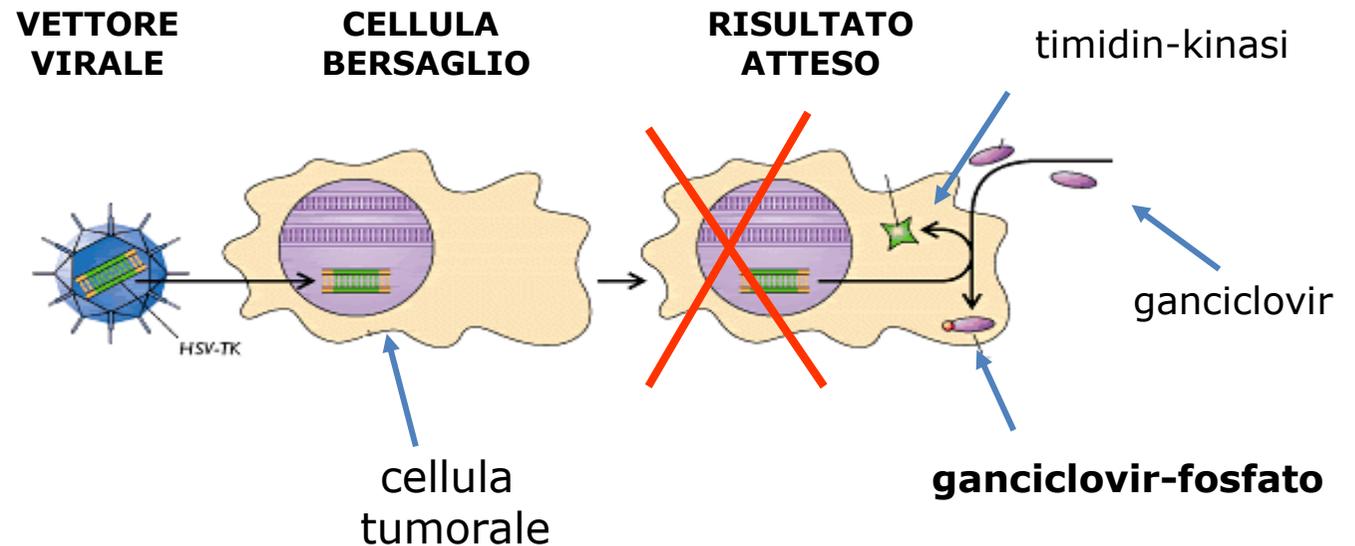


Strategie a confronto

**TERAPIA GENICA
COMPENSATIVA**
per patologie
ereditarie



**TERAPIA GENICA
ABLATIVA**
(SILENZIAMENTO GENICO)
per patologie
tumorali



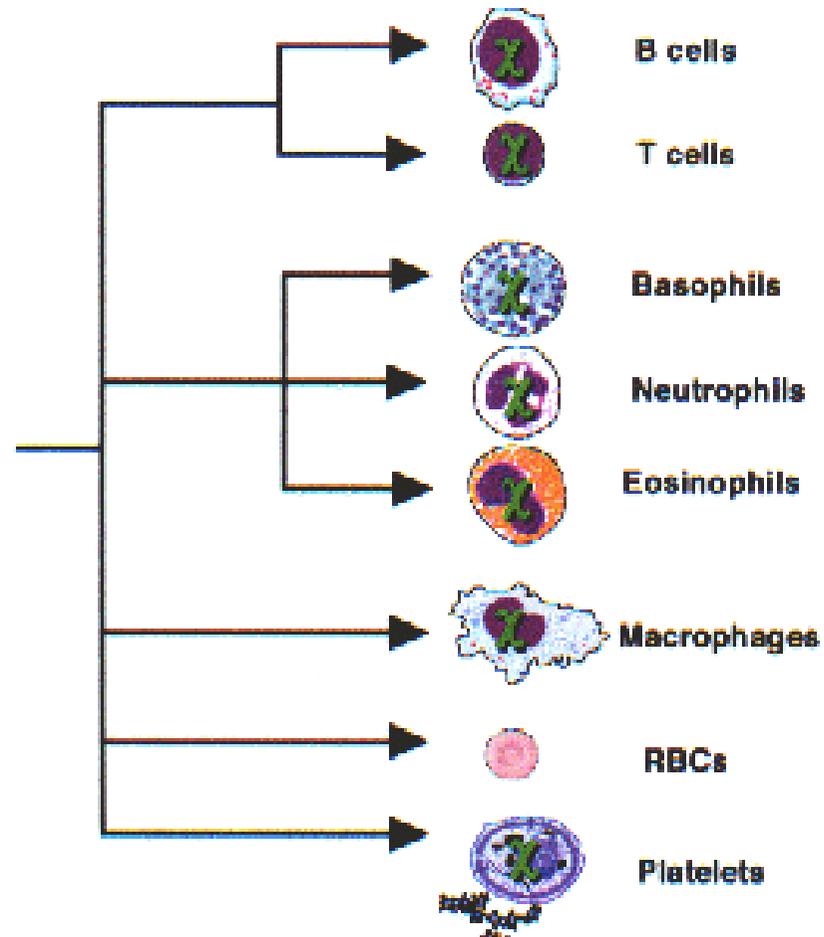
Terapia genica in Cellule Staminali

STEM CELL GENE THERAPY

Cellula staminale CSE



Introduzione
del gene
terapeutico



Gene terapeutico verrà espresso in tutte le cellule del sangue

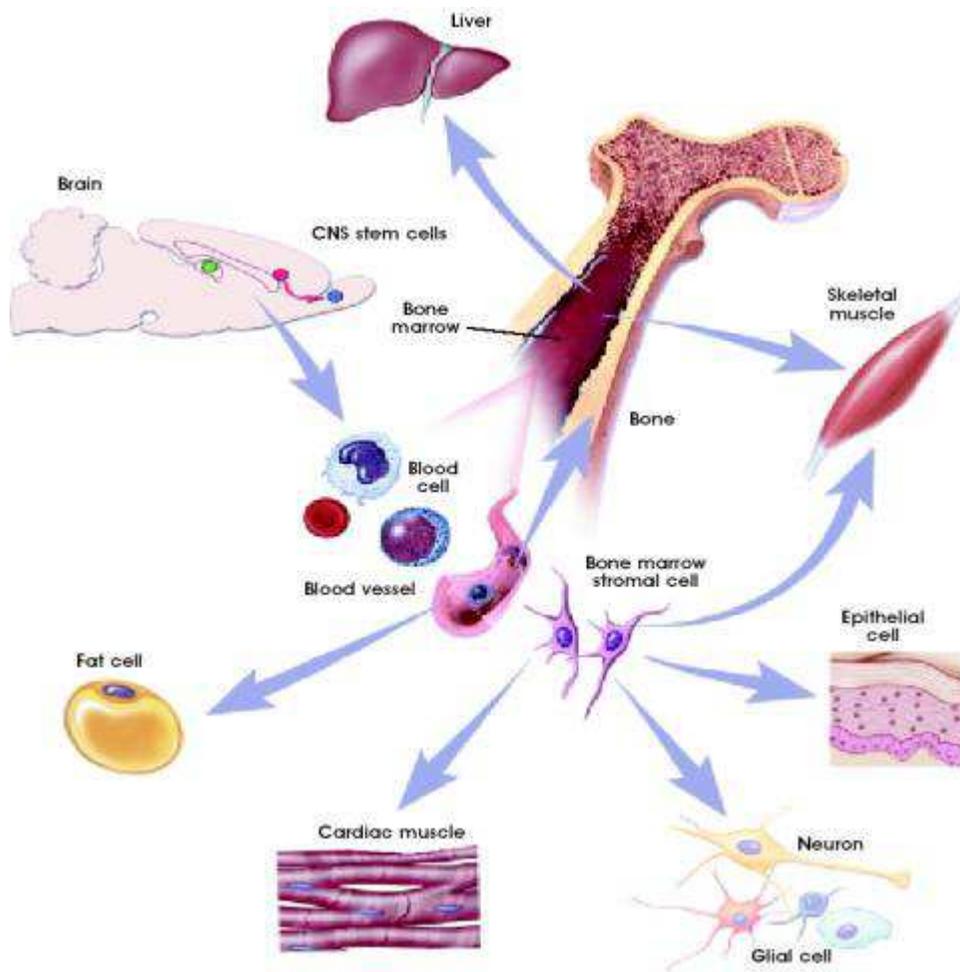
Perché usare le cellule staminali ematopoietiche?



- Cellule che si autorinnovano: nessuna necessità di ripetute somministrazioni
- Poco numerose e facilmente rimosibili
- Facilmente identificabili, manipolabili e reintroducibili
- Il gene terapeutico risiederà in tutte le cellule derivate
- CSE possono migrare in numerosi distretti corporei (midollo osseo, fegato, milza, linfonodi) e funzionare come vettori di trasferimento genico

Terapia cellulare e genica

- ✓ Trapianti cellulari
- ✓ Trapianto cellule staminali geneticamente modificate *ex-vivo*
- ✓ Plasticità cellule staminali



SUCCESSI

- ✓ ADA-SCID, Aiuti, 2002
- ✓ X-SCID, Hacein-Bey-Abina, 2002
- ✓ Epidermolisi bullosa, De Luca, 1998
- ✓ Ferite epidermide, Quesenberry, 2002

POTENZIALITA'

- ✓ Malattie metaboliche
- ✓ Malattie ematologiche
- ✓ M. Parkinson
- ✓ M. di Alzheimer
- ✓ Infarto
- ✓ Diabete
- ✓ Artrite reumatoide

Terapia genica: risultati

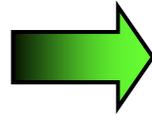
- Buoni risultati in modelli animali
- Pochi esempi di risultati a lungo termine nell'uomo
(X-SCID, ADA-SCID, Emofilia A)
- Procedure di rilascio genico relativamente sicure
(sviluppo risposta infiammatoria sistemica, sviluppo di leucemia)
- Alcune patologie più facilmente trattabili
(espressione non regolata, tessuti accessibili: m.metab, emofilia)
- Alcune aree più promettenti
(vaccini a DNA, angiogenesi per m. cardiovascolari, trapianti cell)

Terapia genica: limiti e prospettive

Limiti attuali

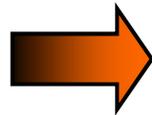
Prospettive future

bassa efficienza di
rilascio genico



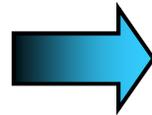
sviluppo di nuovi vettori

bassa specificità
di bersaglio



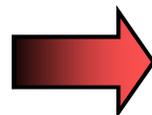
sviluppo di strategie
cellulo-specifiche

espressione
transiente e non-
fisiologica



approcci di gene-targeting

reazione immunitaria
contro i vettori



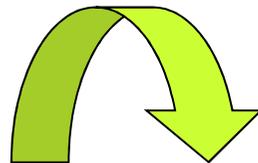
sviluppo di vettori non-
immunogenici

Terapia genica: passaggi-chiave

- ✓ comprensione dei meccanismi patofisiologici della malattia
- ✓ individuazione dell'appropriato bersaglio cellulare
- ✓ individuazione del metodo di trasferimento ottimale
- ✓ creazione di un modello animale della patologia per studi pre-clinici *in vivo*

Sicurezza e Terapia Genica

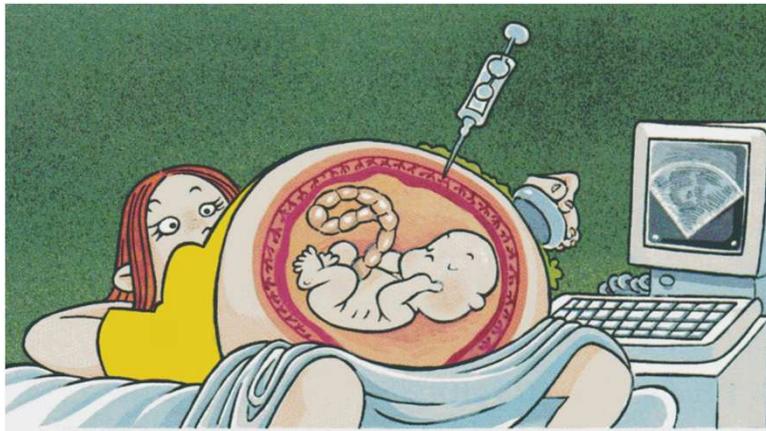
- ✓ Morte di un giovane paziente in seguito a trial clinico per OTC
- ✓ Integrazione retrovirale in vicinanza di un oncogene e sviluppo di leucemia in trial clinico per X-SCID (2/15 pazienti)



Necessità di procedimenti sicuri e criteri selettivi nella scelta dei pazienti

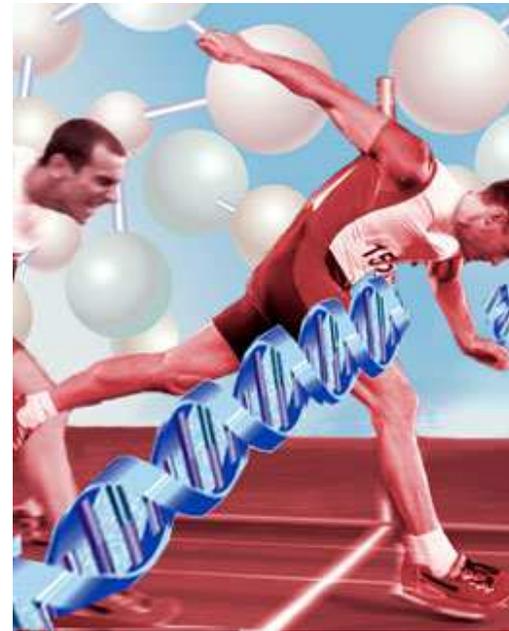
Terapia genica: quale futuro?

Terapia in utero



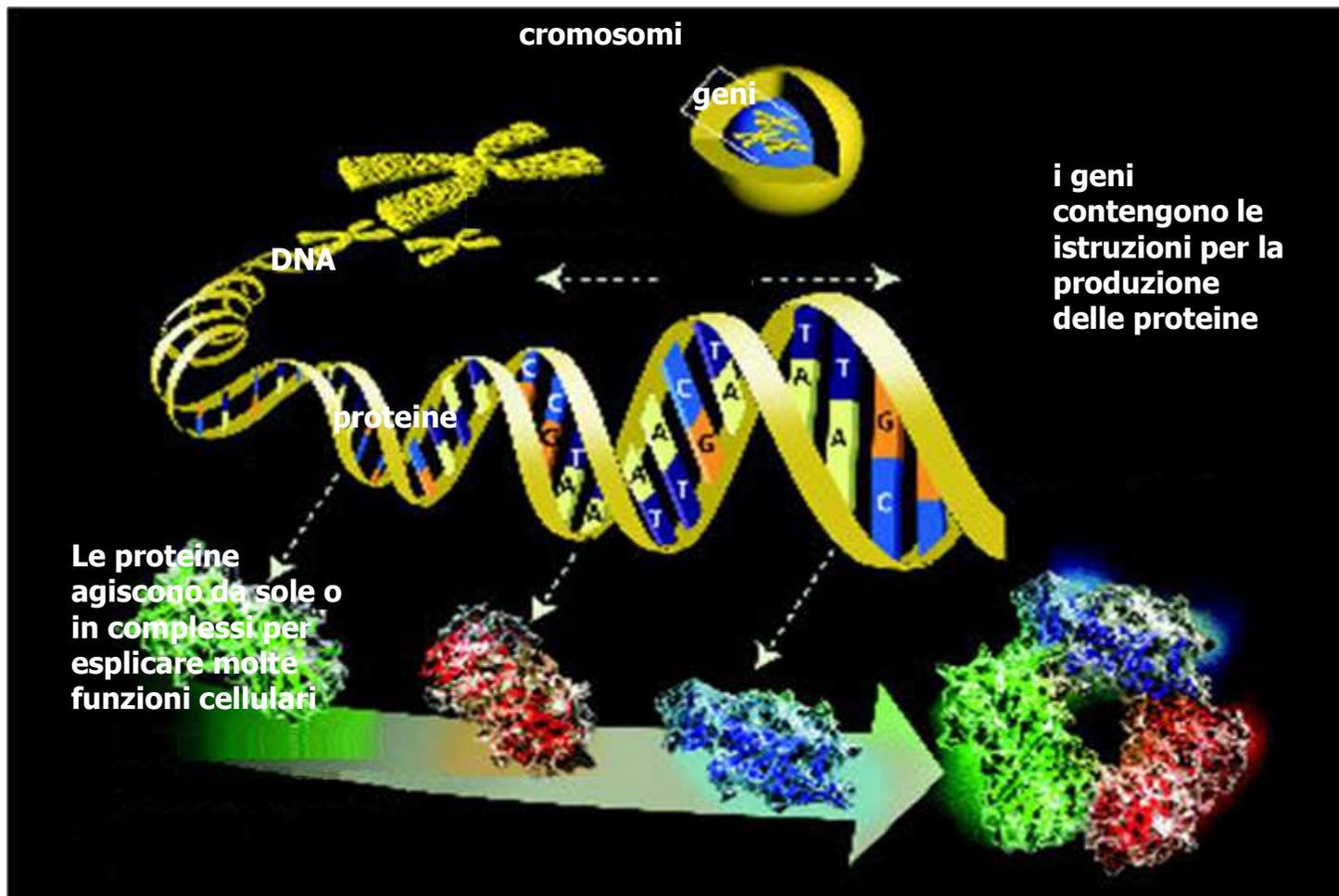
- ✓ Trapianto di midollo o cellule staminali in utero (X-SCID; SCID T-B+)
- ✓ Terapia genica ?

Enhancement



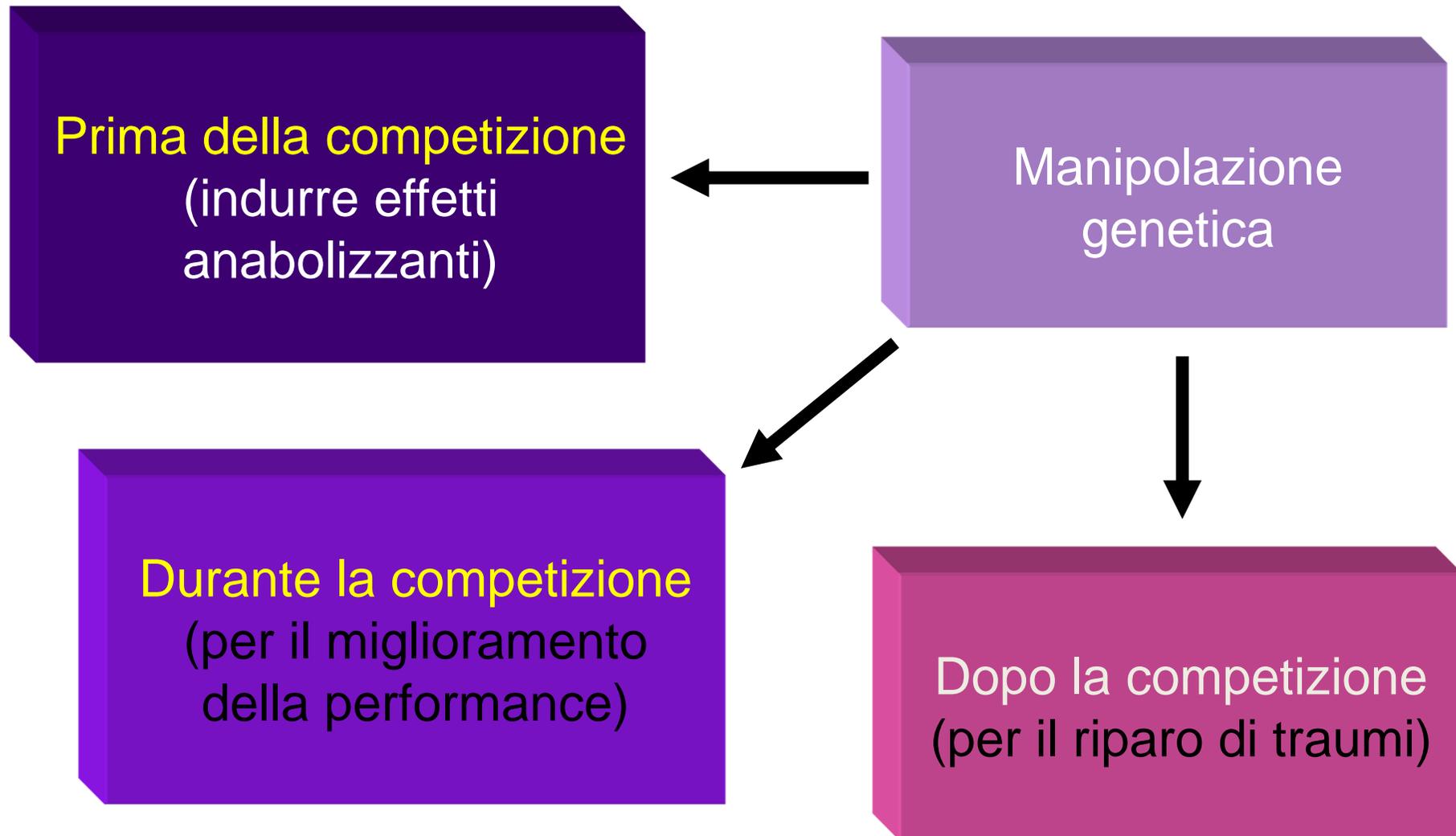
- ✓ Performance atletica ?
- ✓ Altezza ?
- ✓ Aspetto fisico ?

Doping Genetico e sport



Doping Genetico e Sport

I tre possibili livelli del doping genetico nello sport



Quali approcci di ingegneria genetica si possono ipotizzare come doping genetico nello sport?

- ex vivo, tessuto emopoietico:
modificare l'emopoiesi (recettore EPO, trasporto O₂...)
- in vivo locale (es. muscolo):
fattori di crescita, modificatori fibre muscolari
cardio-modulatori, ecc.
- in vivo locale (es. articolazioni):
sostanze antidolorifiche, inibitori dell'infiammazione,
fattori di riparo, ecc.
- in vivo sistemico:
anabolizzanti, fattori ormonali, killer del dolore, controllo
vascolare, ecc.

Doping Genetico e Sport

IL TESSUTO MUSCOLARE COME TARGET DI TERAPIA GENICA È OTTIMALE IN QUANTO:

- **È molto abbondante nell'organismo**
- **Ottimamente vascolarizzato**
- **Facilmente accessibile**

Studi di laboratorio su animali, hanno dato risultati positivi utilizzando metodi in vivo ed ex vivo.

GENI CANDIDATI nel DOPING GENETICO per migliorare le prestazioni sportive

GENI CORRELATI ALLA RESISTENZA ALLO SFORZO (ENDURANCE)

- Eritropoietina (**EPO**)
- recettore **PPARD** che attiva la proliferazione dei perossisomi
- Geni correlati all'angiogenesi: **VEGF, TGF, HGF**

GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA MUSCOLARE

- Fattori per il controllo della crescita muscolare: **MGF** e **IGF-1**;
- Fattori per il controllo della massa muscolare: **GH**;
- Fattori ipertrofici: **miostatina** che è considerato un regolatore negativo della crescita muscolare: l'assenza di miostatina stimola l'ipertrofia e l'iperplasia muscolare.

COME PUO' ESSERE UTILIZZATO IL "GENE DOPING"

Introducendo

1. ERITROPOIETINA (EPO)

1. Svensson E et al. Human Gene Therapy (1997): utilizzarono vettori adenovirali per il trasferimento del gene per l'EPO in topi e scimmie
 - Effetto: aumento dell'ematocrito dal 49 a 81% nel topo e dal 40 al 70% nelle scimmie dopo iniezione intramuscolo.
 - Durata: l'effetto perdurava più di un anno nel topo e circa 12 settimane nella scimmia.
2. Zhou S et al. Gene Therapy 1998: ottennero gli stessi risultati ripetendo esperimenti simili in altri primati.

COME PUO' ESSERE UTILIZZATO IL "GENE DOPING"

Introducendo

1. ERITROPOIETINA (EPO)

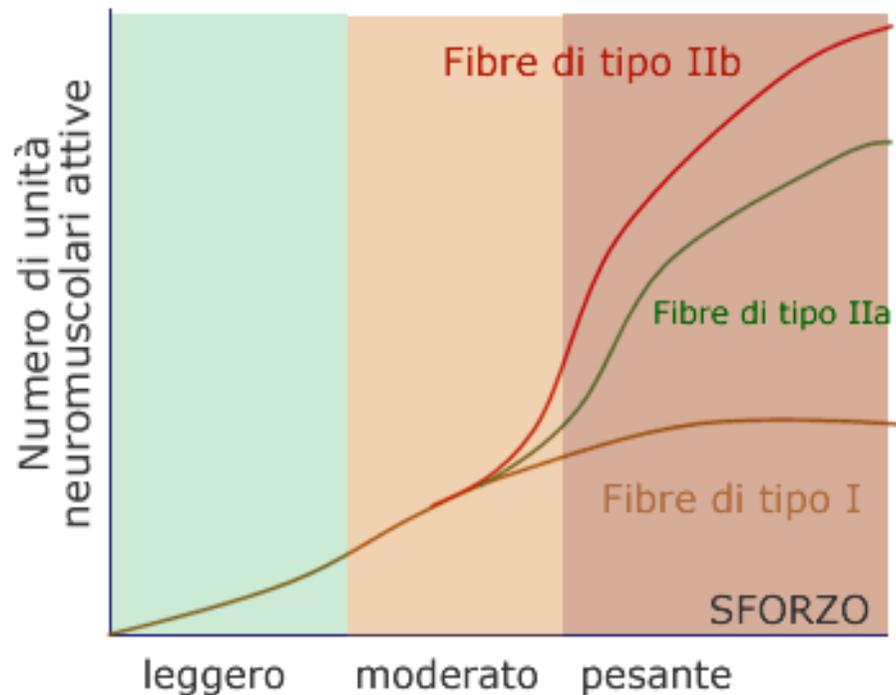
PROBLEMI:

- Livelli eccessivi di ematocrito possono causare trombosi
- In famiglie in cui sono presenti mutazioni del gene EPO sono frequenti casi di morte precoce per infarto o episodi acuti cerebrali.
- Iniezioni ripetute possono avere effetto ridotto per lo sviluppo di risposta immunitaria verso il vettore virale.
- Rischio di mutagenesi inserzionale: cancro

GENI CORRELATI ALLA RESISTENZA (ENDURANCE)

2. PPARD (*peroxisome proliferator-activated receptor delta*)

L'espressione di **PPARD** promuove il passaggio delle fibre muscolari da tipo **IIb** a contrazione rapida a quelle di tipo **IIa** e di tipo **I** lente che è quello che accade fisiologicamente in seguito ad esercizio fisico costante.



E' stato prodotto un composto sintetico (GW501516) in grado di legarsi al recettore del PPARD e di attivarlo e potrebbe quindi rappresentare un possibile agente dopante nell'uomo.

GENI CORRELATI ALLA RESISTENZA (ENDURANCE)

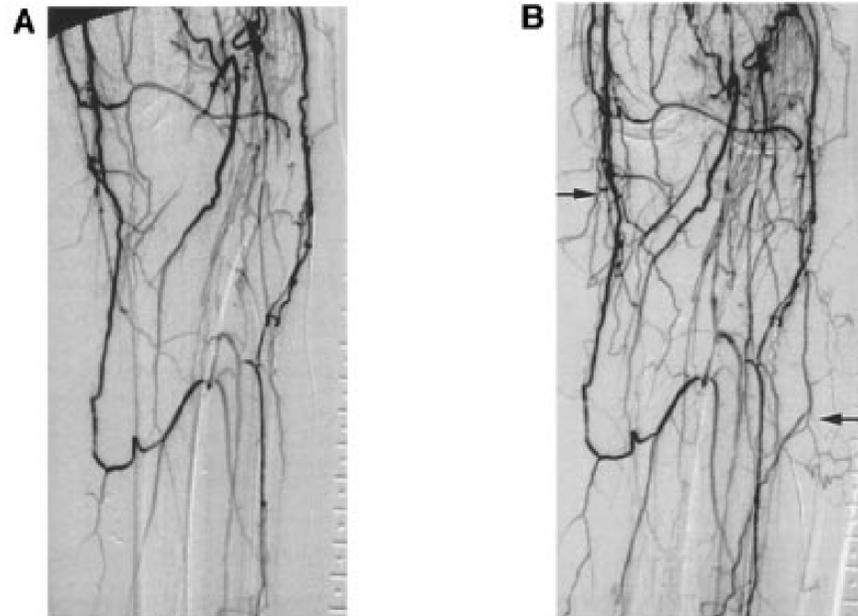
3. GENI CORRELATI ALL'ANGIOGENESI

- fattore di crescita endoteliale vascolare (**VEGF**)
- fattore di crescita tissutale (**TGF**)
- fattore di crescita degli epatociti (**HGF**)

L' espressione di questi geni infatti è correlata all'aumento della formazione di nuovi vasi sanguigni e quindi ad un maggiore apporto di ossigeno ai tessuti con conseguente aumento della capacità di resistenza allo sforzo fisico.

Terapia genetica su umani con VEGF (vascular endothelial growth factor)

Vasi sanguigni di un
paziente che ha
ricevuto l'inoculazione
di un "vettore" in cui è
stato inserito il gene
VEGF



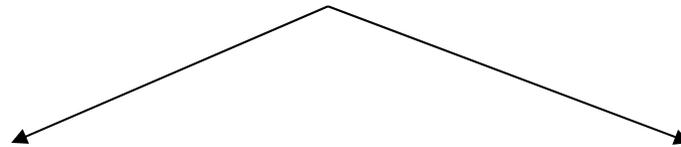
PRIMA

DOPO

Baumgartner et al. *Circulation* (1998) **97**:1114-1123

**GENI CORRELATI ALL'AUMENTO
DELLA MASSA MUSCOLARE e ALLA
RIGENERAZIONE**

**CRESCITA E RIGENERAZIONE
DEL TESSUTO MUSCOLARE**



AUMENTANDO

L' ESPRESSIONE DI GENI
CHE HANNO UN' AZIONE
STIMOLANTE COME:

IGF1 e GH

INIBENDO

GENI CHE DI SOLITO
AGISCONO COME
REPRESSORI DEI
PROCESSI DI CRESCITA
COME:

MIOSTATINA

GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA MUSCOLARE e ALLA RIGENERAZIONE

1. IGF-1 MUSCOLARE (*mIGF-1*)

Il gene IGF-1 ha il compito di riparare il muscolo, quando, durante l'esercizio, subisce microtraumi.

La fibra si ripara e cresce, ritrovandosi con più miofibrille rispetto a prima della lesione. Il segnale di stop alla crescita viene dato da un'altra proteina, la **miostatina**.

L'inserimento di un extra-gene IGF-1, permetterebbe di aggirare il meccanismo di equilibrio, inducendo l'ipertrofia del muscolo e la crescita incontrollata delle fibre.

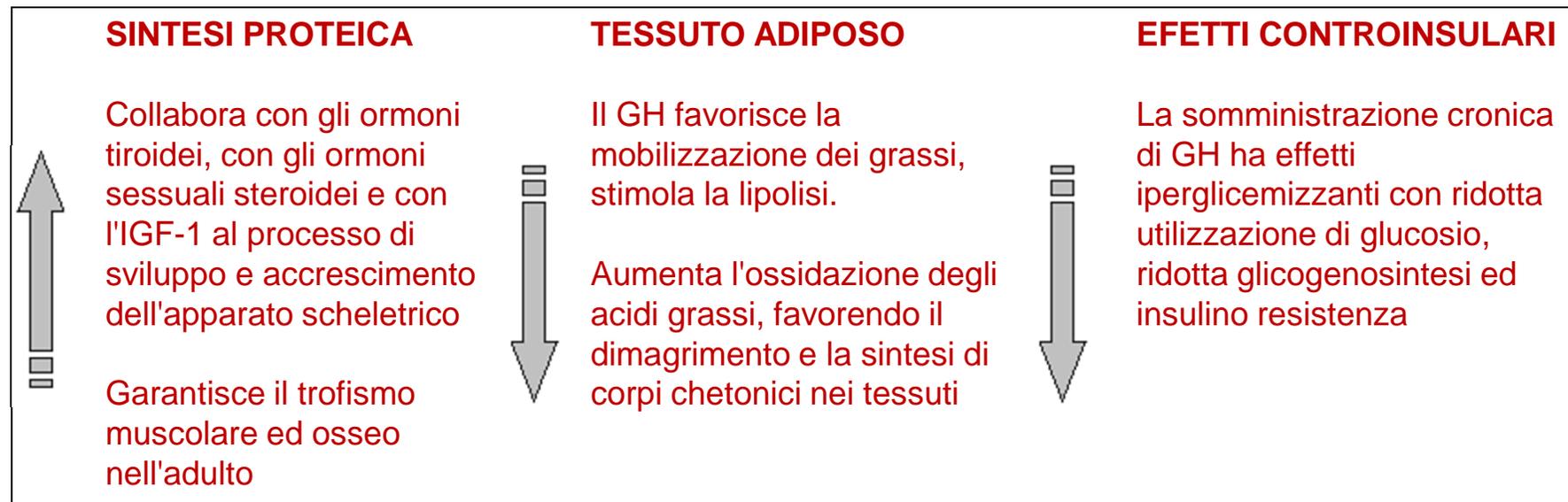
GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA MUSCOLARE e ALLA RIGENERAZIONE

2. ORMONE DELLA CRESCITA (GH)

L'attività sportiva rappresenta un forte stimolo per la secrezione di GH

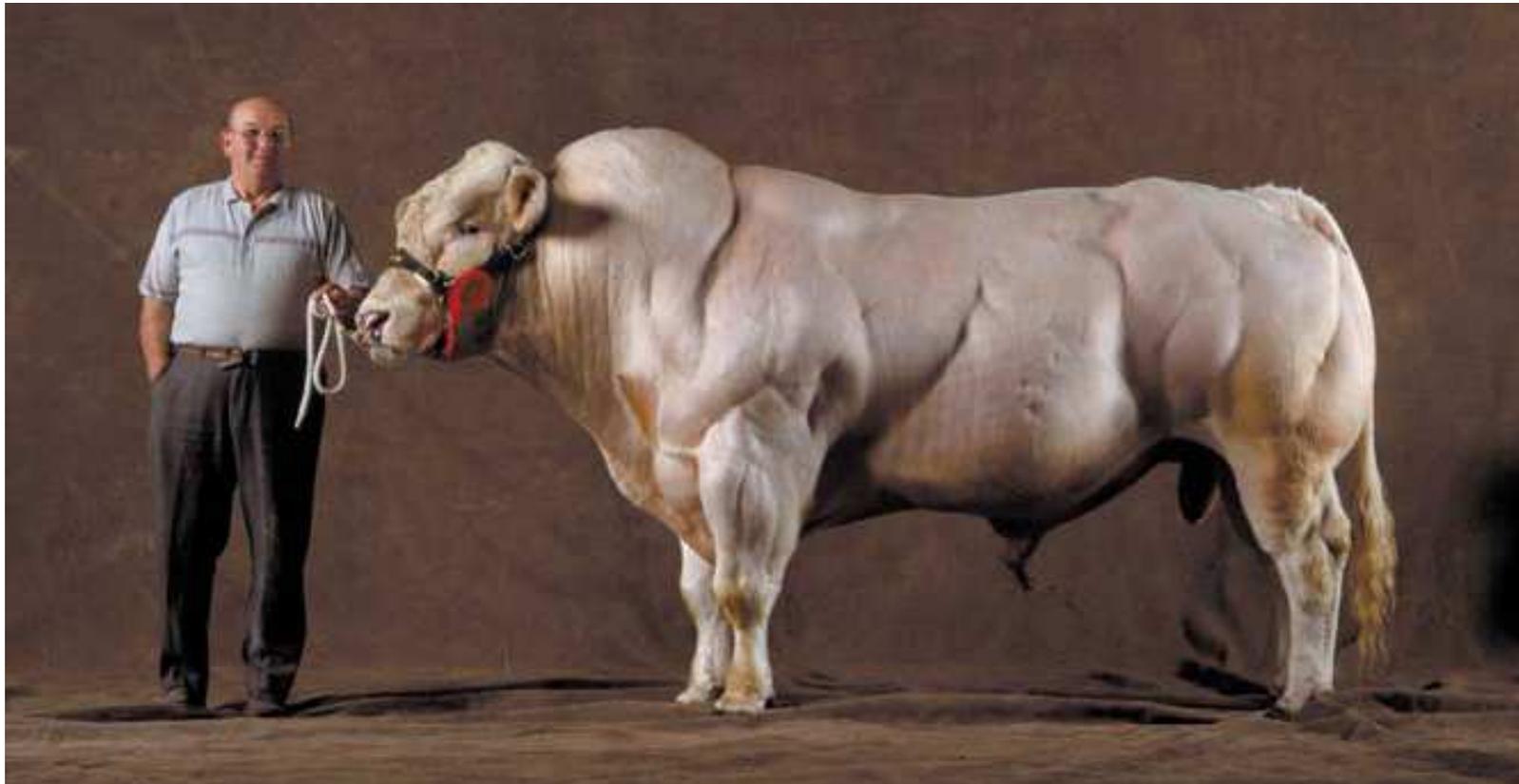
La secrezione di GH nel corso di attività fisica è influenzata in modo particolare da:

- Intensità dello sforzo
- Allenamento del soggetto
- Temperatura ambiente



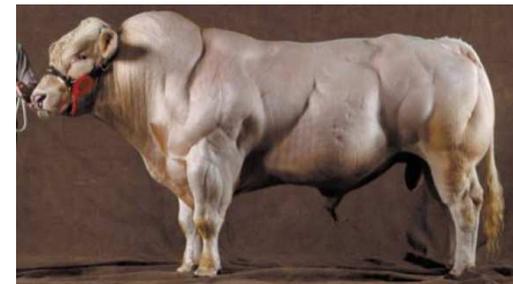
GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA
MUSCOLARE e ALLA RIGENERAZIONE

3. Inattivazione Miostatina



➔ **Gene della miostatina**

- La miostatina è una proteina regolatrice della crescita muscolare. Appartiene alla superfamiglia dei TGF-beta (transforming growth factor-beta)
- E' responsabile del differenziamento dei muscoli scheletrici
- Ha una funzione inibitoria della proliferazione delle cellule satelliti alle fibre muscolari.
Mutazioni genetiche del gene miostatina provocano abnormi crescite dei muscoli:
es. ceppo bovino *Belgium blue bull*



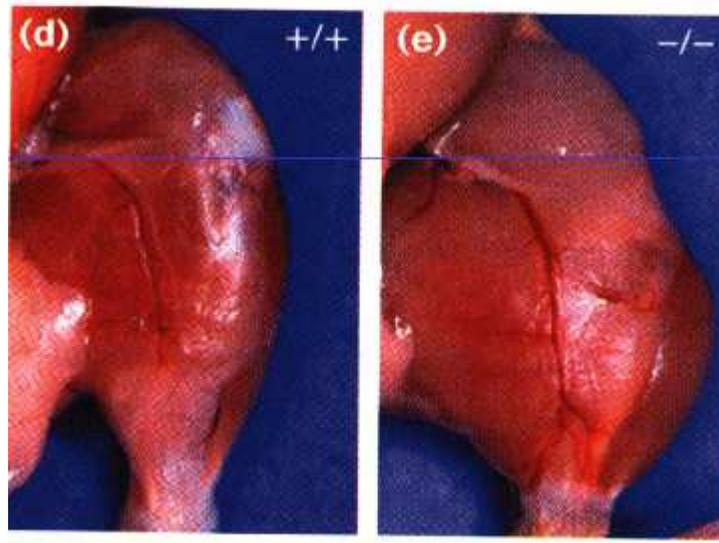
Approcci al doping genetico

- ➔ 1. modificare per mutagenesi il gene miostatina
- 2. somministrare un inibitore della miostatina: follistatina.

Topi Schwarzenegger

Rimozione del Gene Miostatina in topi:

Arto anteriore di un topo normale



Arto anteriore di un topo privo del gene della miostatina

Topo normale

Topo know-out: rimosso il gene miostatina

Lee et al. Curr. Opin. Gen. Dev. (1999) 9:604-607

Esperimenti su topi

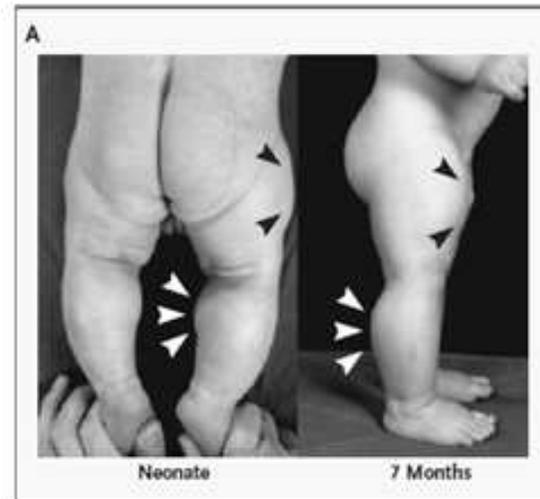
Topi privati del gene della miostatina (topi knock out) sviluppano una muscolatura ipertrofica:



T. Hertrampf et al, FIT 1/2004

GENI CORRELATI ALLA CRESCITA E ALLA RIGENERAZIONE MUSCOLARE

Gene MIOSTATINA nell'uomo:



Nel 2004, studiando un bambino tedesco di 5 anni che presentava uno sviluppo abnorme della forza e della massa muscolare venne identificata per la prima volta nell'uomo la presenza di una mutazione nel gene che codifica per la miostatina.

Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE et al. Myostatine mutation associate with gross muscle hypertrophy in a child. New England Journal Medicine 350:2682-88 (2004).

RISCHI POTENZIALI DEL GENE DOPING

- Reazioni immunitarie anche letali**
- Problemi correlati alla preparazione dei vettori in laboratori non controllati (contaminazioni o produzione di vettori virali virulenti)**
- Problemi correlati all'eccessivo sviluppo delle masse muscolari con effetti dannosi su tendini e ossa**
- Problemi legati alla integrazione del vettore nel genoma dell'individuo: possibile mutagenesi o danneggiamento di geni endogeni.**
- Sviluppo di neoplasie sia per mutagenesi inserzionale sia per overespressione di sostanze (come GH) che sono potenti mitogeni e anti-apoptotici**

Si può scoprire il doping genetico?

- La proteina prodotta è uguale alla proteina endogena
- Il DNA artificiale è presente solamente in sede locale quando si pratica un'iniezione col DNA puro o con cellule modificate geneticamente
- Si dovrebbe conoscere la sequenza del DNA artificiale per poterla rilevare

“Genetic Doping” with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable

Françoise Lasne,^{1,*} Laurent Martin,¹ Jacques de Ceaurriz,¹ Thibaut Larcher,²
Philippe Moullier,^{2,3,*} and Pierre Chenuaud²

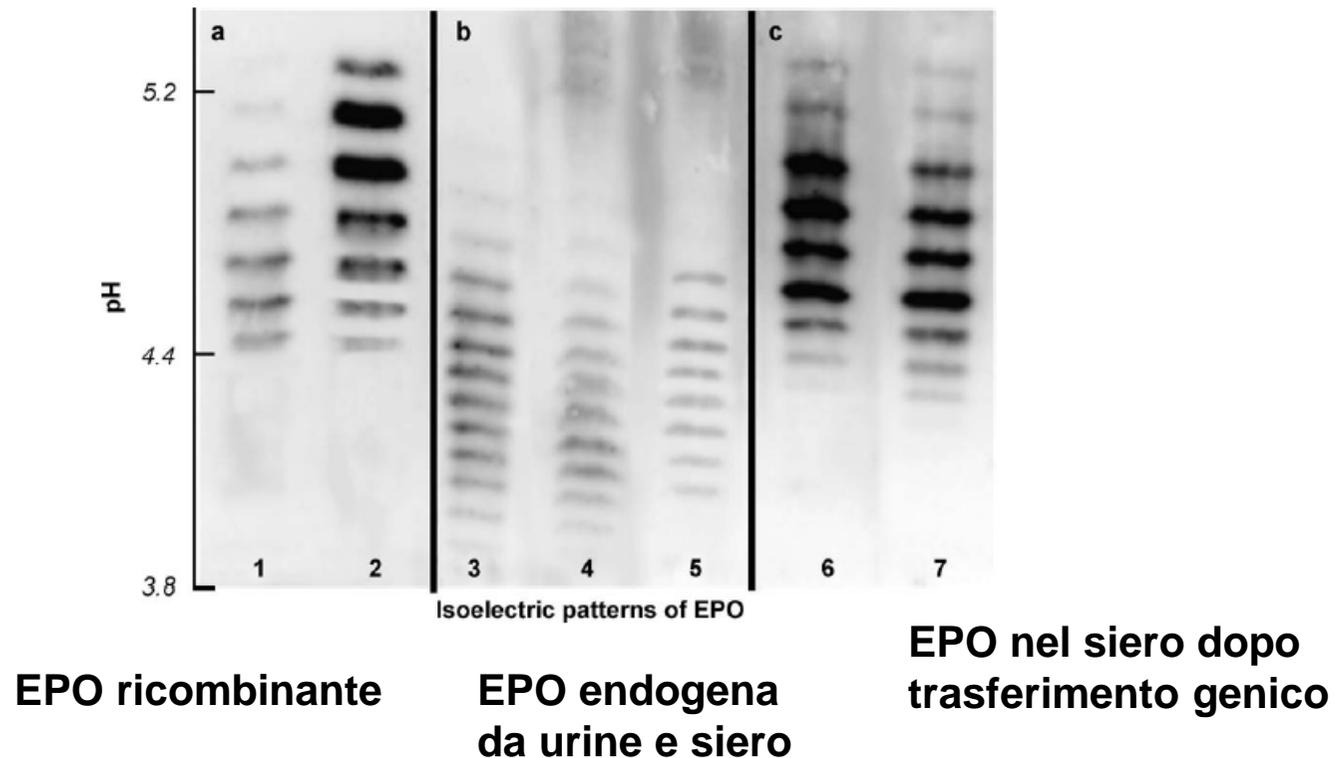
¹National Anti-Doping Laboratory, 92290 Chatenay-Malabry, France

²INSERM U 649, CHU Hotel-Dieu, and

³EFS Pays de Loire, 44035 Nantes, France

*To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Laboratoire de Therapie Genique, Inserm U649, CHU Hotel-Dieu, Bat. J. Monet, 30 boulevard Jean Monnet, 44035 Nantes, Cedex 01, France

Available online 8 August 2004



Rischi ipotizzabili con il doping genetico

A breve-medio termine

- Autoimmunità
- Sindrome simil-influenzale
- Shock tossico

A lungo termine

- Fibrosi
- Tumori
- Effetti avversi tipici dei fattori stimolati
- Impossibilità di terapia genica futura (immunità)

Legati alle modalità di trattamento

- Malpratica (vettore o via somministrazione inadeguati)
- Materiale contaminato (patogeni o allergeni)
- Mancanza di follow-up

Anti-Doping Administration & Management System (ADAMS)

Cosa è ADAMS ?

é uno strumento che assiste nell'implementazione di controlli anti-doping. E' in pratica un calendario messo su rete a cui accedono atleti e controllori.

Gli atleti forniscono la propria reperibilità, i laboratori riportano i dati e le autorità coordinano le azioni

ADAMS PER SPORT DI SQUADRA

- ADAMS contiene un modulo per squadre compilato da un responsabile di squadra. Questi inserisce le info dei suoi giocatori relative alla reperibilità
- ADAMS quindi informa il singolo atleta delle info fornite dal responsabile e chiede conferma
- Gli atleti sono responsabili della propria reperibilità e non vi è possibilità di palleggiamento di responsabilità con il responsabile di squadra.

Funzioni principali di ADAMS

Reperibilità degli atleti

Essendo via web, l'atleta può aggiornare da dove vuole; se non ha accesso alla rete, può inviare sms

Strumento cruciale per i controlli a sorpresa

Clearing House – Contiene tutte le informazioni dell'atleta e consente a tutte le organizzazioni di avere semplice e rapido accesso alle informazioni.

Rappresenta garanzia di trasparenza.

- É la “banca dati” in cui i dati dell'atleta sono conservati, in particolare:
- Risultati di laboratorio
- Autorizzazioni TUE (Therapeutic Use Exemption)
- Violazioni delle norme anti-doping

Doping Control Platform

Strumento fondamentale per pianificare, coordinare, ordinare controlli e serve per la loro gestione. Consente, per esempio, di evitare duplicazioni non necessarie dei controlli.