

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

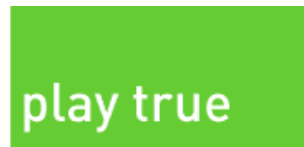
E' l'uso (o abuso) di sostanze o medicinali con lo scopo di aumentare artificialmente il rendimento fisico e le prestazioni dell'atleta.

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.

METODI DI DOPING PROIBITI

Metodi vietati sempre

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

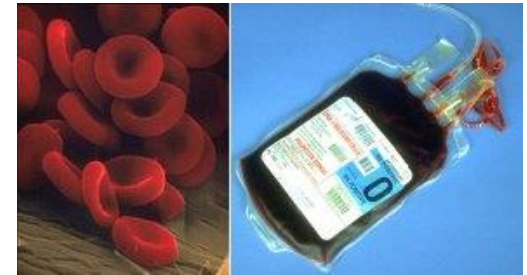
Metodi vietati sempre

Doping Ematico

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

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
 - Evita patologie tipo AIDS ed epatiti
 - Evita 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).

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%.**

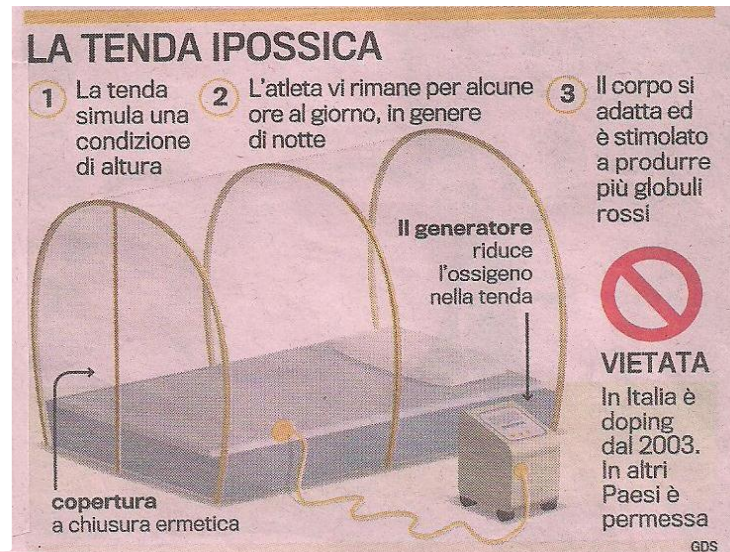
c. Camera ipobarica

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. 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.

3 – Il doping genetico

I progressi ottenuti nell'ambito della terapia genica offrono possibilità di sperimentazione per il doping sportivo

Effetti ricercati:

- possibile aumento programmato della massa muscolare
- modificazione del rapporto fibre bianche/fibre rosse
- modificazione della struttura del sarcomero o della capacità contrattile.

Effetti collaterali:

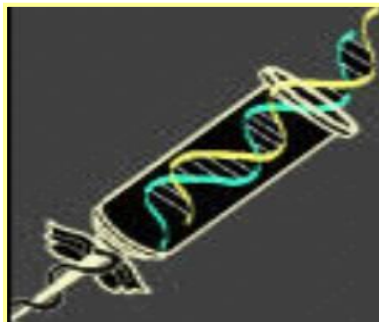
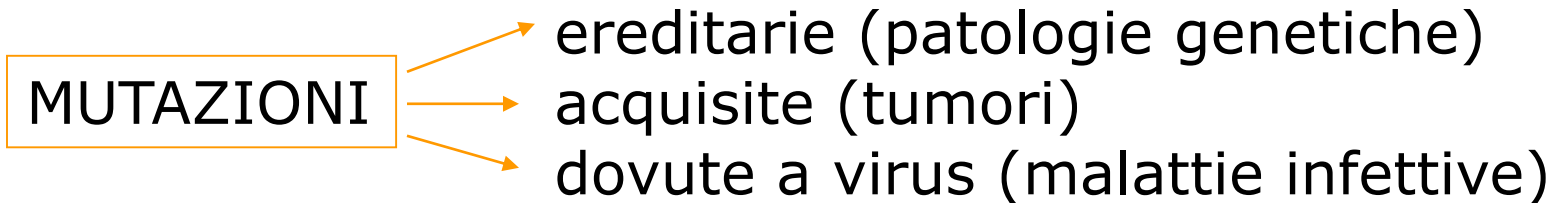
Ancora sconosciuti a causa della recente diffusione di questo metodo

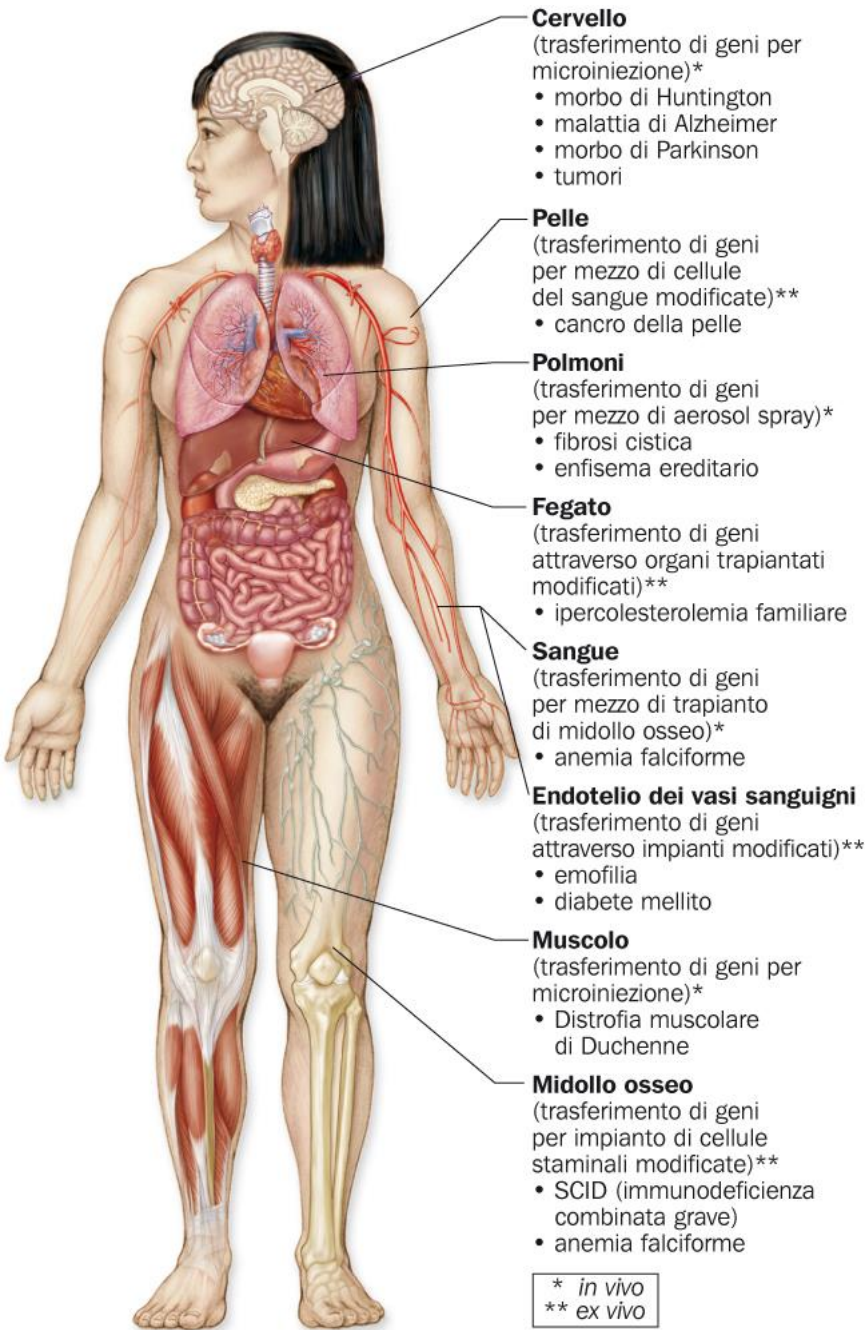
Terapia Genica: perché ?

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)





La terapia genica umana offre nuove prospettive di cura

Il DNA della nostra specie è stato sequenziato con il **Progetto Genoma Umano** (PGU) e oggi conosciamo l'ordine dei circa **tre miliardi di basi** del nostro DNA.

Il DNA può essere clonato per ricerca e terapia genetica. Singoli geni possono essere isolati, inseriti in vettori e clonati: mediante la tecnologia del DNA ricombinante possiamo trasferire geni da un organismo a un altro.

La **terapia genica** consente di inserire un gene «sano», ma estraneo, in cellule di pazienti affetti da malattie genetiche. La terapia genica può essere ***in vivo*** se il gene viene direttamente iniettato nel paziente, o ***ex vivo*** se si usa un virus vettore.

INGEGNERIA GENETICA

«manipolazione genica che consiste nell' identificare, isolare ed amplificare il DNA oggetto del nostro studio, introducendolo in un organismo dove possa replicarsi indefinitivamente; in altre parole dobbiamo **clonarlo**. Qui sotto è riportato lo schema generale di clonaggio:

Identificazione di un gene



Isolamento di un gene



Inserimento in un vettore



Introduzione del vettore in un ospite per amplificare il gene

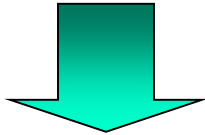


Inserire il vettore nell'ospite

Terapia genica: quale tipo?

SOMATICA

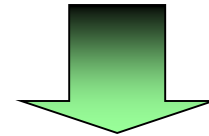
manipolazione dell'espressione genica in cellule differenziate dell'individuo adulto



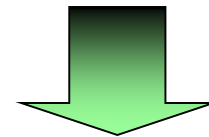
l'alterazione genica riguarda esclusivamente il paziente su cui è stata realizzata

GERMINALE

manipolazione dell'espressione genica in cellule riproduttive

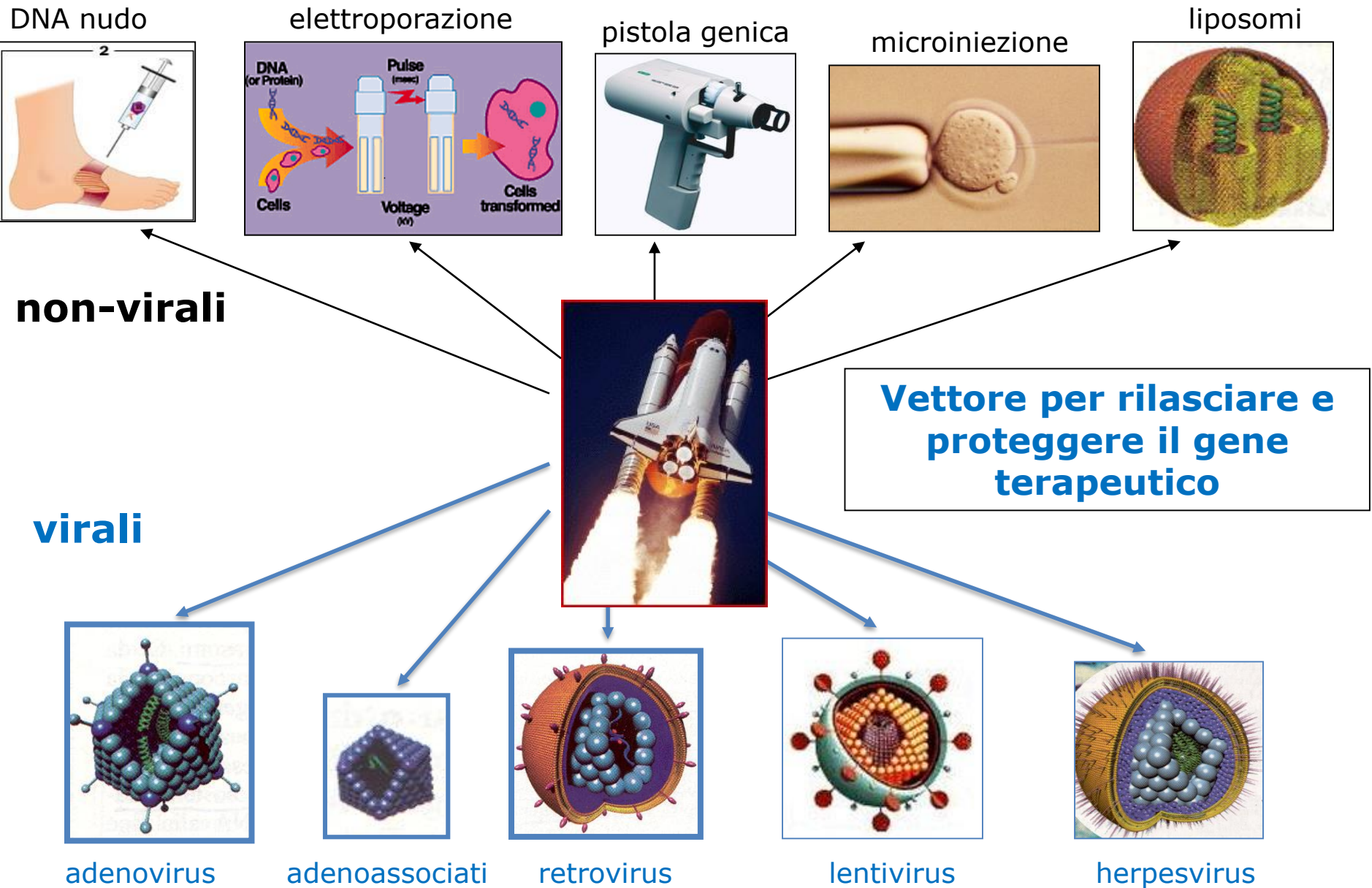


eventuali modificazioni geniche verrebbero trasmesse alla progenie



non autorizzata !!!!

TERAPIA GENICA: come ?



VETTORI PER TERAPIA GENICA

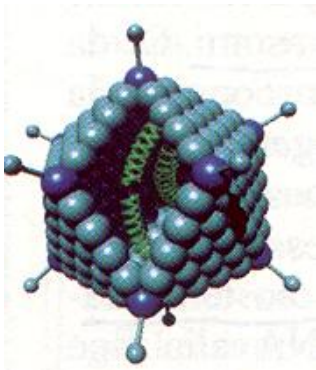
Vettori virali:

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

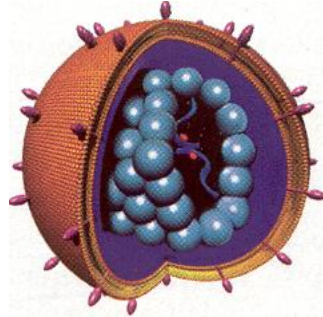
Vettori non virali:

- Plasmidi nudi
- Liposomi e polimeri
- Elettroporazione in vivo

Vettori virali



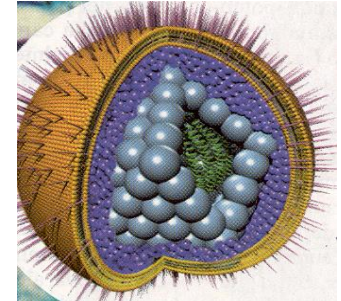
Adenovirus



Retrovirus*



Lentivirus*



Herpes-simplex
virus

Vantaggi

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

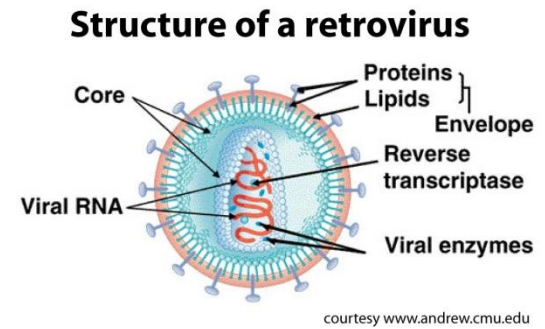


AAV*

Svantaggi

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

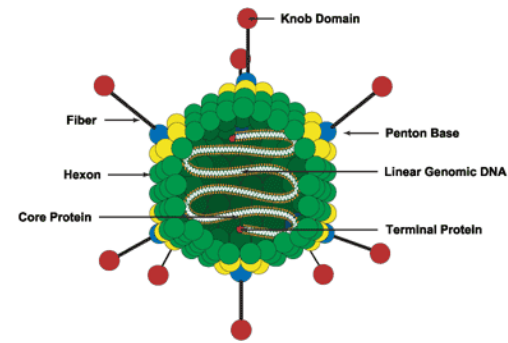
Retrovirus



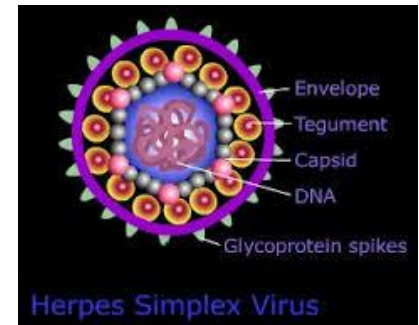
- Genoma di RNA singolo filamento.
- **Possono infettare solo cellule proliferanti**
- **Integrazione casuale nel genoma.**
- Difficile produrli in grandi quantità (titolo elevato).
- **Poco immunogeni.**
- L'espressione può andare incontro ad attenuazione nonostante la persistenza del virus nel genoma.

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**

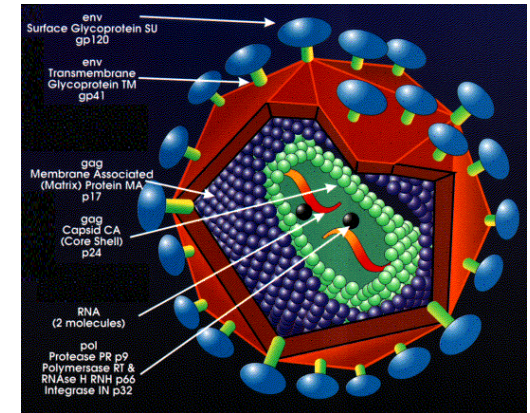


Herpes Simplex Virus (HSV)

- ❖ 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 forma episomica in uno stato latente.
- ❖ **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.

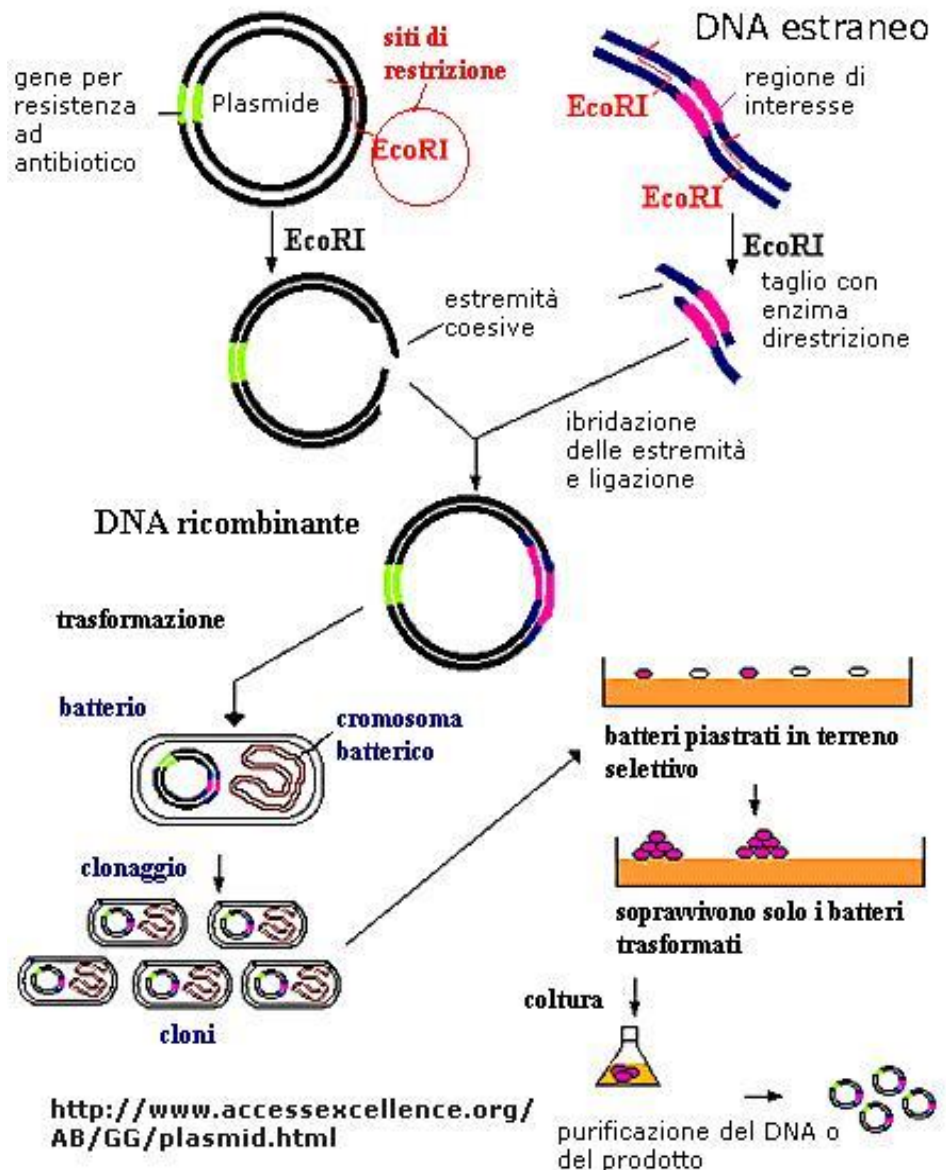


Vettori non virali:

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

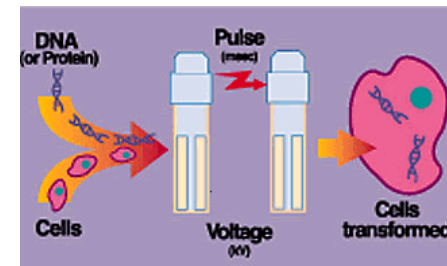
Svantaggi

- ✓ 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



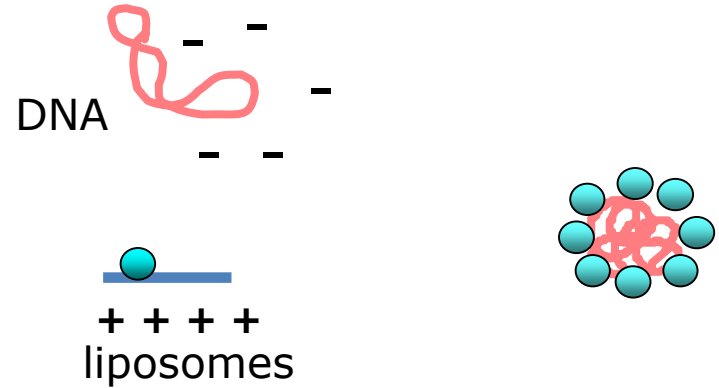
Microiniezione





Vettori non virali

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

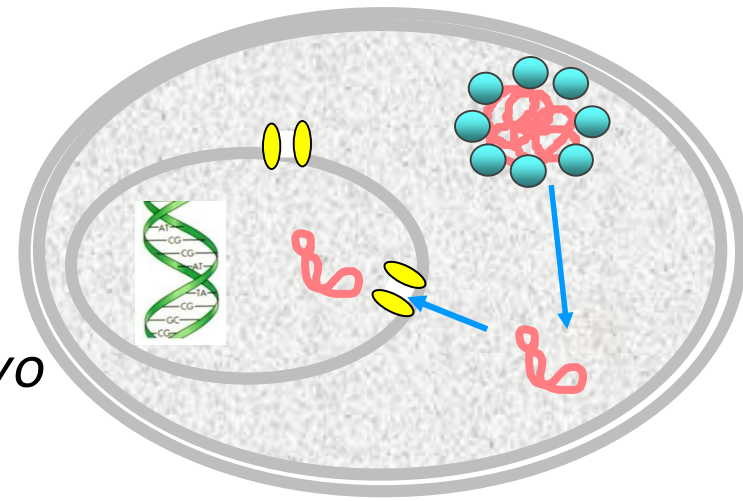


Vantaggi

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

Svantaggi

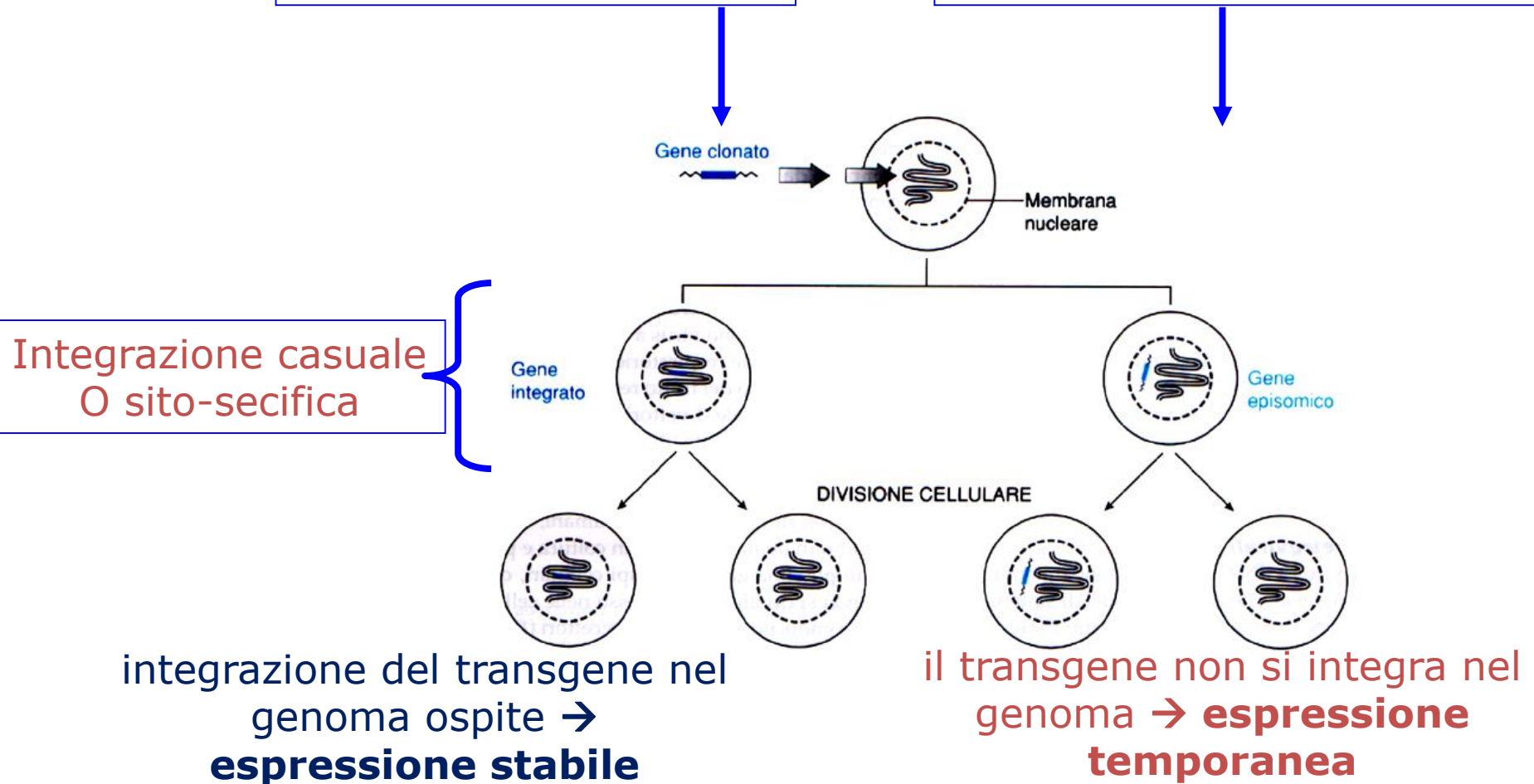
- ✓ poco efficienti nel rilascio genico *in vivo*
- ✓ espressione transitoria
- ✓ difficoltà a rilasciare il DNA nel nucleo



Cosa succede al DNA quando è entrato nella cellula ospite?

1. Vettori virali

2. Vettori non virali



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

Terapia genica: come?

ex vivo

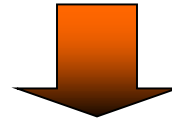
Le cellule bersaglio (es. SC) sono prelevate dal paziente, modificate geneticamente in laboratorio e reintrodotte nello stesso individuo



- ✓ 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, barriera

Trasferimento Genico *in vivo*

Aerosol



Iniezione diretta
(miocardio)



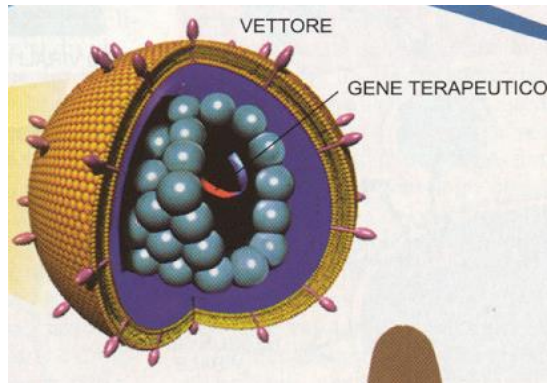
Perfusione organo



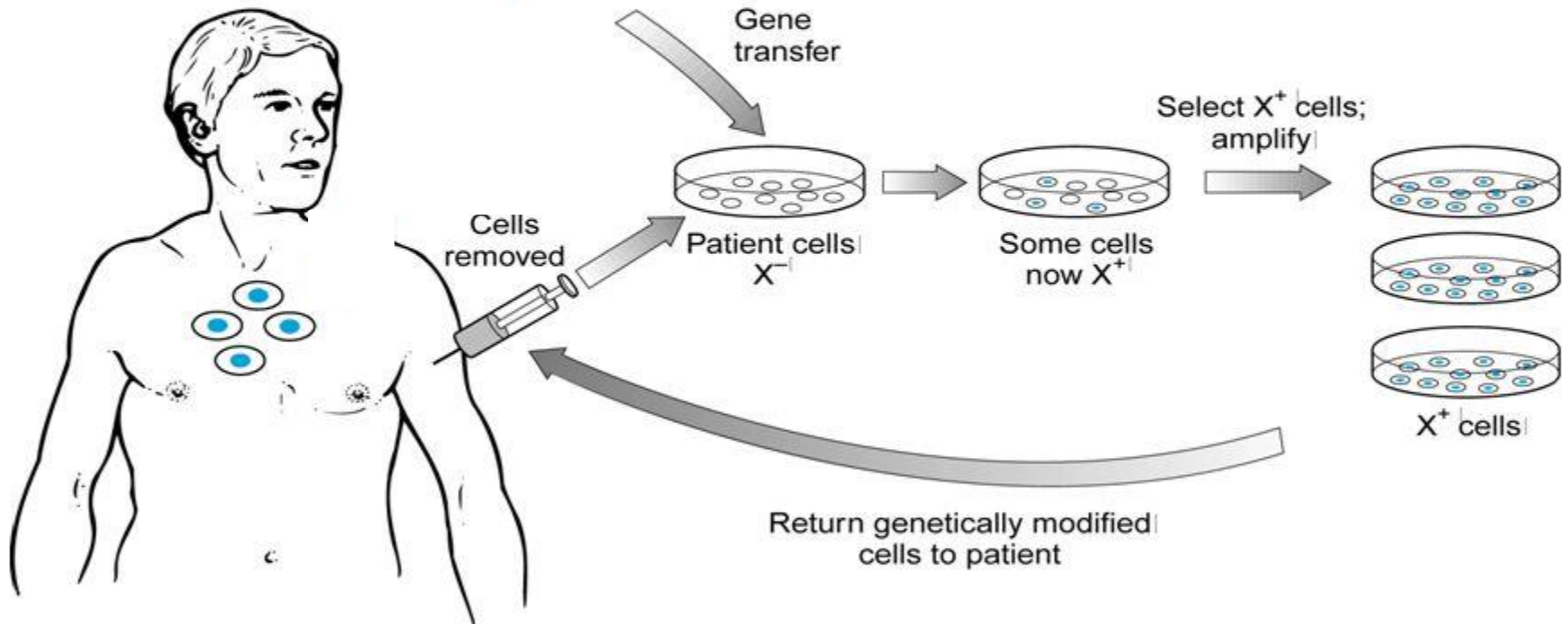
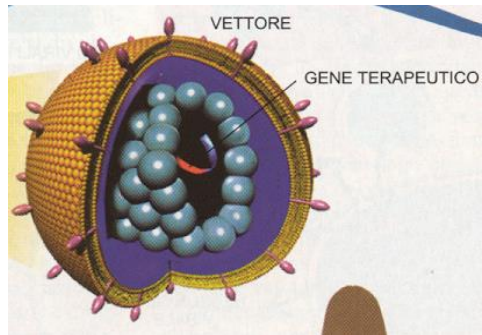
Uso di cateteri
(tumori solidi)

Gene gun/elettroporazione
(miofibrille, epidermide)

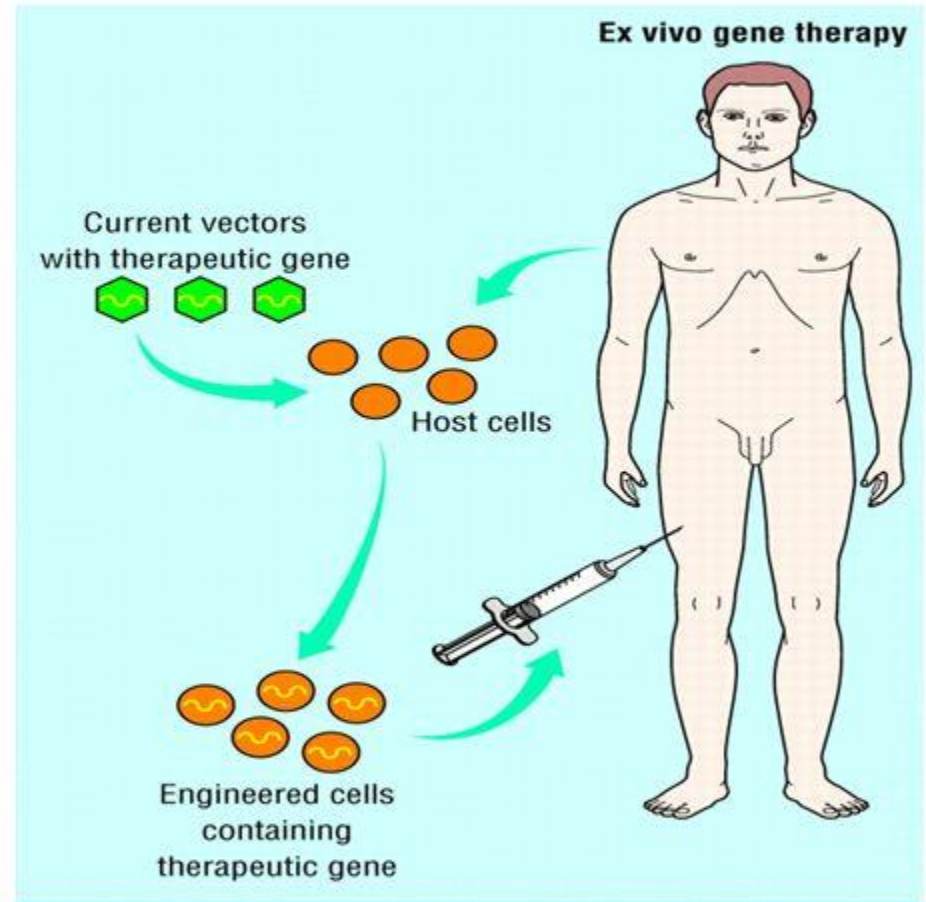
Via sistemica



TERAPIA EX-VIVO



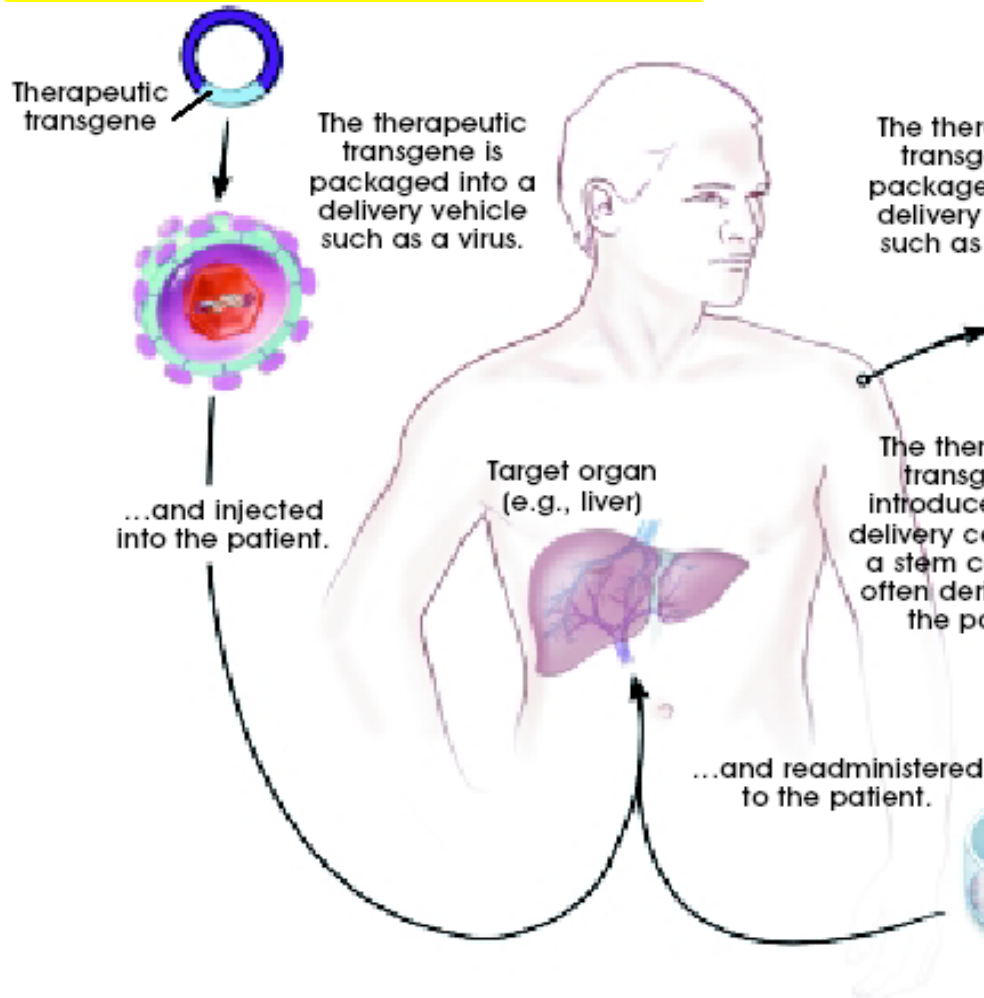
La terapia genica ex-vivo offre tuttavia la possibilità di **selezionare** le cellule in cui l'integrazione abbia avuto successo, di amplificarle in coltura e di analizzarne i fenotipi per evidenziare una qualsiasi trasformazione neoplastica prima che le cellule vengano ritrasferite nel paziente



TERAPIA GENICA: come ?

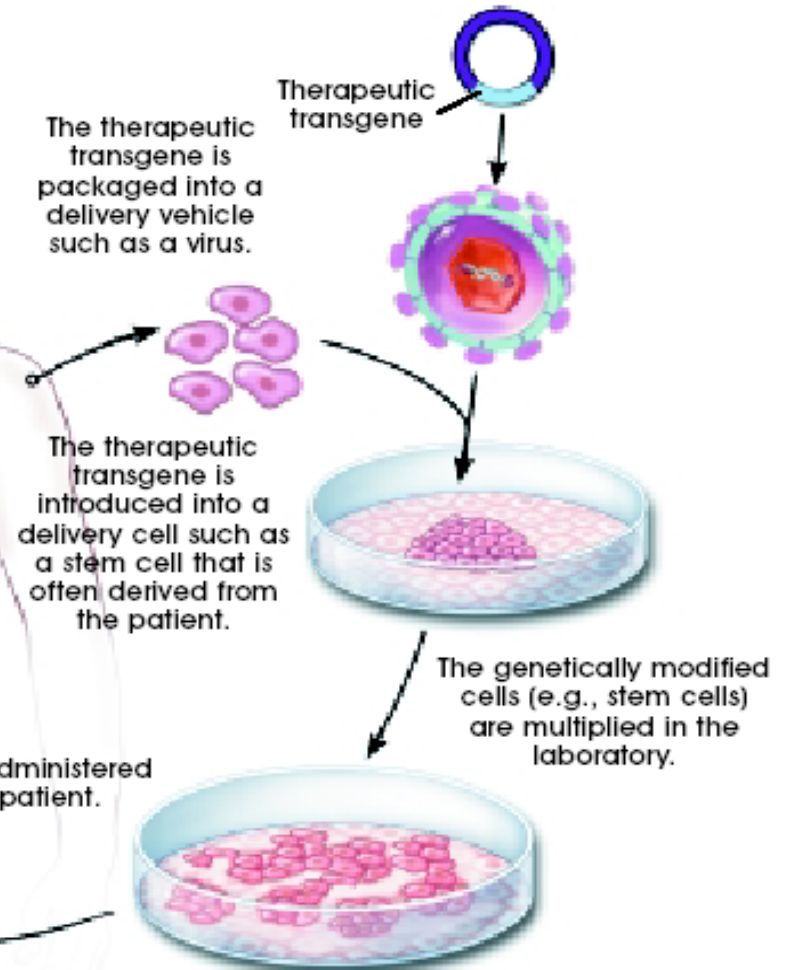
IN VIVO

Rilascio gene modificato



EX-VIVO

Rilascio cellule modificate



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 geneticamente modificate

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

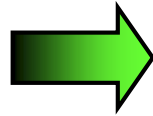
Traumi (fratture ossee, ferite, ustioni) - Ischemie

Terapia genica: limiti e prospettive

Limiti attuali

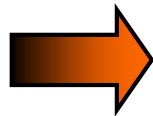
Prospettive future

bassa efficienza di
rilascio genico



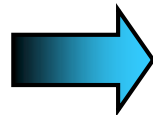
sviluppo di nuovi vettori

bassa specificità
di bersaglio



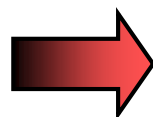
sviluppo di strategie
cellulo-specifiche

espressione
transiente e non-
fisiologica



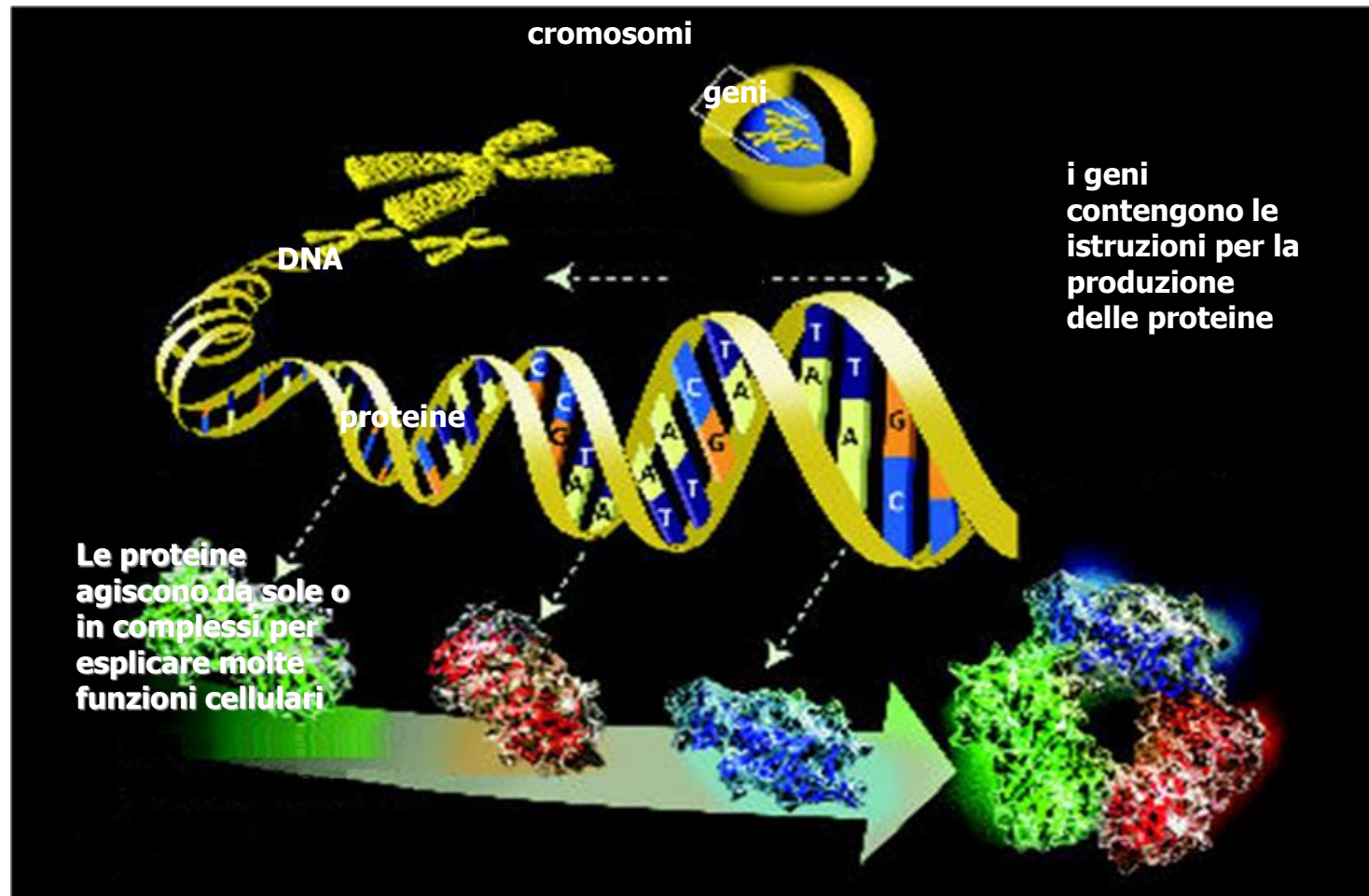
approcci di gene-targeting

reazione immunitaria
contro i vettori



sviluppo di vettori non-
immunogenici

Doping Genetico e sport



Nel 2003 il C.I.O. e la WADA hanno inserito il doping genico nella lista comune delle metodiche proibite

Rilevazione di doping genico

Plasmide = poco immunogeno, costi di produzione ridotti, facilità riproduzione e manipolazione; scarsa efficienza di trasduzione e breve durata espressione

Virus = costoso, espressione forte e duratura, rischio immunogeno ed integrativo

STORIA DELLA LOTTA AL DOPING

- Primo caso di morte (1960) e nascita commissione medica CIO
- Prima lista sostanze proibite e primi test (anni '70-'80)
- Nascita della WADA (1999)
- Prime regole antidoping (Atene 2004)

DOPING IN UN ATLETA

TESSUTI MODIFICABILI

MALATTIE IN STUDIO
CON TERAPIA GENICA

DOPING GENETICO
NELLO SPORT

Lungs
Cystic fibrosis
Oxygen delivery

Muscle
Muscular dystrophy
Muscle mass/Fibre type

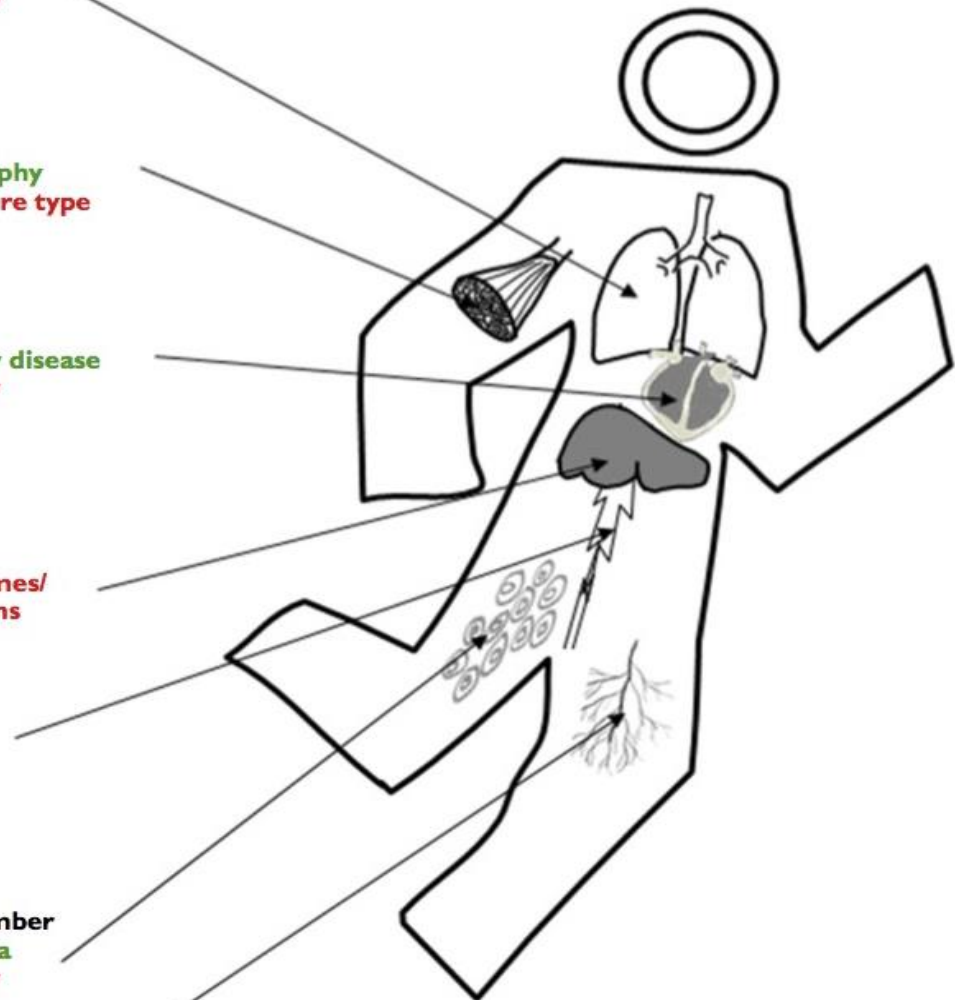
Heart
Coronary artery disease
Oxygen delivery

Liver
Haemophilia B
Glycolytic enzymes/
Secreted proteins

Spinal cord
Chronic pain
Exercise pain

Erythrocyte number
Chronic anaemia
Oxygen delivery

Vascularization
Ischaemic disease
Oxygen delivery

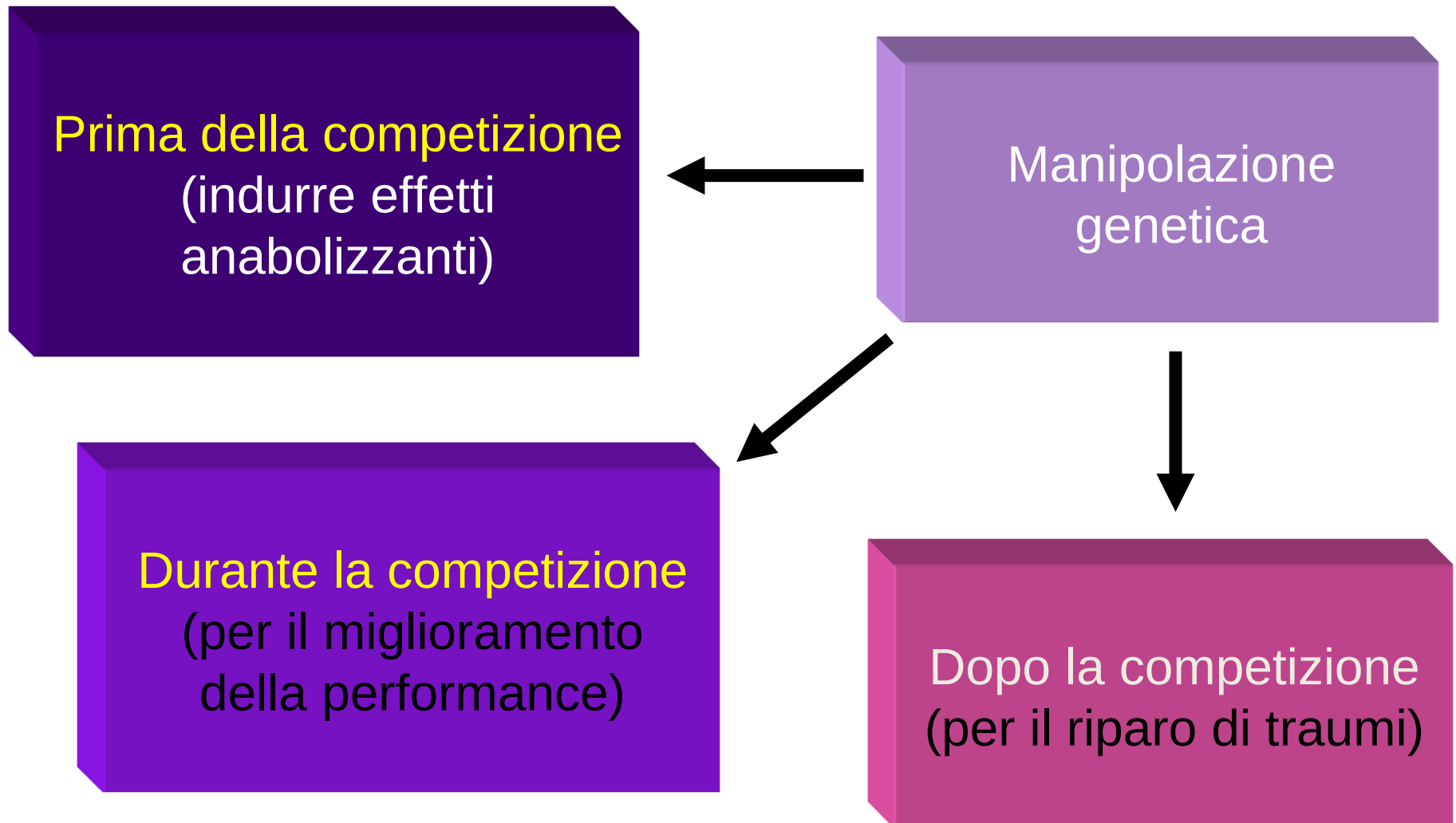


Perchè utilizzare il doping genetico

- Un' alternativa alla somministrazione di sostanze dopanti che l'organismo può produrre da solo
- Per cambiare la regolazione naturale dei geni
- Per il potenziamento di proteine all'interno dell'organismo

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**
- E' ottimamente vascolarizzato**
- E' 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)

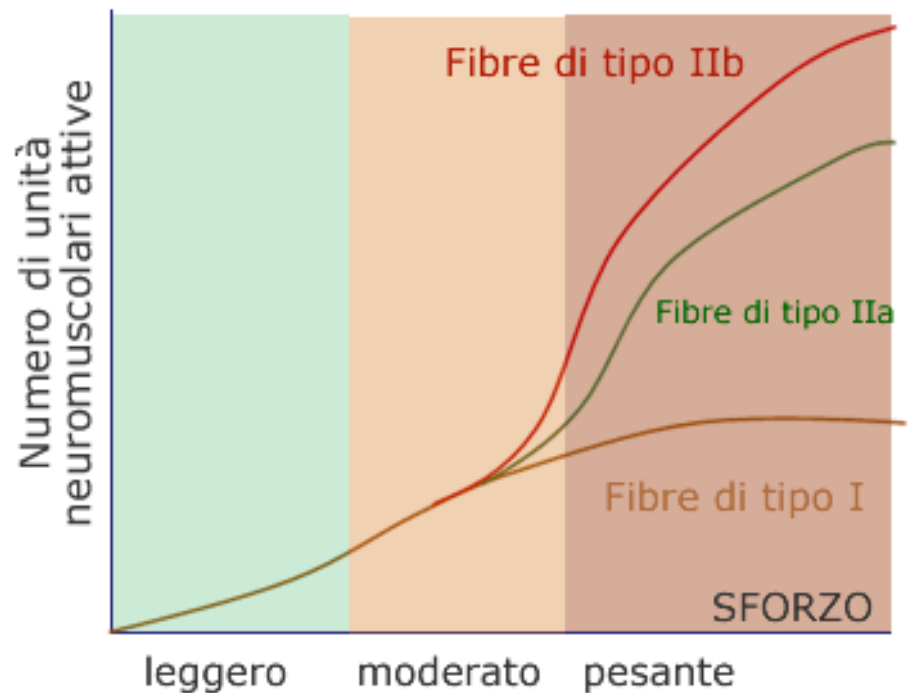
PROBLEMI:

- **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)

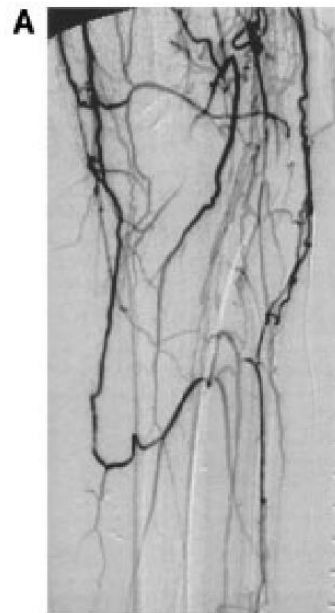
3. GENI CORRELATI ALL'ANGIOGENESI

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

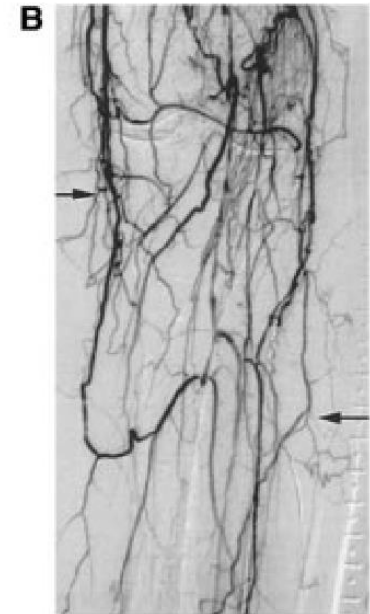
L' espressione di questi geni infatti è correlata all'aumento della formazione di nuovi vasi sanguigni e quindi ad un maggiore apporto di ossigeno ai tessuti con conseguente aumento della capacità di resistenza allo sforzo fisico.

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

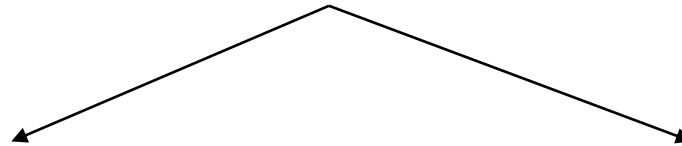


DOPO

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.

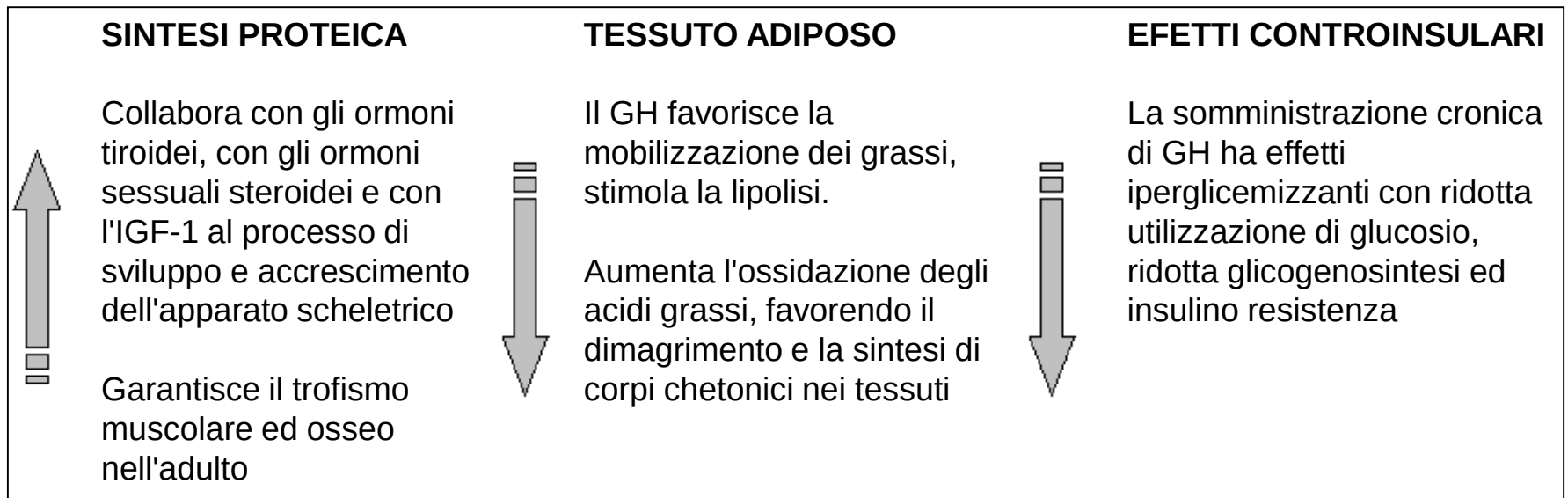
GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA MUSCOLARE e ALLA RIGENERAZIONE

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



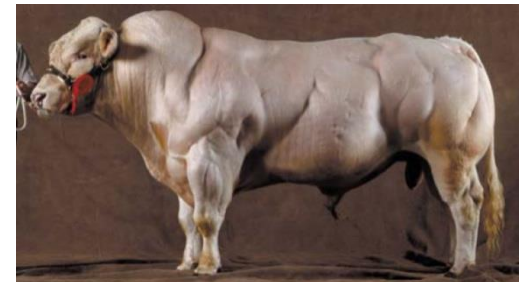
**GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA
MUSCOLARE e ALLA RIGENERAZIONE**

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*



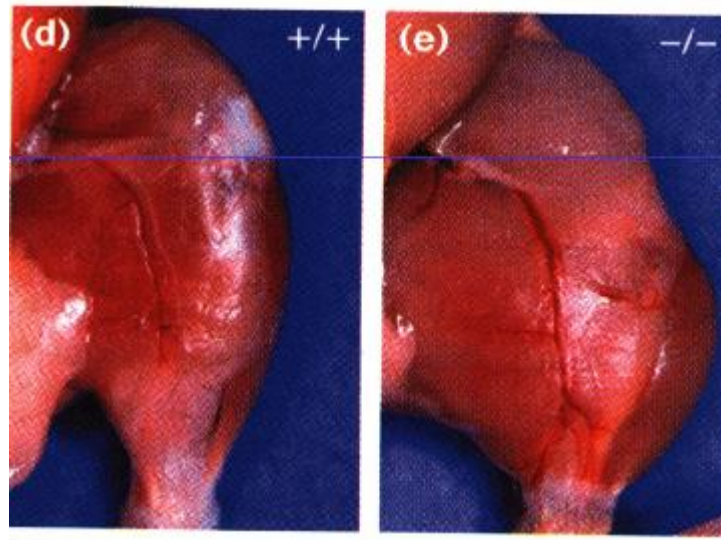
Approcci al doping genetico

- ➡ 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

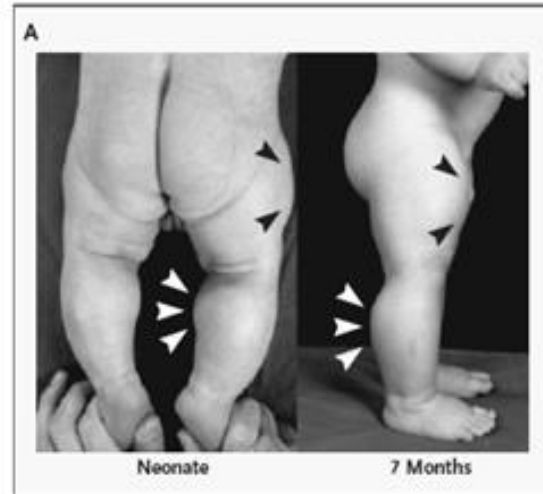
Topi privati del gene della miostatina (topi knock out) sviluppano una muscolatura ipertrofica:



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 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

RISCHI DELL'USO DI DOPING GENETICO IN PERSONE SANE

- 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

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.

SOSTANZE PROIBITE E REAZIONI AVVERSE

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

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

Sostanze Proibite sempre

1. Steroidi anabolizzanti androgeni (SAA)
2. Somatotropina o GH (ormone della crescita)
3. Corticotropina (ACTH)
4. Eritropoietina (EPO)
5. Beta 2 agonisti
6. Antagonisti e modulatori degli ormoni
7. Diuretici e altri agenti mascheranti



Sostanze Proibite sempre

1 - Steroidi anabolizzanti androgeni (SAA)

Sono derivati dal testosterone: nandrolone, ossandrolone, deidroepiandrosterone (DEHA).

Effetti ricercati:

- Aumentare la massa muscolare
- Stimolare l'aggressività
- Aumentare la resistenza allo sforzo



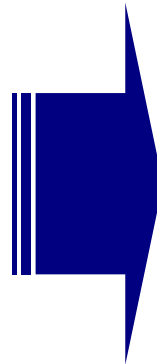
Effetti collaterali:

- Sterilità e virilizzazione nella donna
- Tumore del fegato
- Perdita elasticità muscolare e rotture tendinee
- Infarto del miocardio
- Turbe della libido e psichiatriche
- Precoce saldatura cartilagini d'accrescimento

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

Sostanze Proibite sempre

2 - Somatotropina o GH (Growth Hormone)



Effetti ricercati:

- Potenziamento degli effetti degli anabolizzanti
- Accrescimento in lunghezza delle ossa
- Trasporto di aminoacidi nei tessuti
- Aumento della massa muscolare

Effetti collaterali:

- Deformazioni ossee
- Gravi insufficienze cardiache
- Diabete e neoplasie
- Malattia di Creutzfeldt Jacob
- Disturbi tiroidei

2 - Somatotropina o GH (Growth Hormone)

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”.



Sostanze Proibite sempre

3 - Corticotropina (ACTH)

È un ormone prodotto dall'ipofisi che regola la produzione degli ormoni corticosteroidi (come cortisolo e aldosterone).

Effetti ricercati:

- Aumento transitorio del GH con conseguente effetto anabolizzante

Effetti collaterali:

- ipertensione
- aumento della glicemia
- può interferire con la fertilità

Sostanze Proibite sempre

4 - Eritropoietina (EPO)

Ormone prodotto dal rene e dal fegato che stimola la produzione di globuli rossi.

Dal 1983 viene sintetizzato in laboratorio.



Effetti ricercati:

- aumento del trasporto d'ossigeno
- aumento del massimo consumo d'ossigeno

Effetti collaterali:

- ipertensione arteriosa
- ictus cerebrali
- infarto del miocardio

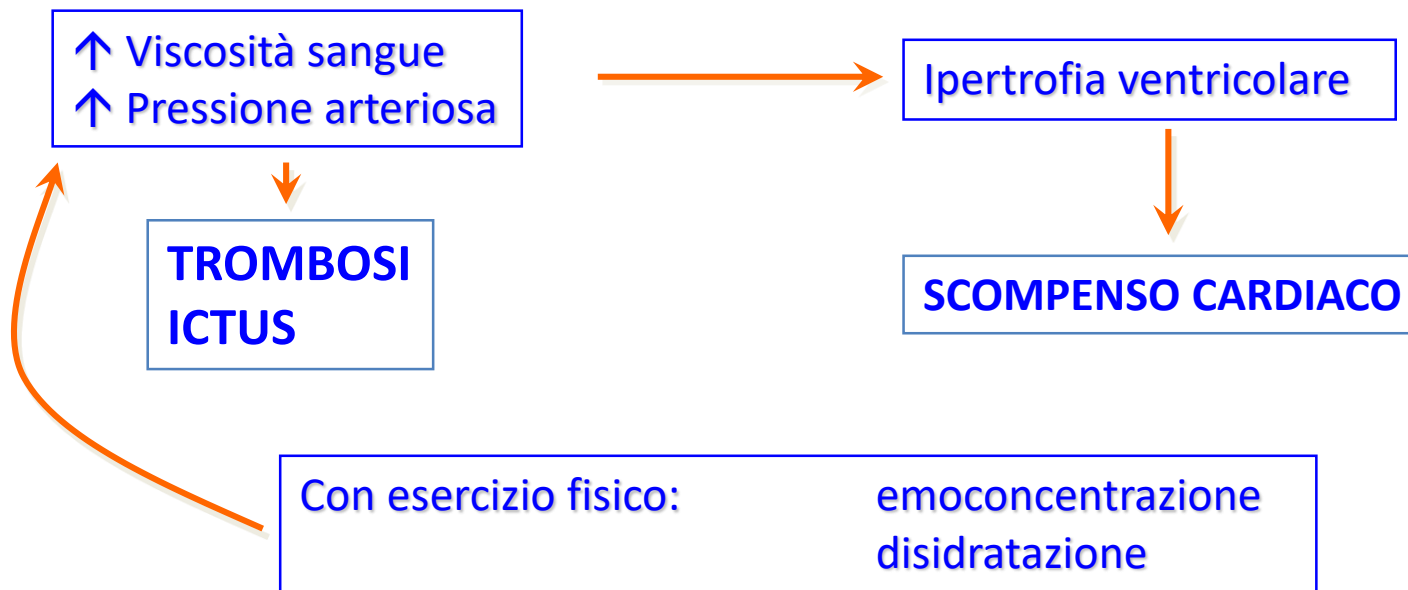
ERITROPOIETINA (hrEPO)

EFFETTI DOPANTI

- ↑ Produzione globuli rossi → ↑ capacità di trasporto di O₂ ai muscoli
- Migliora le prestazioni a base aerobica e migliora il recupero

EFFETTI COLLATERALI

Ematocrito troppo alto (> 50%)



A lungo termine: inibizione produzione EPO endogena, policitemia, leucemia acuta

Sostanze Proibite sempre

5 - Beta 2 agonisti (Salbuterolo, formoterolo...)

Sono farmaci broncodilatatori usati in caso d'asma

Effetti ricercati:

- Anabolizzante

Effetti collaterali:

- Tachicardia
- Insonnia
- Infarto cardiaco
- Ipotensione



Sostanze Proibite sempre

6 - Antagonisti e modulatori degli ormoni

Non hanno alcun effetto sulle prestazioni fisiche di un atleta, ma spesso vengono assunti per ridurre o sopprimere gli effetti collaterali causati dall'abuso di steroidi androgeni anabolizzanti. L'abuso di SAA può provocare ginecomastia nei soggetti maschi, per cui si tenta di attenuare questo effetto mediante l'uso di anti-estrogeni, riducendo la sintesi degli ormoni sessuali femminili.

Effetti ricercati:

- Riduzione o soppressione degli effetti collaterali dovuti all'uso di steroidi anabolizzanti

Effetti collaterali:

- Ampia gamma di squilibri ed effetti collaterali pericolosi

Sostanze Proibite sempre

7 - Diuretici e altri agenti mascheranti (Mannitolo, acetazolamide...)

Effetti ricercati:

- Perdita di peso
- Mascherare la presenza di altri prodotti

Effetti collaterali:

- Disidratazione
- Insufficienza renale
- Aritmie cardiache



Sostanze proibite in competizione

1. **Stimolanti**
2. **Narcotici e analgesici**
3. **Cannabinoidi**
4. **Glucocorticosteroidi**
5. **Alcol**
6. **Betabloccanti**



Sostanze proibite in competizione

1 – Stimolanti (anfetamine, cocaina, bambuterolo, efedrina...)

Sostanze ad azione simpatico mimetica: imitano l'azione dell'adrenalina.

Effetti ricercati:

- Favoriscono l'irrorazione sanguigna dei muscoli
- Stimolano concentrazione e competitività
- Riducono la percezione della fatica

Effetti collaterali:

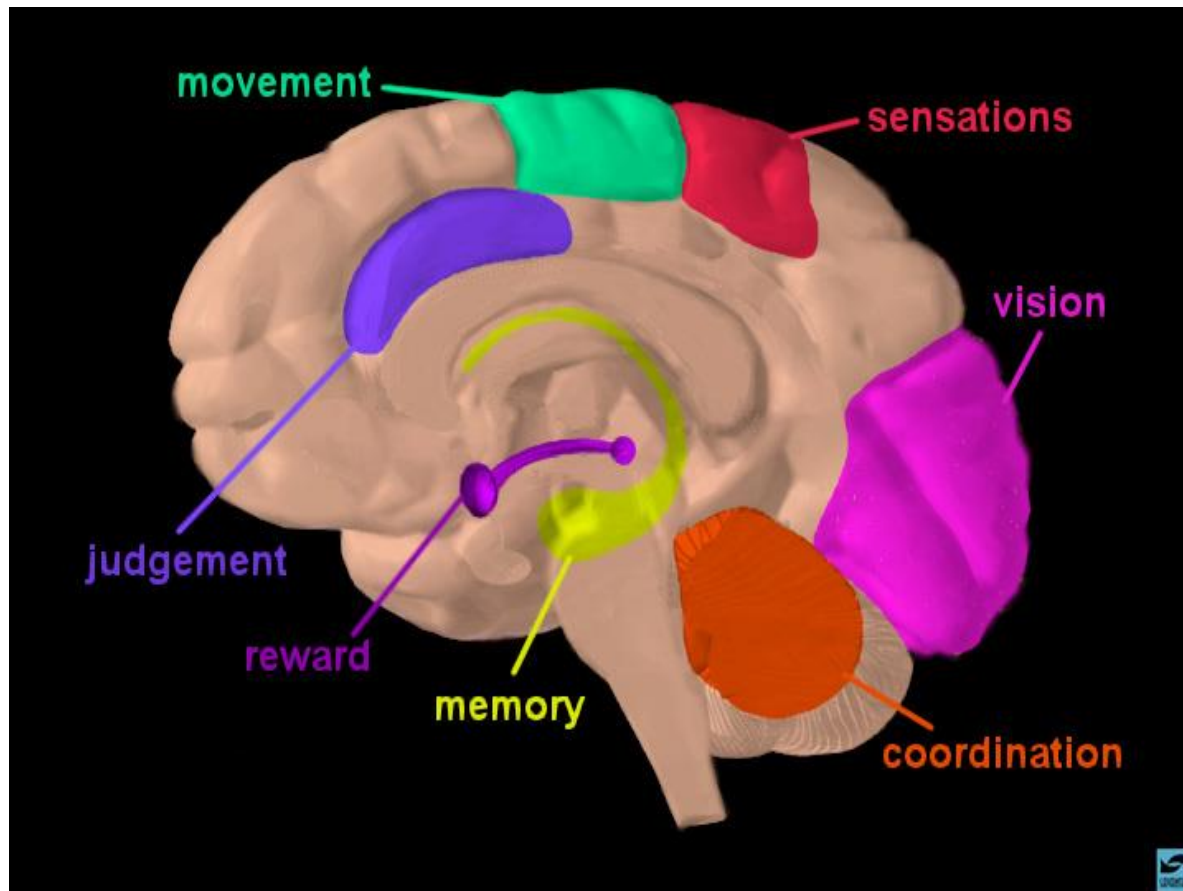
- Assuefazione e dipendenza
- Disturbi dell'umore e del sonno
- Inappetenza, anoressia, esaurimento psicofisico
- Problemi cardiovascolari



Sostanze proibite in competizione

1. Stimolanti

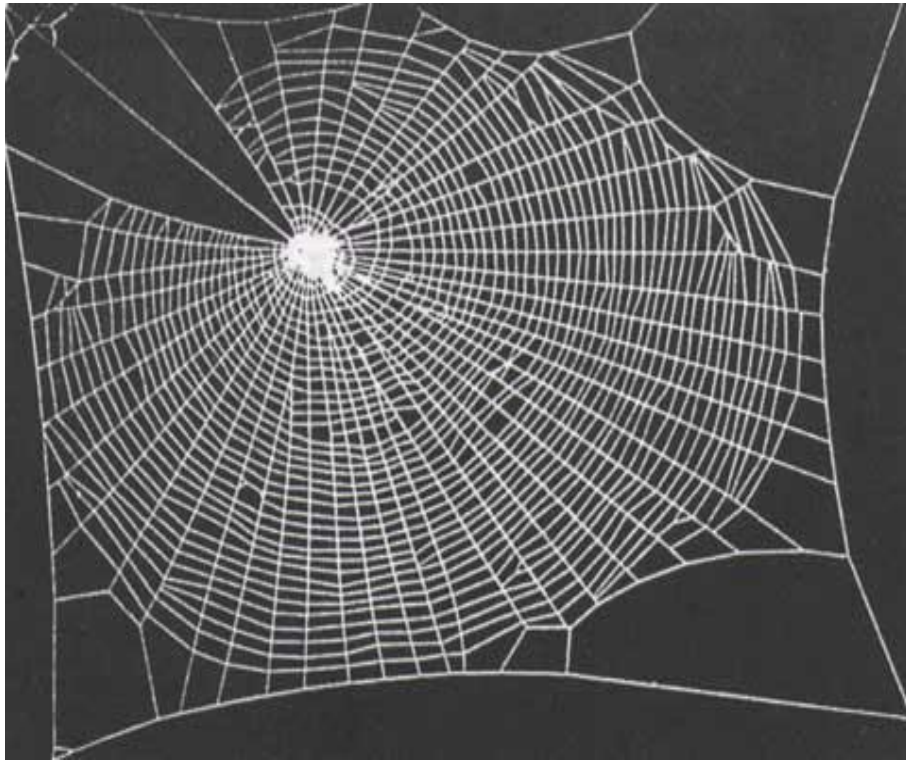
Gli stimolanti (es. cocaina, oppioidi, amfetamine, cannabinoidi) alterano le aree cerebrali che mediano le sensazioni di motivazione e di piacere: **area “reward”** cioè della gratificazione.



Sostanze proibite in competizione

1. STIMOLANTI

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



Condizioni basali



Dopo ecstasy

Sostanze proibite in competizione

2 – Narcotici e analgesici (morfina, eroina, metadone...)

Effetti ricercati:

- Azione calmante e rilassante sul SNC
- Eliminano sensazioni di dolore
- Temporaneo stato di euforia

Effetti collaterali:

- Assuefazione e dipendenza
- Diminuzione della capacità di concentrazione
- Sonnolenza
- Maggior rischio di traumi

Sostanze proibite in competizione

3 – I cannabinoidi (cannabis, marijuana, hashish...)

Non portano un vantaggio energetico, ma nel ridurre la tensione prima e durante la gara.

Effetti ricercati:

- Azione calmante e rilassante sul SNC
- Eliminano sensazioni di dolore
- Temporaneo stato di euforia

Effetti collaterali:

- Alterano la coordinazione motoria e cognitiva
- Provocano confusione mentale, psicosi, allucinazioni
- Assuefazione e dipendenza

Sostanze proibite in competizione

4 – I glucocorticosteroidi

farmaci anti-infiammatori e analgesici

Non portano un vantaggio energetico, ma nel ridurre la tensione prima e durante la gara.

Effetti ricercati:

- Azione stimolante sulla psiche
- Eliminano sensazioni di dolore
- Combattono la fatica

Effetti collaterali:

- Diabete, ulcere gastriche
- Disturbi cardiovascolari
- Ritenzione idrica
- Alterazioni psichiche

Sostanze proibite in competizione

5 – L'alcol

Il divieto assoluto vale per quelle discipline in cui è richiesta freddezza e concentrazione (arco, tiro).

Effetti ricercati:

- A piccole dosi rilassa e evita tremori delle mani

Effetti collaterali:

- Diminuisce l'equilibrio
- Aumenta il tempo di reazione
- Riduce la coordinazione
- Riduce la velocità di percezione visiva e di messa a fuoco.

Sostanze proibite in competizione

6 – I betabloccanti

Effetti ricercati:

- Rallentamento del battiti cardiaco
- Riduzione degli stati ansiosi

Effetti collaterali:

- Il rallentamento del battito può portare all'arresto cardiaco



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

