

DOPING GENETICO NELLO SPORT

Vi possono essere tre livelli di doping genetico per il miglioramento della performance di un'atleta:

1. **PRIMA DELLA COMPETIZIONE:** l'utilizzo di doping genetico finalizzato a indurre effetti anabolizzanti nell'atleta.
2. **DURANTE LA COMPETIZIONE:** l'utilizzo di un doping genetico finalizzato per il miglioramento della performance durante la gara.
3. **DOPO LA COMPETIZIONE:** l'utilizzo di doping genetico mirato alla cura e al riparo dei traumi in modo da mantenere l'atleta sempre al massimo livello e rendimento.

Il materiale genetico può essere introdotto in vivo o ex vivo. La strategia in vivo prevede l'erogazione diretta del gene attraverso un vettore nel tessuto bersaglio/organo o per via sistemica. Possiamo distinguere il doping genetico:

IN VIVO LOCALE: il materiale genetico viene rilasciato localmente nel sito di azione mediante iniezione intramuscolare o intrarticolare. Per esempio: fattori di crescita, fattori modificatori di fibre muscolari, cardio-modulatori, sostanze antidolorifiche, inibitori dell'infiammazione o fattori di riparazione articolare e muscolare.

IN VIVO SISTEMICO: il materiale genetico viene somministrato per via sistemica endovenosa nel corpo dell'atleta come ad esempio anabolizzanti, fattori ormonali o sostanze antidolorifiche.

EX VIVO: la strategia di trasferimento di DNA prevede l'isolamento di cellule dal corpo del paziente/atleta, la loro manipolazione genetica in laboratorio, la selezione e la reintroduzione nel corpo del paziente/ atleta.

I BERSAGLI DEL DOPING GENETICO

Le capacità di un atleta di eseguire specifici sforzi fisici sono determinati dai meccanismi adattativi del sistema circolatorio e respiratorio, muscoli scheletrici e altri organi. L'efficacia di questi meccanismi è geneticamente determinata. La presenza di varianti geniche specifiche decide sulla forza di tali caratteristiche fisiche come la velocità e la resistenza, la forza muscolare e il controllo dell'emozione. I geni esogeni con più alta probabilità di essere utilizzati per il doping genetico (vedi tabella sotto) includono: eritropoietina (EPO), ormone della crescita (GH), fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF - A e VEGF - D), insulino- like growth factor 1 (IGF - 1) e gli antagonisti della miostatina , come la follistatina (FST).

Il trasferimento genico come metodo per rafforzare le caratteristiche fisiche e fisiologiche desiderate o migliorare il naturale fenotipo di un atleta è un modo per raggiungere il successo

nello sport per molti atleti. Per questo motivo, le indagini intensive sul potenziale uso di doping genetico in molti sport sono oggi sempre più numerose. La tabella seguente mostra i geni che potrebbero essere potenziali obiettivi di doping nello sport e indica il potenziale rischio per la salute degli atleti in caso di una possibile applicazione di questo tipo di doping .

POTENZIALI GENI PER DOPING GENETICO

Potential genes	Target tissue/system	Risks to health	1. Physiological function 2. Expected phenotypic performance
<i>EPO</i> Locus: 7q22	Blood system	– Increased blood viscosity, – Difficult laminar blood flow through the vessels, – Severe immune response	1. Increased number of red blood cells and increased blood oxygenation 2. Increased endurance
<i>IGF1/ GH</i> Locus: 12q23.2/ 17q22–q24	Endocrine and muscle system	– Intracranial hypertension, – Abnormal vision, – Headache, nausea, vomiting, – Peripheral oedema, – Carpal tunnel syndrome, – Pain in the joints and muscles, – Overgrowth of the cartilage of the nose and jaw, – Cardiomyopathy, – Insulin resistance and diabetes, – Neoplastic disease	1. Excessive growth of bones and tissue mass, muscle hypertrophy and hyperplasia, and stimulation by muscle regeneration (IGF1), – stimulation of glycogenolysis and increased release of glucose from liver, increased lipolysis and reduced lipogenesis, increased protein synthesis (GH) 2. Increased endurance, efficiency, increased muscle mass and strength (IGF1, GH)
<i>HIF-1</i> Locus: 14q23	Blood and immune system	– Increased blood viscosity, – Hypertension – Neoplastic disease	1. Increased number of red blood cells and increased blood oxygenation (indirectly by affecting, among others, EPO gene or genes encoding glycolytic enzymes) 2. Increased muscle strength and endurance
<i>PPARD</i> Locus: 6p21.2	Muscular system	– Overexpression of sex hormones, – Colon cancer	1. Acceleration of skeletal muscle cell metabolism, increased insulin sensitivity, increased lipolysis 2. Increased endurance and speed. Probably involved in the control of body weight
<i>MSTN</i> Locus: 2q32.2	Muscular system	– Damage of the ligaments, tendons and bones	1. Hypertrophy and hyperplasia of muscle mass 2. Increased muscle mass and strength
<i>ACTN2</i> and <i>ACTN3</i> Locus: 1q42–q43 / 11q13.1	Muscular system (actin filaments within the myofibrils of the striated muscle, fast-twitch fibres ACTN3 (type II fibres).	– No data on the negative effects of gene doping using ACTN2 and ACTN3	1. Increased rate of glucose metabolism in response to training (ACTN3), – Compensation for loss of function of ACTN3 gene by ACTN2 gene 2. Increased endurance, muscle strength and speed of muscle; increased efficiency in sprinters
<i>VEGFA</i> Locus: 6p12	Vascular endothelium	– Neoplastic disease, – Immune response	1. Induction of new blood vessel formation (angiogenesis) 2. Increased endurance
<i>POMC/</i> <i>PENK</i> precursors Endorphin/ enkephalins Locus: 2p23.3/ 8q23–q24	Central nervous system	– Increased risk of overloading the musculoskeletal system and cardiovascular system, – Stress and increased cardiac workload, – Sudden death	1. Modulation of pain perception threshold 2. Increased endurance
<i>ACE</i> Locus: 17q23.3	Skeletal muscle	– Angioedema	1. Adjusting blood pressure by acting on angiotensin II (increase in blood pressure), and participation in the inactivation of bradykinin (decrease in blood pressure), increasing the proportion of slow-twitch muscle fibres (type I) 2. Increased endurance and/or sprint efficiency
<i>PCK1</i> Locus: 20q13.31	Skeletal muscle	No data on the negative effects of gene doping using PCK1 in athletes	1. Adjusting the metabolic processes including gluconeogenesis, involved in the Krebs cycle 2. Increased muscle endurance

1. GENI CORRELATI ALLA RESISTENZA

I geni che migliorano il trasporto di ossigeno sono strettamente correlati alla resistenza.

Le variabili che controllano il rilascio dell'ossigeno includono il numero di eritrociti nel sangue, il grado di vascolarizzazione dei tessuti e la velocità del flusso sanguigno. L'ossigeno viene consegnato a tutti i tessuti del corpo attraverso la respirazione e quindi il miglioramento della funzione polmonare è un potenziale bersaglio del doping genetico.

ERITROPOIETINA

L'eritropoietina (EPO) è una glicoproteina prodotta prevalentemente dal rene, che agisce sulle cellule progenitrici eritroidi del midollo osseo e permette di regolare la produzione di globuli rossi da parte del processo di eritropoiesi che aumenta l'emoglobina e l'ematocrito e quindi l'apporto di ossigeno. Questo tipo di consegna sistemica di una proteina può potenzialmente essere ottenuto mediante terapia genica. La consegna genetica di EPO è stata dimostrata in diversi studi sperimentali e utilizzando una varietà di vettori inclusa l'iniezione intramuscolare di EPO associato ad *Adenovirus* (AAV).

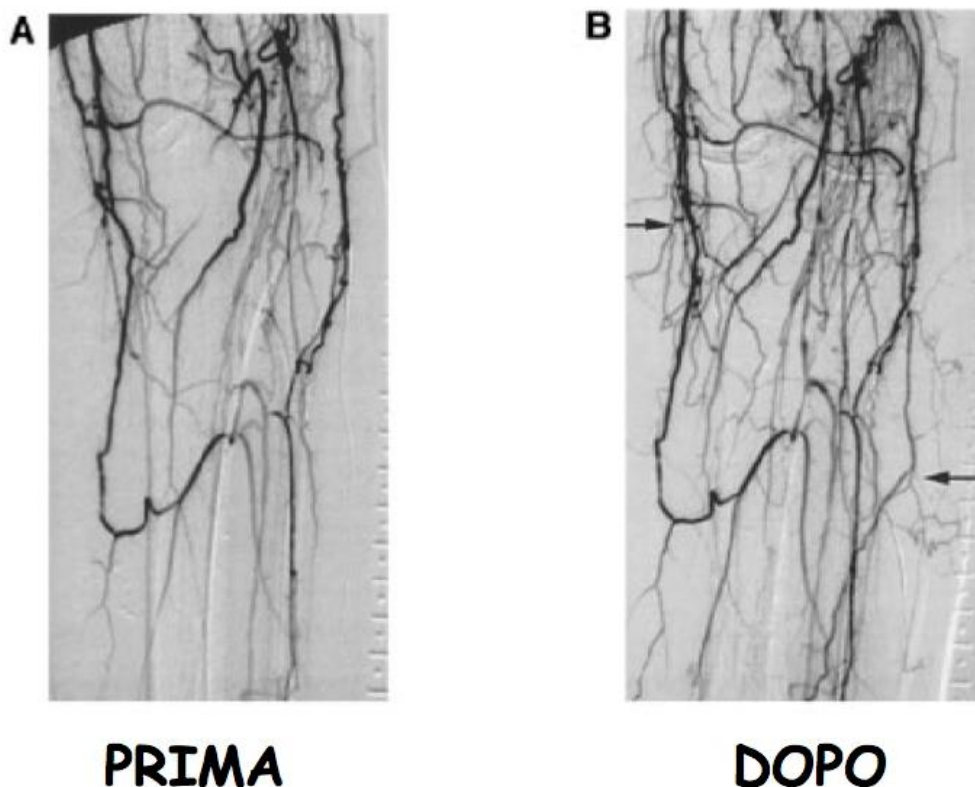
L'effetto atteso dell'espressione fisiologica del gene EPO sarebbe un'aumentata resistenza. Per il doping genetico, una copia aggiuntiva del gene EPO può essere introdotto nel corpo dell'atleta utilizzando un vettore virale determinando sovra-espressione di EPO, aumentando la produzione di globuli rossi nel fegato e reni, e aumentando così la capacità del sangue di legare l'ossigeno. Gli effetti collaterali pericolosi legati al trasferimento di EPO sono principalmente: un aumento dell'ematocrito , che può aumentare la probabilità di ictus , infarto miocardico , trombosi e un aumento totale delle resistenze vascolari periferiche.

Nel 2002 , l'azienda farmaceutica britannica Oxford BioMedica ha sviluppato Repoxygen come potenziale farmaco per il trattamento della anemia associata a chemioterapia utilizzata nel cancro del rene. Il farmaco viene somministrato per via intramuscolare, e consiste di un vettore virale per il trasferimento del gene EPO umano modificato sotto il controllo di geni che codificano le proteine dell'omeostasi dell'ossigeno (come HIF - 1 e HIF - 2). Il transgene EPO è espresso in risposta a bassi livelli di ossigeno e viene spento quando la concentrazione di ossigeno raggiunge il valore corretto. Nel 2006, il Repoxygen ha attirato l'attenzione del mondo dello sport, quando in Germania ha cominciato ad essere somministrato ai giovani runner per mantenere un'espressione costante di EPO nelle cellule muscolari. Il Repoxygen è vietato dalla WADA dal 2009 inserendolo nella lista delle sostanze proibite.

FATTORE DI CRESCITA VASCOLARE ENDOTELIALE VEGF

Poiché la terapia genica può anche essere usata per avere effetti locali, è possibile utilizzare la terapia genica per produrre proteine in siti specifici, cioè limitatamente a una zona del corpo, e i cui effetti sono limitati al sito di iniezione. Per esempio, è possibile l'induzione della crescita di nuovi vasi sanguigni attraverso il processo di angiogenesi. L'aumento della vascolarizzazione di un tessuto aumenterà l'apporto di ossigeno che potrebbe essere significativo in molti contesti clinici come la malattia vascolare periferica (PVD), malattia coronarica (CAD) o la guarigione di ferite . Si registrano progressi nello sviluppo della terapia genica per l'induzione della angiogenesi per il trattamento di CAD e PVD. Diversi studi clinici hanno esaminato l'espressione di fattori angiogenici, come il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) utilizzando vettori come plasmidi a DNA e adenovirus.

L'immagine sottostante mostra i vasi sanguigni di un paziente che ha ricevuto l'inoculazione di un vettore in cui è stato inserito il gene VEGF.



FATTORE INDUCIBILE HIF-1

Il gene HIF-1 codifica per proteine coinvolte nel processo di ipossia, nell'attivazione e nell'angiogenesi, nella eritropoiesi o nella regolazione del metabolismo del glucosio.

HIF-1 regola l'omeostasi dell'ossigeno, facilitando l'adattamento delle cellule a condizioni di scarsità di ossigeno. Inoltre, HIF-1 interviene anche nell'eritropoiesi, nel metabolismo del ferro, nella regolazione del pH, nell'apoptosi, nella proliferazione cellulare e nelle interazioni intracellulari. Pertanto, la terapia genica usando il gene o la proteina HIF-1 può causare cambiamenti fisiologici a vari livelli nel corpo. Sulla base di studi su modelli animali e alcuni studi clinici sugli esseri umani, si ritiene che la somministrazione di HIF-1 mediante terapia genica produca vascolarizzazione dei tessuti ischemici.

Il doping genetico associato alla stimolazione di HIF-1, utilizzando agenti chimici o di trasferimento di geni nelle cellule, potrebbe migliorare la resistenza di un atleta.

Tuttavia, poiché HIF-1 è coinvolto nel metabolismo dell'ossigeno mitocondriale, numerosi sono i cambiamenti molecolari anche dei geni associati all'adattamento metabolico delle cellule (ad esempio, GLUT1, GLUT3, GPI, ENO1), all'angiogenesi, all'apoptosi e anche alla carcinogenesi (ad esempio, VEGFA, IGF-1, IGF-2, TGF β , ANG1, MMP, ADM). Le conseguenze potrebbero essere cambiamenti molecolari nelle cellule che potrebbero causare infarto miocardico, ictus o cancro.

RECETTORE ATTIVANTE LA PROLIFERAZIONE DEI PEROSSISOMI (PPAR)

La famiglia di PPARs consiste dei seguenti geni:

- PPARA (α), - cromosoma 22q12-13.1 (OMIM 170998). La sua espressione è prevalente in fegato, rene, cuore, muscoli e tessuto adiposo.
- PPAR (β/δ) - cromosoma 6p21.2-21.1 (OMIM 600409). La sua espressione è prevalente in cervello, tessuto adiposo, ma anche in altri tessuti.
- PPARd (γ) - cromosoma 3p25 (OMIM 601487). Tramite splicing alternativo si esprime in tre forme: γ 1 - espressa in quasi tutti i tessuti, compreso il cuore, muscolo, colon, rene, pancreas, milza; γ 2 - espressa soprattutto nel tessuto adiposo; γ 3 - espressa in macrofagi, intestino crasso, tessuto adiposo bianco.
- La sua espressione è prevalente in pelle (gamma)

Alcuni esperimenti hanno dimostrato che l'attivazione di PPAR δ riduce il guadagno di peso, aumenta il muscolo scheletrico, il tasso metabolico e la resistenza, e migliora la sensibilità

all'insulina. Inoltre, è stato dimostrato che l'aumento dell'espressione di PPAR δ sopprime l'infiammazione aterogenica ed è associato alla formazione di nuove fibre muscolari scheletriche di tipo I (fibre a contrazione lenta) e la loro trasformazione dalle fibre di tipo II (fibre a contrazione rapida), che determinano la resistenza e la velocità dell'atleta.

Inoltre, il PPAR δ gioca un ruolo importante nella differenziazione e maturazione degli adipociti, controlla l'equilibrio energetico del corpo, quindi ha un ruolo importante nel controllo del peso corporeo.

GW501516 (noto anche come GW-501.516, GW1516, GSK-516 e Endurobol) è un agonista del recettore PPAR δ che è stato scoperto durante una collaborazione di ricerca tra GlaxoSmithKline e Ligand Pharmaceuticals all'inizio del 1992. Questo farmaco era stato studiato come potenziale trattamento per l'obesità, diabete, dislipidemia e malattie cardiovascolari, ma il composto aumentava significativamente la probabilità di sviluppare il cancro pertanto sviluppo del farmaco è stato successivamente fermato.

Gli studi su topi avevano dimostrato che la somministrazione di GW1516 per un periodo di cinque settimane aumentava la tolleranza all'esercizio del 60-70 %, rispetto ai topi del gruppo di controllo.

Il sospetto che GW501516 potesse essere utilizzato dagli atleti per migliorare le loro prestazioni ha portato l'Agenzia mondiale antidoping (WADA) a lavorare su un test per la rilevazione di GW501516 e altre molecole correlate che sono state incluse nella lista di divieto WADA dal 2009.

2. GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA MUSCOLARE:

FATTORE DI CRESCITA INSULINICO IGF-1

Una potenziale forma di doping genetico può avvenire utilizzando il trasferimento genico di IGF1 il quale potrebbe fornire livelli stabili e alti di proteine. Il fegato è l'organo che secerne più fattore di crescita insulino-like-1 (IGF - 1) che è stimolato dall'ormone della crescita. Esso ha diversi effetti sui tessuti scheletrici compresi ipertrofia del muscolo scheletrico e atrofia muscolare ed è anche protettivo per le cellule della cartilagine.

Il gene IGF-1 ha il potenziale per aumentare la massa muscolare e la forza ed 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

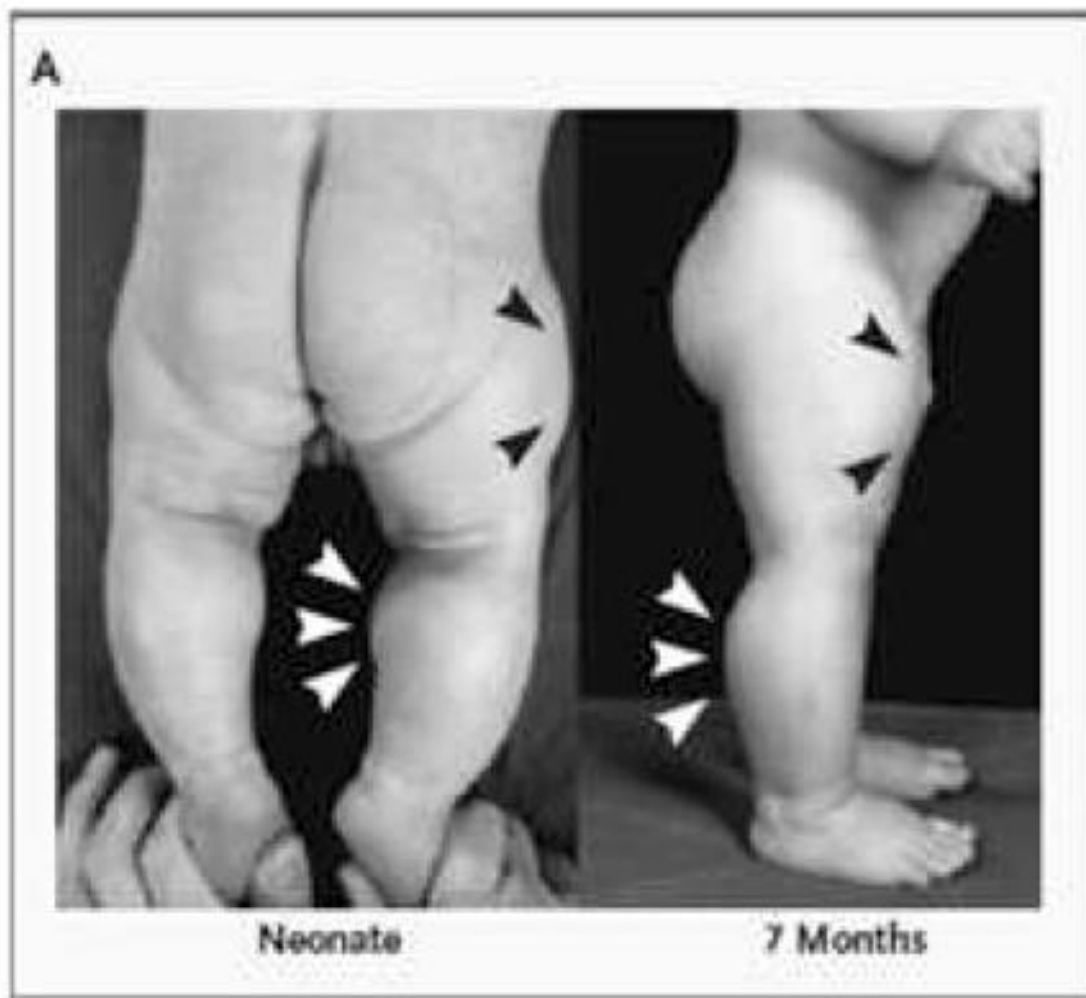
aggirare il meccanismo di equilibrio, inducendo l'ipertrofia del muscolo e la crescita incontrollata delle fibre.

È stato dimostrato che la sovraespressione di IGF1 e del suo prodotto proteico induce una maggiore ipertrofia muscolare e anche rigenerazione del muscolo scheletrico. L'espressione di IGF1 sembra associata a un aumento della massa muscolare e del peso, aumentando così la forza muscolare. In questo studio è stato riscontrato un aumento delle dimensioni del muscolo in ratti allenati e un ulteriore aumento della massa muscolare è stata osservata anche quando i ratti erano addestrati alla resistenza (scala di risalita). Tuttavia, la sovraespressione di IGF1 può portare ad una profonda ipoglicemia, simile alla somministrazione di insulina.

MIOSTATINA

La *miostatina* è una proteina prodotta dalle cellule muscolari in via di sviluppo e durante la vita adulta, che agisce come **regolatore negativo** della crescita muscolare. Pertanto, se opportunamente inibita, essa permette l'aumento della massa muscolare. Appartiene alla superfamiglia dei TGF-beta ed è responsabile del differenziamento dei muscoli scheletrici. Nel 2004 venne identificata per la prima volta nell'uomo la presenza di una mutazione nel gene che codifica per la miostatina. Mutazioni genetiche provocano abnormi crescite dei muscoli. In un caso recente di un ragazzo con miostatina inattiva è stato riscontrato uno sviluppo abnorme della forza e della massa muscolare, e a 4-5 anni è stato in grado di tenere due manubri di 3 kg in

sospensione orizzontale con le braccia tese.



La miostatina si lega ai recettori di tipo attivina II (Act RII), particolarmente Act RIIb, e questa interazione può essere inibita dalla follistatina. L'inibizione del recettore per la miostatina (ActRIIb) o l'aumento dell'espressione dell'inibitore della miostatina, la Follistatina, possono indurre ipertrofia muscolare. Due strade possono essere utilizzate dal doping genetico: a) modificare il gene che codifica la miostatina o b) somministrare l'inibitore della miostatina, la follistatina.

E' stato dimostrato che quando la follistatina è indotta ad esprimersi con un vettore AAV1 nel quadricipite di primati (scimmie) si ottiene un aumento delle dimensioni del muscolo del 15 %, mentre la forza, misurata in contrazione, aumenta del 26,3 %. Questi cambiamenti persistevano per sei mesi dal periodo di sperimentazione.

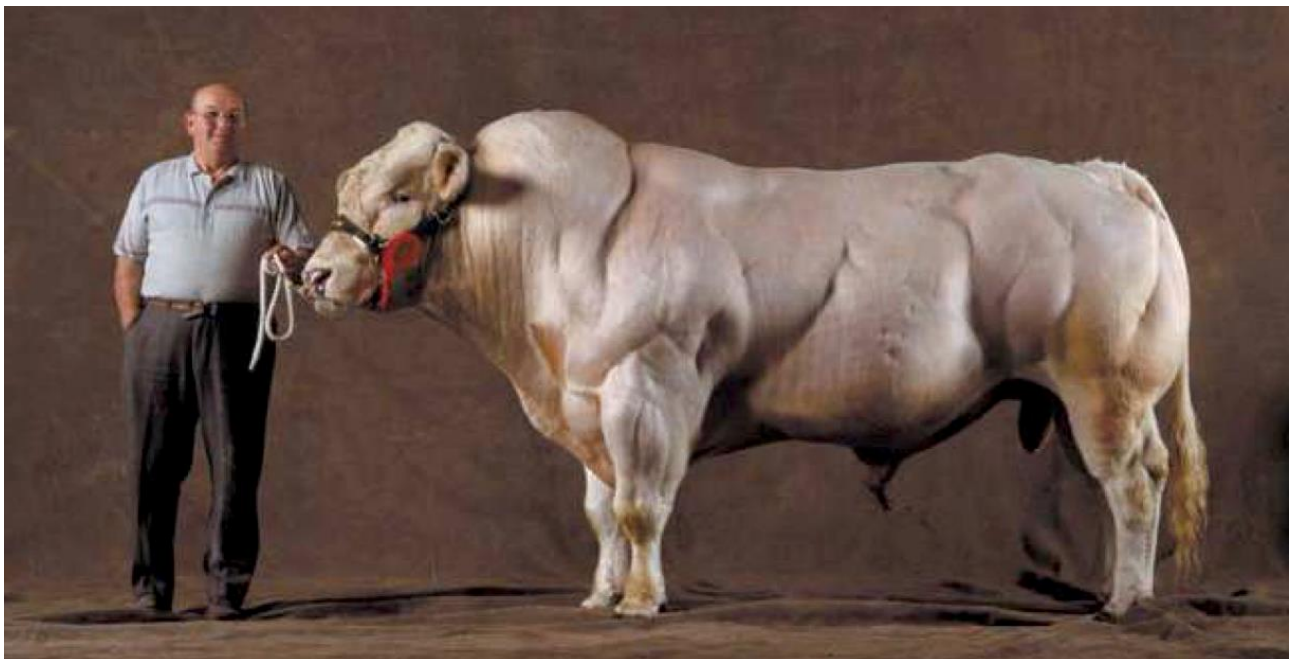
In alcune condizioni patologiche, l'aumento della massa muscolare in un breve periodo di tempo può promuovere cardiomiopatia ipertonica, successivamente causando un attacco cardiaco. La

crescita eccessiva della massa muscolare porta anche al sovraccarico del sistema muscolo-scheletrico, aumentando la suscettibilità alle lesioni ossee e tendinee.

In figura sono mostrati topi privati del gene della miostatina (topi knock out)



Sotto è mostrata la mutazione bovina riguardante il gene della miostatina



GENI DI RESISTENZA E GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA MUSCOLARE

GENE	VARIANT
ENDURANCE ABILITY	
ACE/ <i>angiotensin-converting enzyme</i>	ins/del
ADRB2/ <i>β-2 adrenergic receptor</i>	46A/G (Arg16Gly) 79C/G (Gln27Glu)
BDKBR2/ <i>bradykinin type 2 receptor BE1</i>	-9/+9 bp
CHRM2/ <i>cholinergic receptor muscarinic 2</i>	616A/G
EpoR/ <i>erythropoietin receptor</i>	6002G/A (Try439Stop)
HBB/ <i>haemoglobin beta</i>	16C/G 551C/T
HIF-1α/ <i>hypoxia-inducible factor 1</i>	1744C/T (Pro582Ser)
GYS1/ <i>glycogen synthase 1</i>	XbaI restriction Met416Val
NOS3/ <i>nitric oxide synthase</i>	894G/T
NRF2/ <i>nuclear respiratory factor 2</i>	A/G in intron 3
PPARδ/ <i>peroxisome proliferator-activated receptor δ</i>	294A/G
VEGF/ <i>vascular endothelial growth factor</i>	2578A/C 1154G/A 634G/C
MUSCLE PERFORMANCE AND POWER EXERCISE	
ACE/ <i>angiotensin-converting enzyme</i>	ins/del
ACTN3/α-actinin 3	1747C/T (R577X)
AMPD1/ <i>adenosine monophosphate deaminase</i>	G34A/A
CK-MM/ <i>muscle creatine kinase</i>	NcoI restriction 214A/G
IGF-1/ <i>insulin like growth factor 1</i>	CA dinucleotide repeats
SUSCEPTIBILITY TO INJURIES	
COL1A1/ <i>collagen type 1α1</i>	2046G/T
COL5A1/ <i>collagen type 5α1</i>	401C/T
MMP3/ <i>matrix metalloproteinase 3</i>	301A/G
TNC/ <i>tenascin C</i>	GT dinucleotide repeats
PSYCHOLOGICAL APTITUDE	
5HTT/ <i>serotonin transporter 5</i>	-44/+44bp
BDNF/ <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	196G/A
5HTT/ <i>serotonin transporter 5</i>	-44/+44bp

RISCHI ED EFFETTI COLLATERALI

Lo sviluppo della terapia genica è ancora in studio. Ci sono state importanti riflessioni e anche battute d'arresto lungo dovute in genere al tipo di vettore utilizzato per trasportare il gene terapeutico. La pre-immunogenicità esistente nei pazienti è causata da un'esposizione di forme infettive del virus prima della somministrazione e questo può essere un problema fondamentale che limita l'efficacia del trasferimento genico e i risultati delle cellule trasdotte. Alte dosi di adenovirus hanno causato una risposta infiammatoria massiccia con una 'rivolta immunitaria' in cui il sistema immunitario ha mirato organi vitali e portato alla morte del paziente.

I rischi associati con il doping genetico sono sostanziali.

Attualmente, la terapia genica viene somministrata ai pazienti in ambienti ben controllati e i vettori utilizzati per il trasferimento genico sono prodotti in laboratori certificati dove vengono ampiamente testati. Se la terapia genica fosse usata per migliorare le prestazioni atletiche, è molto probabile che questi ambienti (controllati) non esistano, cosicché maggiori sarebbero i rischi.

Utilizzare farmaci o geni per migliorare la performance, presenta sempre un rischio, in quanto essi vengono studiati per curare le persone malate e non per aumentare le prestazioni di quelle sane come gli atleti.