

METODI PROIBITI WADA

M3. DOPING GENETICO

Sono proibiti i seguenti metodi, che hanno la potenziale capacità di migliorare la performance atletica:

- 1. Il trasferimento di polimeri di acidi nucleici o di analoghi di acidi nucleici
- 2. L'utilizzo di cellule normali o geneticamente modificate.

Il Doping Genetico è stato definito, per la prima volta nel 2003. Ad oggi il doping genetico è:

“L'uso non terapeutico di cellule, geni ed elementi genetici o della modulazione dell'espressione genetica, con capacità di aumentare le prestazioni atletiche”

Terapia genica

La terapia genica può essere definita come il trasferimento di materiale genetico di cellule umane per il trattamento o la prevenzione di una malattia o disturbi.

Il suo principio si basa sulla fornitura di una cellula, di un gene terapeutico che può compensare un gene assente o anomalo

Tipologie di Terapia Genica.

Esistono due tipologie di terapia genica: quella delle cellule germinali e quella delle cellule somatiche.

- La prima si propone di **transfettare** le cellule della linea germinale come **spermatozoi** ed **ovociti** o le **cellule staminali totipotenti** dei primissimi stadi dello sviluppo dell'embrione (allo stadio di 4-8 cellule), ma attualmente essa non viene messa in pratica sia per ragioni tecniche ma soprattutto per i grandissimi dilemmi etici cui si può andare incontro.
- La seconda tipologia, invece, si propone di modificare solamente le cellule somatiche, senza intaccare, quindi, la linea germinale ed attualmente è la via più studiata e sperimentata.

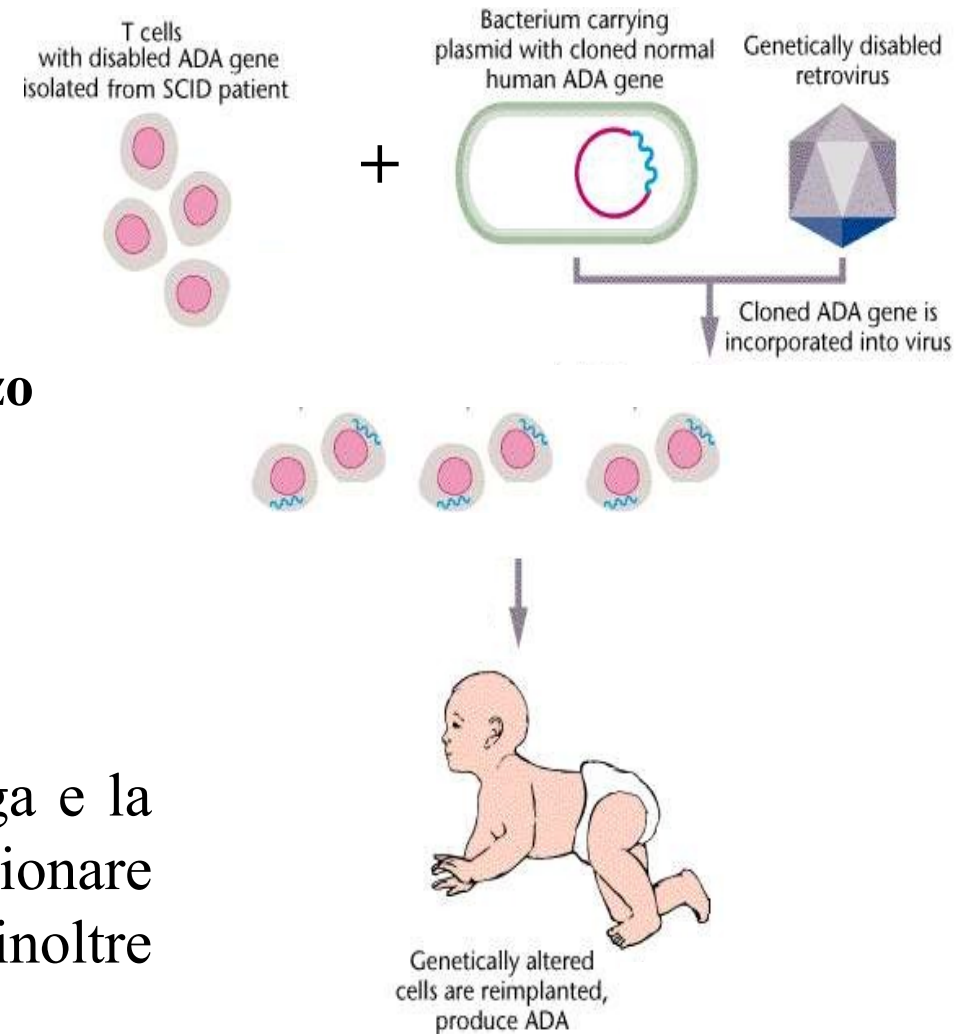
La terapia genica delle cellule somatiche, a sua volta, viene suddivisa in due gruppi:

- La terapia genica ***ex vivo***.
- La terapia genica ***in vivo***.

La terapia genica *ex vivo*

1. **Prelievo cellule somatiche dal soggetto (paziente)**
2. **Coltivazione in vitro delle cellule**
3. **Trasfezione su di esse del materiale genetico ingegnerizzato mediante l'uso di un apposito vettore (spesso virale)**
4. **Reinfusione o reimpianto nell'organismo del soggetto**

Tale procedura è sicuramente la più lunga e la più costosa delle due ma permette di selezionare ed amplificare le cellule d'interesse ed inoltre gode d'una maggior efficienza.



È attualmente la modalità più utilizzata ma è riservata solamente a quei casi in cui sia possibile prelevare, mettere le cellule in coltura e reinserirle nell'organismo.

La terapia genica *in vivo*

Viene attuata in tutti quei casi in cui le cellule non possono essere prelevate, messe in coltura e/o reimpiantate (cervello, cuore ed organi interni)

In questi casi il gene (o il materiale genetico) viene introdotto nell'organismo mediante un opportuno vettore per via locale o sistemica

I vettori utilizzati possono essere derivati da particelle virali inattivate o da nanoparticelle biosintetiche di tipo lipidico (liposomi) o polimerico (policationi) nonché combinazioni degli stessi (sistemi sopramacromolecolari)

Vettori virali

Sfruttano le caratteristiche dei virus di penetrare nelle cellule e di inserirsi nel DNA dell'ospite.

Non tutti i virus a DNA si sono dimostrati adatti (spesso il materiale genetico da essi trasportato non si integra nei cromosomi delle cellule bersaglio)

La maggior parte dei virus ad RNA non è adatto al trasferimento dei geni (l'RNA non si integra nel DNA delle cellule umane e viene rapidamente degradato)

Fanno eccezione i retrovirus, in cui il loro genoma ad RNA viene prima retrotrascritto in DNA e successivamente integrato nel genoma della cellula infettata.

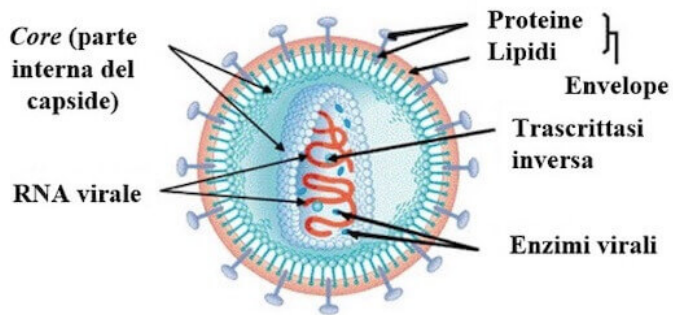
Il trasferimento virale

Prevede l'utilizzo di virus ricombinanti.

Rispetto ai sistemi di trasferimento non virali, quindi, hanno un'efficienza nettamente maggiore. I virus da impiegare, tuttavia, devono godere d'alcune caratteristiche:

- Le particelle virali ricombinanti devono essere difettive rispetto alla replicazione ovvero devono essere privati di quei geni coinvolti nella replicazione e nell'assemblaggio del virione.
- Il virus non deve possedere alcune qualità non desiderabili come produzione di composti tossici o attivazione del sistema immunitario dell'ospite.
- Il virus deve avere dimensioni sufficienti per inserire al suo interno il gene terapeutico.

I virus attualmente studiati come vettori per la terapia genica sono:



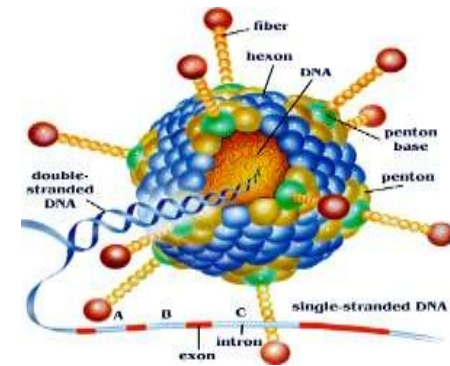
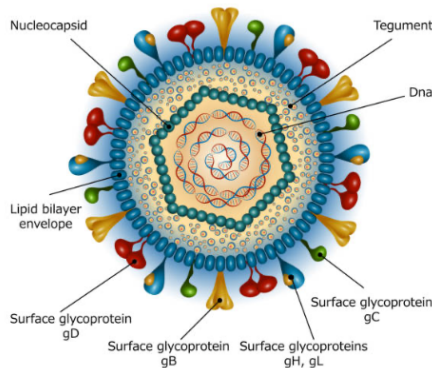
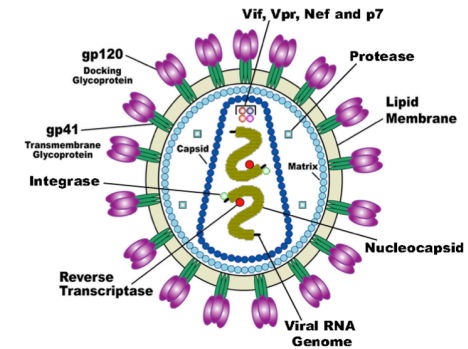
✱ Retrovirus

✱ Lentivirus

✱ Adenovirus

✱ Virus Erpetici

✱ Virus Adenoassociati



PROBLEMI IRRISOLTI DELLA TERAPIA GENICA

Sono numerosi i problemi irrisolti della terapia genica con i quali si trovano a combattere gli scienziati. Essi riguardano:

- 1. La sicurezza della procedura.** Questo è un problema particolarmente evidente per i vettori virali. Alcuni di questi derivano infatti da virus pericolosi, come l'HIV. E' quindi necessario che prima dell'utilizzo questi vettori siano privati della virulenza originaria del virus e mantengano invece inalterata la capacità di infettare le cellule bersaglio.
- 2. L'efficienza di trasferimento.** Negli studi sulla terapia genica, la maggior parte degli sforzi si concentra oggi sulla ricerca di vettori in grado di trasferire il DNA in modo efficiente e di inserirlo stabilmente nelle cellule.
- 3. La selettività del bersaglio.** In questi ultimi anni sono stati messi a punto una varietà di vettori, alcuni dei quali in grado di fare esprimere il gene estraneo in uno specifico tipo cellulare (come i globuli bianchi, le cellule del muscolo, delle vie respiratorie, ecc...).

PROBLEMI IRRISOLTI DELLA TERAPIA GENICA (2)

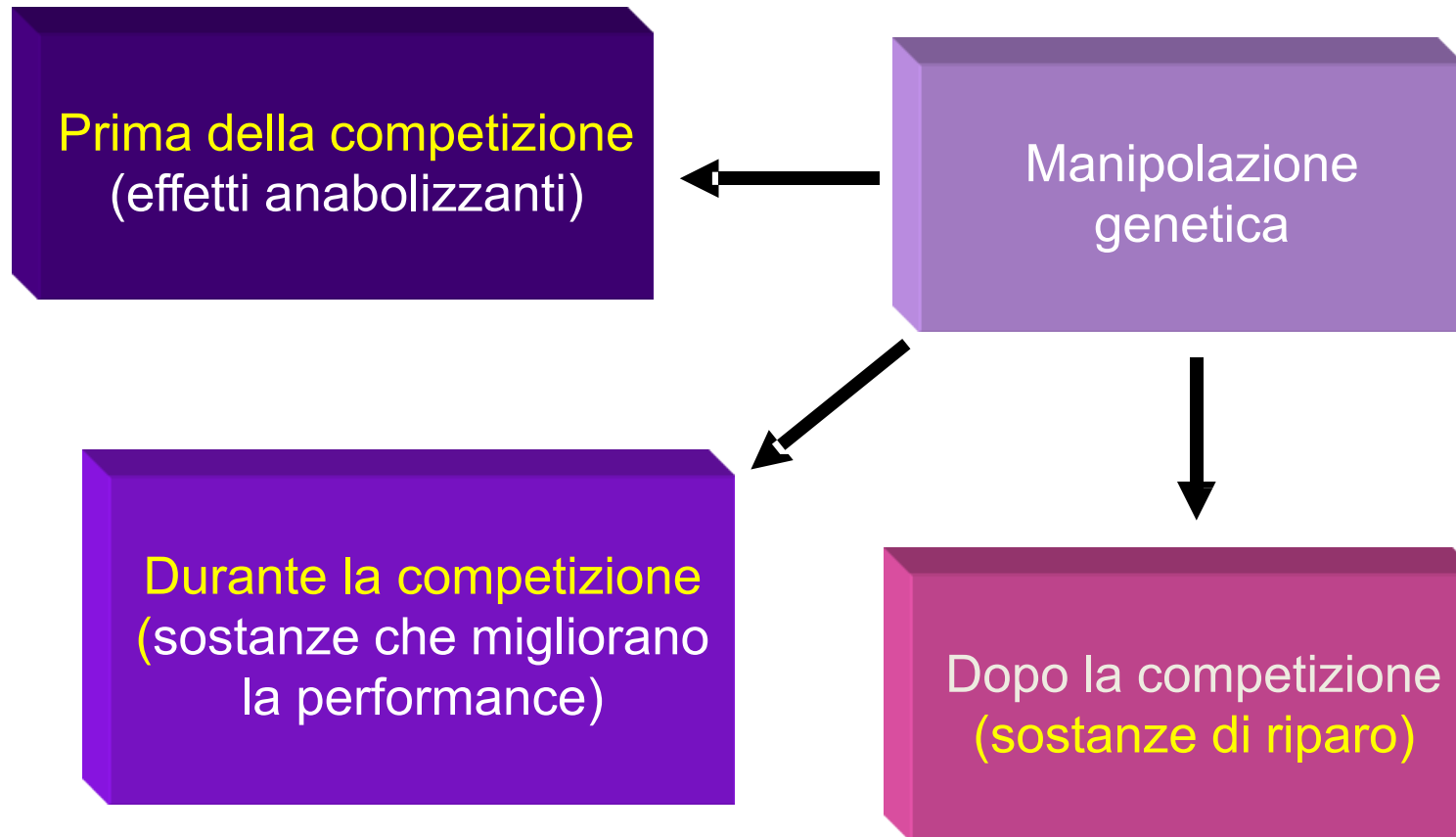
4. La durata dell'espressione del gene trasferito. La terapia genica risulta praticamente inutile se l'espressione del gene "estraneo" non viene mantenuta per un tempo sufficiente. Le ricerche mirano a sviluppare sistemi che permettono un'espressione duratura, in modo da sottoporre il paziente ad un unico trattamento, o al limite a trattamenti ripetuti a distanza di qualche anno.

5. La reazione immunitaria. Come ogni altra sostanza estranea, il prodotto del gene nuovo, il gene stesso e soprattutto il vettore possono scatenare una risposta immunitaria da parte dell'organismo ospite. Questa può portare all'eliminazione delle cellule modificate geneticamente, o all'inattivazione della proteina prodotta dal nuovo gene, annullando quindi tutti gli effetti della terapia. Nello sviluppo delle nuove strategie di terapia genica si cerca di evitare per quanto possibile che il vettore o il gene estraneo producano una reazione immunitaria.

6. La terapia genica è una scienza giovane. Il primo tentativo fu effettuato negli Stati Uniti da Michael Blaese nel 1990 su una bambina affetta da SCID, una grave immunodeficienza ereditaria. Da allora, nonostante gli indubbi progressi raggiunti, sono ancora pochissimi i tentativi di terapia genica per i quali si possa parlare di un successo dal punto di vista clinico.

Il futuro del doping: i geni?

I tre possibili livelli del doping genetico



Quali approcci di ingegneria genetica si possono ipotizzare come doping?

- 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.

Esempi di approcci al doping genetico (1) : Ormone della crescita

Transfezione in vivo: geni che producono hGH posti in uno speciale involucro proteico

Utilizzati come spray da inalare nel sistema bronchiale

Iniettati direttamente nel sangue Incrementata produzione di hGH

Geni produttori hGH posti in mioblasti da iniettare nel muscolo scheletrico. Le cellule vengono integrate dalla struttura muscolare e cominciano a produrre hGH

Sono stati effettuati esperimenti su animali iniettando tali cellule nel muscolo, dopo 3 mesi i livelli di hGH nel sangue erano 8 volte superiori

Con una metodica simile sono stati trattati (trial sperimentali) pazienti con la distrofia di Duchenne. Il gene mancante della distrofina è stato posto in mioblasti poi iniettati nel muscolo dei pazienti

Doping genetico (2): Eritropoietina

L'inserimento del gene dell'eritropoietina in cellule da impiantare o iniettare sottocute o inalare e che poi producono EPO.

Esperimenti su animali (topi e scimmie) con inserimento del gene per l'EPO hanno portato ad aumenti del 80% dell'ematocrito (Gene Ther 1998; 5:665)

Doping genetico (3): Fattori di crescita endoteliali vascolari (VEGF)

Geni che codificano per VEGF possono promuovere la crescita di nuovi vasi sanguigni consentendo un maggiore apporto di ossigeno ai tessuti.

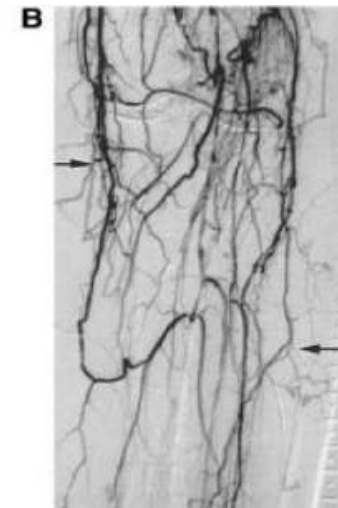
Finora sono stati fatti esperimenti come terapia genica per malattie quali ischemia cardiaca o insufficienza arteriosa periferica (Circulation 2002; 105:2012; Circulation 2003; 108:1933)

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

Vasi sanguigni di un
paziente che ha ricevuto
l'inoculazione di un "vettore
fagico" portatore del gene
VEGF



PRIMA



DOPO

Doping genetico (4): Miostatina



La miostatina è una proteina regolatrice della crescita muscolare. Appartiene alla superfamiglia dei TGF-beta

E' responsabile del differenziamento dei muscoli scheletrici

Ha una funzione inibitoria della proliferazione delle cellule satelliti alle fibre muscolari. Mutazioni genetiche (es. ceppo bovino *Belgium blue bull*) provocano abnormi crescite dei muscoli

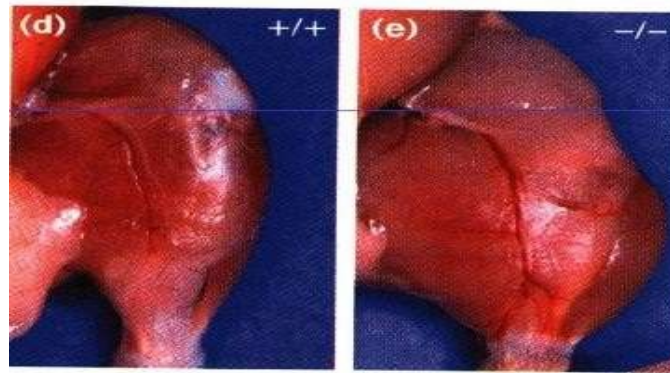
Due strade: modificare il gene che codifica la miostatina o somministrare inibitori della miostatina (es. follistatina)

Vedi: Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:9306

Topi Schwarzenegger

Rimozione del Gene che
controlla la crescita della
massa muscolare (miostatina)

Arto
anteriore di
un topo
normale



Arto anteriore di
un topo privo
del gene della
miostatina

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

Doping genetico (5): Insuline like Growth Factor (IGF-1)

Insulin like Growth Factor 1 (IGF-1)

Dopo iniezione intramuscolare, in animali, di un plasmide contenente il gene umano per IGF-1 quest'ultimo veniva espresso nei muscoli

Risultato: incremento della forza muscolare

Effetti avversi?? (questi fattori di crescita regolano anche la crescita di tumori ormono-dipendenti)

L'incremento di IGF-1 non riscontrabile nel sangue o nelle urine. Si dovrebbe effettuare una biopsia muscolare per individuare la manipolazione genetica con la PCR

Doping genetico (6): Meccano Growth Factor (MGF)

Derivato dal gene del IGF-1 per splicing alternativo

MGF è individuabile solo quando il muscolo è in esercizio o stirato

MGF sembra avere solo azione locale infatti non si ritrova nel sangue

MGF sembra proteggere il muscolo cardiaco e i muscoli scheletrici, inducendo processi riparativi locali e prevenendo l'apoptosi

Vi sono anche evidenze che MGF sia coinvolto nel mantenimento del tessuto nervoso, poiché è noto che IGF-1 è trasportato dentro i neuroni

Se MGF viene posto in un gene manipolato e immesso nei muscoli di un topo di laboratorio in 2 settimane si ha un incremento del 20% della massa muscolare

Quando, con un simile approccio, si immette nel muscolo IGF-1 epatico si ottiene lo stesso incremento del 20% della massa muscolare ma soltanto dopo 4 mesi

Altri geni per l'aumento della resistenza

- enzima di conversione dell'angiotensina (ACE): un vasocostrittore o vasodilatatore;
- recettore d attivante la proliferazione dei perossisomi (PPAR α), che codifica gli enzimi della Beta-ossidazione degli acidi grassi;
- fattori indotti dall'ipossia (HIF) per le modifiche dell'ossigeno disponibile.

Rischi ipotizzabili con il doping genetico

A breve-medio termine

- Autoimmunità
- Iperimmunità
- 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

CONTROLLI ANTI-DOPING GENETICO: PASSAPORTO MOLECOLARE

Dal punto di vista dei controlli antidoping vi sono criticità che rendono difficile la rilevazione del doping genetico:

- il DNA esogeno introdotto potrebbe dirigere la sintesi di una proteina identica a quella endogena
- la proteina esogena introdotta potrebbe essere identica a quella endogena
- il DNA esogeno è riscontrabile solo localmente quando introdotto per via iniettiva
- per la rilevazione e l'individuazione di una proteina artificiale è necessario conoscerne l'esatta sequenza
- il prodotto di un gene modificato potrebbe essere identico a quello del gene non mutato
- si tratta di una nuova tipologia di doping con associate difficoltà nel riconoscimento e nell'individuazione



IL PASSAPORTO MOLECOLARE

- Una delle proposte per individuare questa tipologia di doping è l'introduzione nel Passaporto Biologico dell'Atleta di un modulo molecolare per tracciare l'espressione genica tipica di ogni atleta, il c.d. "Passaporto Molecolare"
 - Il Passaporto Molecolare potrebbe favorire l'individuazione di eventuali geni estranei introdotti nell'organismo a fini del miglioramento delle prestazioni sportive
 - La determinazione periodica dei livelli di espressione genica potrebbe permettere la definizione di pattern specifici di espressione per l'atleta, che permetterebbero il riscontro di eventuali alterazioni potenzialmente ascrivibili a doping genetico
-
-

METODI DI ANALISI ANTIDOPING

A livello internazionale le analisi antidoping vengono effettuate in un numero relativamente piccolo di laboratori, accreditati dal **Comitato Internazionale Olimpico (C.I.O.)**, che sono sempre aggiornati su nuovi metodi e strategie analitiche, assicurazione della qualità e nuovi sviluppi.

I campioni biologici utilizzati per le analisi antidoping possono essere:

- urina
- sangue
- siero
- saliva
- capelli
- sudore

Il liquido biologico prevalentemente scelto per le analisi è l'**urina**, perchè, a differenza del sangue, prevede un campionamento meno invasivo e in quantità maggiori, contiene concentrazioni elevate di farmaci e/o metaboliti.

MATRICI BIOLOGICHE

L'urina è la matrice biologica di prima scelta nell'analisi delle sostanze d'abuso. Presenta molti vantaggi quali:

- il prelievo non invasivo del campione
- la possibilità di analizzare sia le sostanze che i loro metaboliti dopo diversi giorni dall'assunzione.

Gli svantaggi sono:

scarsa rilevanza clinica dell'analisi quantitativa in quanto le concentrazioni degli analiti nell'urina variano con la dose, via di somministrazione, tempo di latenza fra l'assunzione e l'analisi, aggiunta di sostanze adulteranti.

STERIODI nei LIQUIDI BIOLOGICI

Nelle **urine** gli steroidi sono contenuti in maggior quantità in forma coniugata (circa 99,7%), mentre la forma libera (necessaria per le analisi) è presente solo per lo 0,3%.

Nel **siero** esistono in tre forme: forma libera (circa 4%), forma legata all'albumina (circa 5%), forma legata alla globulina (circa 91%). Solo le forme libere sono biologicamente attive.

Nella **saliva** gli steroidi sono presenti nella forma libera e la loro concentrazione riflette con buona approssimazione quella nel siero.

Recentemente sono state introdotte nuove tecniche di analisi sui **capelli**, poichè questo tipo di campione riflette bene la concentrazione degli steroidi, è facilmente conservabile, richiede un campionamento non invasivo e facilmente eseguibile.

Inoltre in campo forense può essere evitata l'adulterazione o sostituzione del campione, se si opera sotto la supervisione di ufficiali giudiziari.

L'analisi del capello può essere affiancata a quella delle urine per confermare dei test su abuso di farmaci.

TECNICHE ANALITICHE UTILIZZATE NEI CONTROLLI ANTIDOPING

- 1. Immunometriche**
- 2. Cromatografiche**
- 3. Spettrometria di massa**
- 4. Biotecnologie (Doping genetico)**

Nelle tecniche immunometriche si sfruttano le proprietà antigeniche degli analiti da analizzare

Prevalentemente utilizzate per identificare analiti di tipo proteico/peptidico

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

La **cromatografia** è un metodo **chimico-fisico** di **separazione** basato sulla diversa **distribuzione** di composti in **due fasi non miscibili**.

In genere tali metodiche permettono la **separazione** dei diversi componenti di una miscela attraverso la loro **migrazione differenziale** attraverso **sostanze immobili**, denominate **fase stazionaria**.

Il passaggio delle sostanze attraverso la fase stazionaria avviene grazie alla cosiddetta **fase mobile** che può essere **liquida o gassosa**.

CROMATOGRAFIA SU COLONNA: la fase stazionaria, coniugata a una matrice inerte e insolubile, è contenuta in una colonna di vetro, plastica o metallo. La fase mobile passa attraverso quella stazionaria per gravità, capillarità o sotto pressione.

Più una sostanza è solubile nella fase stazionaria, maggiormente sarà ritardata dall'uscita dalla colonna.

Le principali tecniche cromatografie utilizzate sono:

1. HPLC

2. Gas-Cromatografia

Nell'HPLC la fase mobile è liquida ed è fatta passare attraverso la fase stazionaria ad elevata pressione, ciò aumenta di molto la capacità di separazione (risoluzione) e riduce di molto i tempi di analisi.

I campioni da analizzare sono sciolti in soluzione acquosa contenenti solventi organici

Nella Gas-cromatografia la fase mobile è gassosa ed è fatta passare attraverso la fase stazionaria in colonne capillari ad elevata pressione.

I campioni devono essere nebulizzati prima dell'analisi

Sia nell'HPLC sia nella gas-cromatografia, l'effluente viene analizzato in continuo per differenziare le diverse sostanze sulla base del tempo di eluizione.

I profili di eluizione vengono confrontati con quelli di sostanze note utilizzate come standards. Dalle intensità dei segnali si possono ricavare anche informazioni quantitative sugli analiti identificati.

FLUORESCENZA E CHEMILUMINESCENZA

A volte gli analiti da determinare (ad es. steroidi) sono presenti nei fluidi biologici in concentrazioni troppo basse da essere rivelate dalle tecniche analitiche più comuni

In questi casi sono richiesti metodi ad alta sensibilità come **fluorescenza e chemiluminescenza (diretta o indiretta)**.

- fluorescenza diretta (es. per gli estrogeni)
- derivatizzazione fotochimica (altri steroidi)
- derivatizzazione con fluorofori

La **fluorescenza** è una tecnica spettroscopica in cui una sostanza emette una radiazione elettromagnetica (luce) quando viene eccitata con un'altra radiazione elettromagnetica.

La **chemiluminescenza** è una tecnica spettroscopica in cui una sostanza emette una radiazione elettromagnetica (luce) in seguito ad una sua reazione chimica (luciole).

SPETTROMETRIA DI MASSA

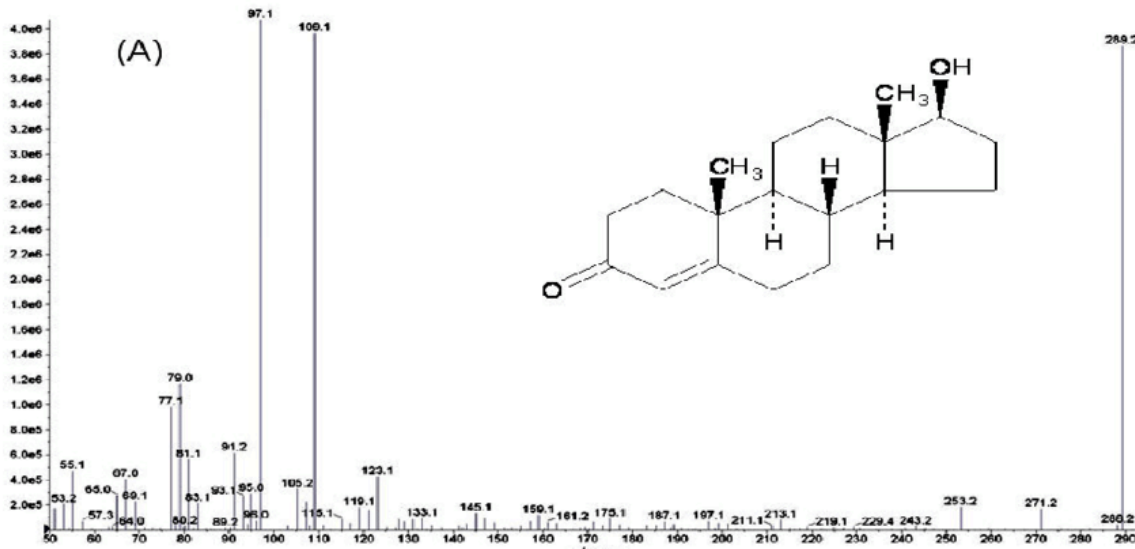
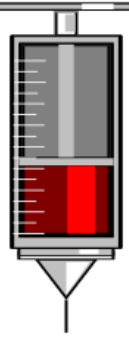
- Misura la massa delle molecole.
- Fornisce anche la formula molecolare
- Misura il rapporto massa/carica (m/z) e quindi si basa sulla ionizzazione delle molecole.

Meccanismi di ionizzazione

- Espulsione di e^- : $M \quad \text{--->} \quad M^{\cdot+} + e^-$
- Protonazione: $M + H^+ \quad \text{--->} \quad MH^+$
- Cationizzazione: $M + Cat^+ \quad \text{--->} \quad M Cat^+$
- Deprotonazione: $MH \quad \text{--->} \quad M^- + H^+$

La ionizzazione multipla delle molecole rappresenta una loro impronta digitale

I componenti dello spettrometro



Computer