

**Facoltà di Scienze Motorie
Università degli Studi di Verona**

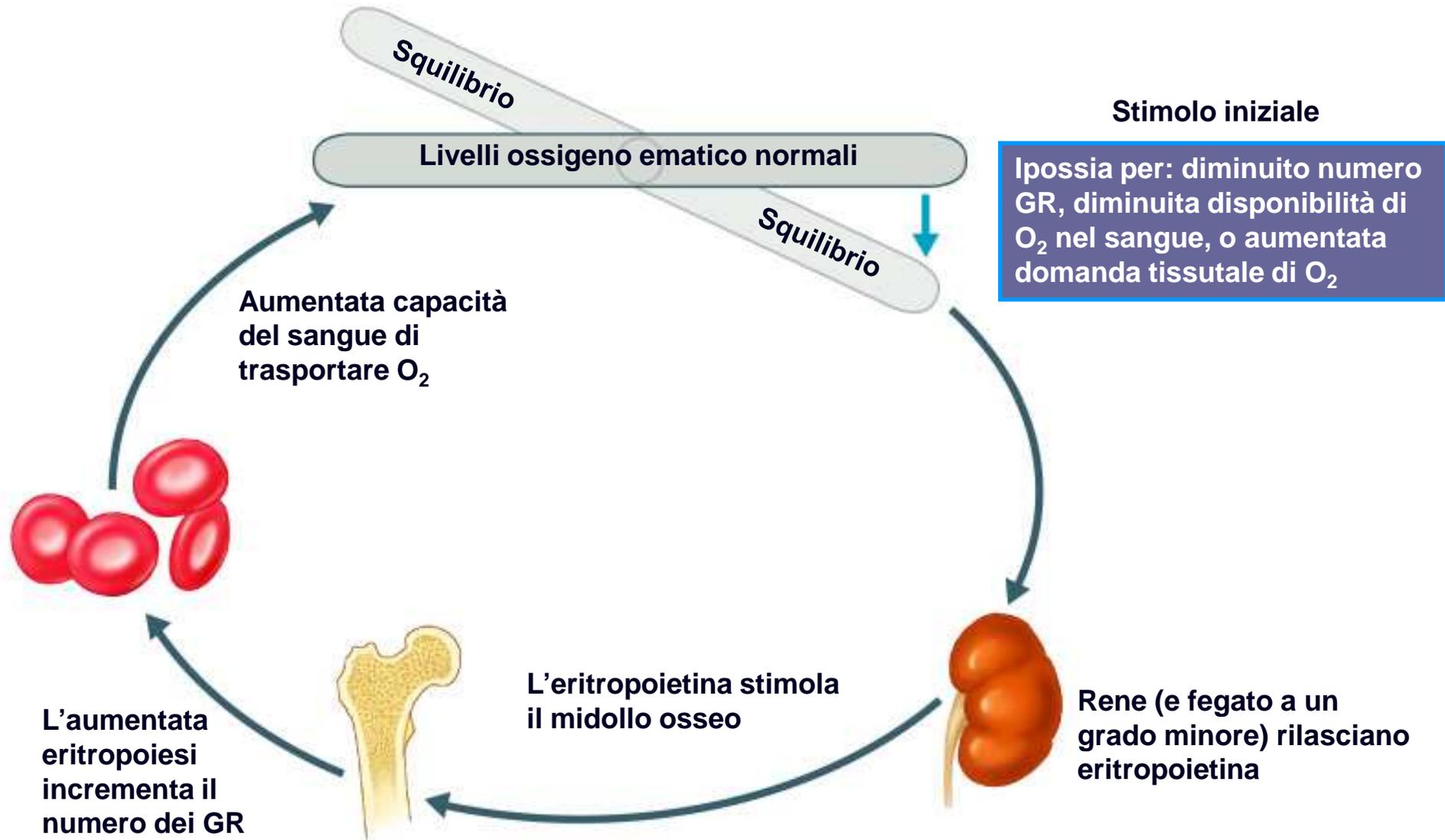
**Corso di
“Farmacologia”
Lezione 16: Eritropoietina e doping ematico**

Eritropoietina (EPO)



- Come è noto i globuli rossi (GR) trasportano l'ossigeno ai tessuti e negli sport di resistenza, ad esempio ciclismo, sci di fondo, ecc., le richieste di ossigeno sono molto elevate
- Da tempo, pertanto, sono state indagate strategie per aumentare la produzione dei GR in modo da migliorare la performance sportiva
- La più recente strategia è basata sul ruolo dell'eritropoietina nello stimolare il midollo osseo a produrre globuli rossi (GR)
- Come doping si usa la EPO ricombinante umana (rHuEPO) e sostanze affini (es. **darbepoietina**)
- L'EPO ha una vita relativamente breve nell'organismo mentre il suo effetto stimolante può durare fino a due settimane

Eritropoiesi

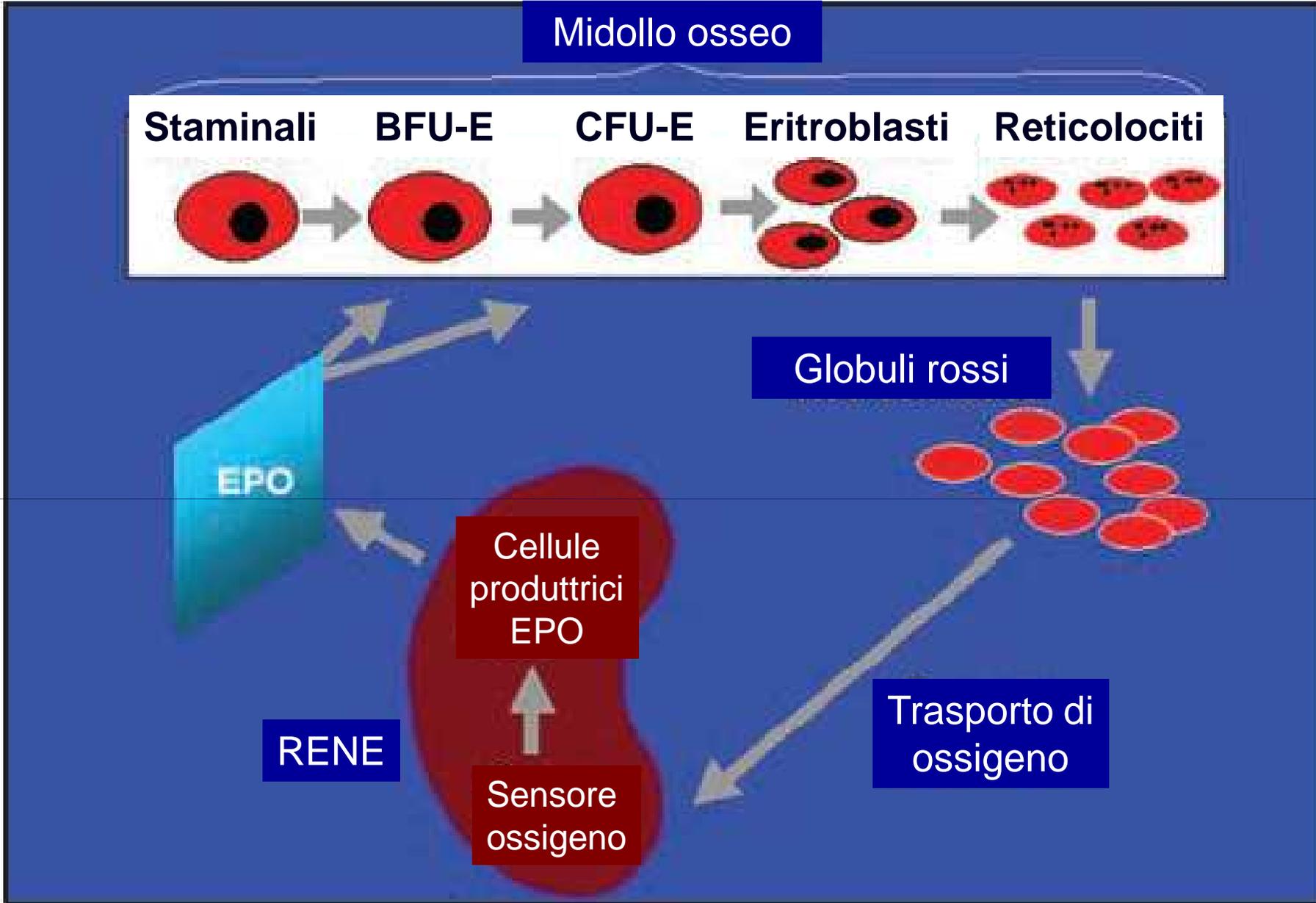


Eritropoiesi ed ipossia

- L'eritropoiesi è controllata da un sistema a feedback molto sensibile, in cui un sensore a livello del rene percepisce le alterazioni nell'apporto di ossigeno
- Il meccanismo si basa sulla presenza di un fattore di trascrizione (Hypoxia-inducible factor, HIF-1) eterodimerico (HIF-1 α e HIF-1 β) che aumenta l'espressione del gene dell'eritropoietina
- HIF-1 α è instabile in presenza di ossigeno e viene rapidamente degradato dalla prolil-idrossilasi con il contributo della proteina di von Hippel-Lindau
- Durante ipossia la prolil-idrossilasi è inattiva di conseguenza HIF-1 α si accumula attivando l'espressione dell'eritropoietina che stimola la rapida espansione dei progenitori eritroidi

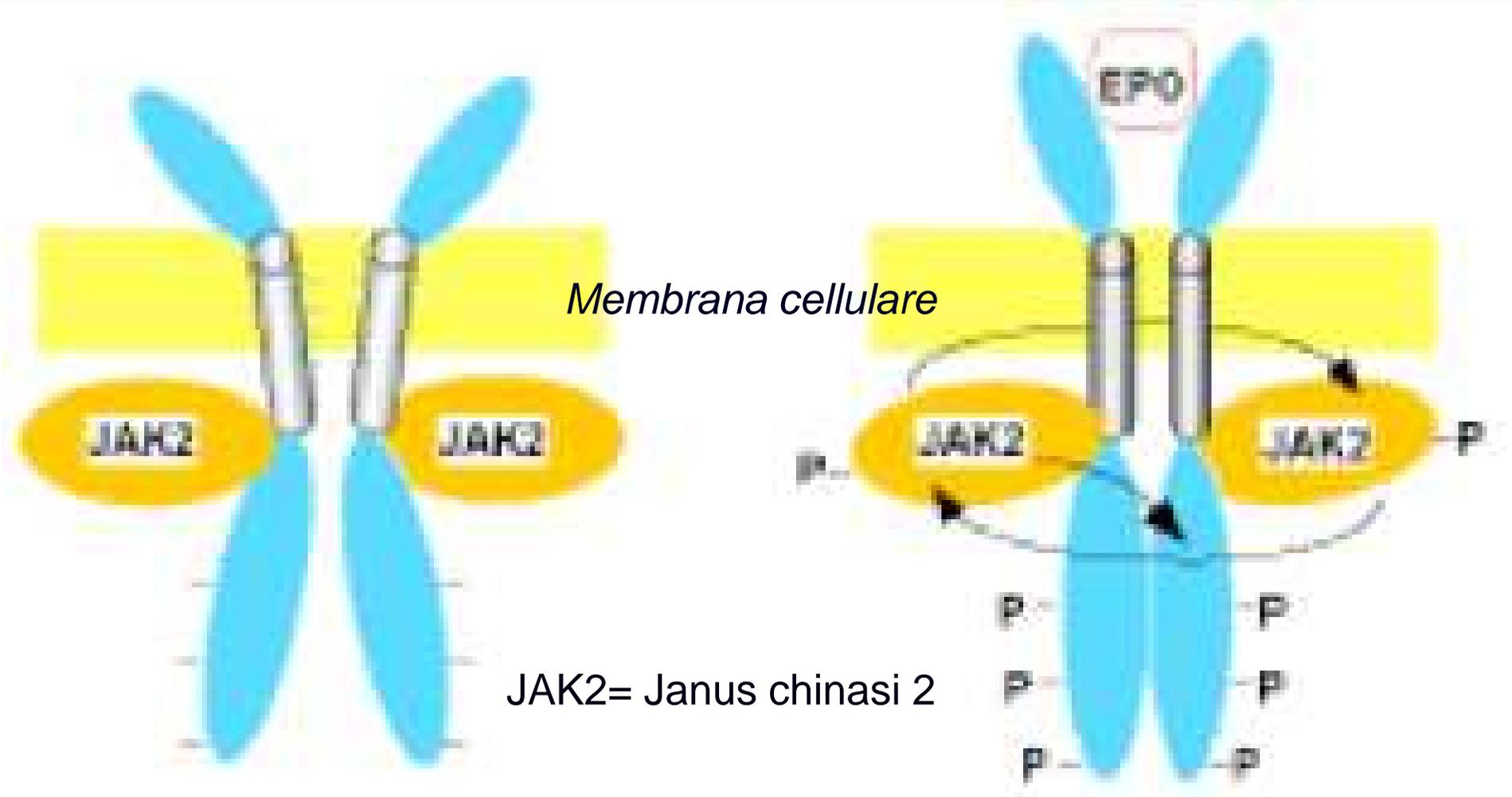
Eritropoietina umana

- L'eritropoietina è una proteina composta da 193 aminoacidi (ma i primi 27 sono scissi durante la secrezione)
- Viene prodotta principalmente dalle cellule interstiziali peritubulari del rene, sotto il controllo di un gene situato sul cromosoma 7
- Dopo la secrezione l'eritropoietina, a livello del tessuto emopoietico (midollo osseo), si lega ad un recettore (EPO-R) localizzato sulla superficie dei progenitori eritroidi e viene internalizzata
- In presenza di anemia o ipossiemia la sintesi di EPO cresce rapidamente di più di 100 volte e conseguentemente aumenta la sopravvivenza, proliferazione e maturazione delle cellule progenitrici midollari anche attraverso l'inibizione dell'apoptosi (morte cellulare programmata)



BFU-E = unità formanti aggregati-eritrociti; CFU-E = unità formanti colonie-eritrociti

Recettore dell'eritropoietina (EPO-R)



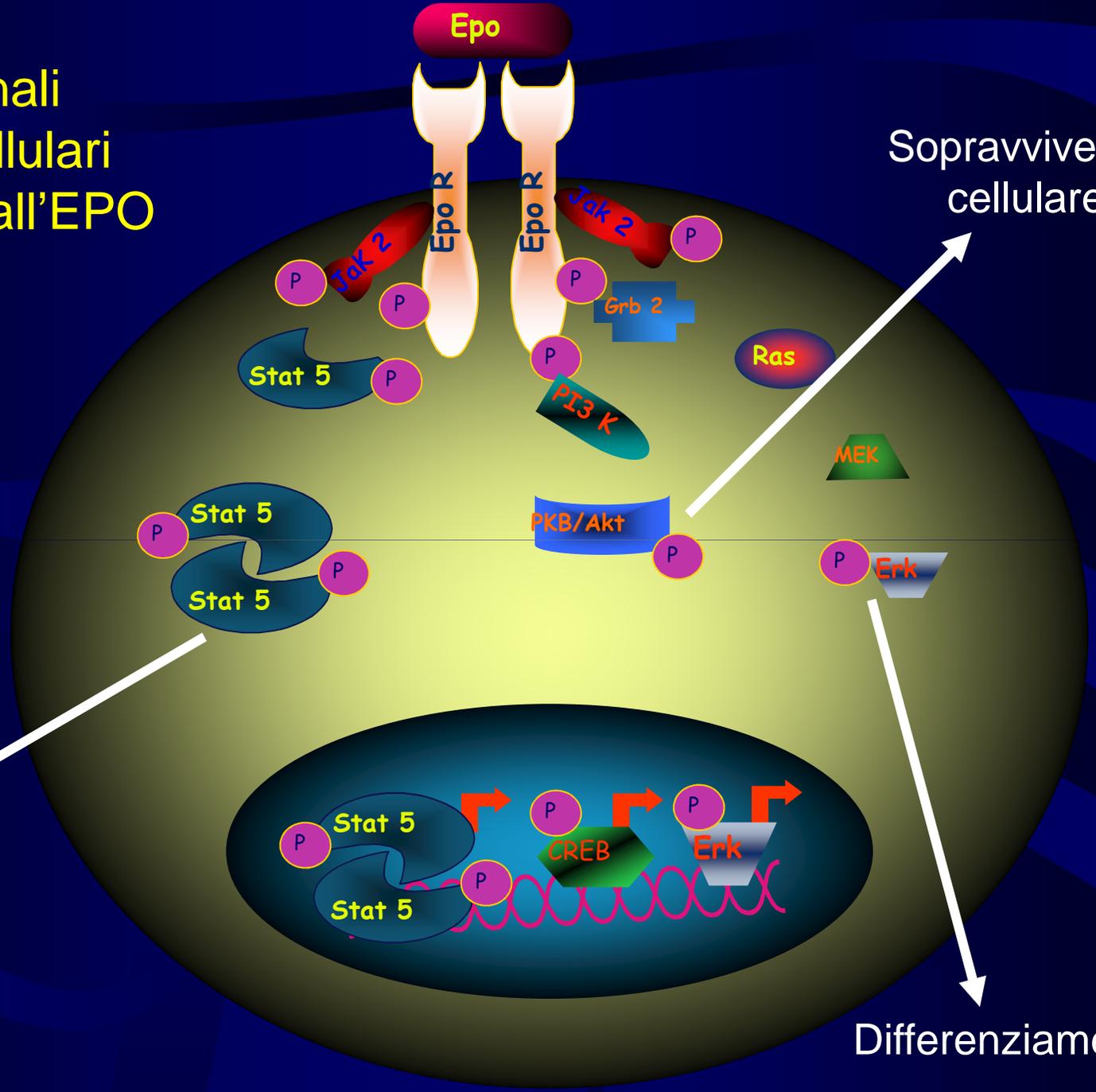
La modificazione conformazionale determinata dal legame dell'EPO con il recettore attiva JAK2 che si auto-fosforilizza e che insieme ad altre proteine attivate determina gli effetti biologici dell'EPO

Segnali intracellulari attivati dall'EPO

Sopravvivenza cellulare

Proliferazione

Differenziamento



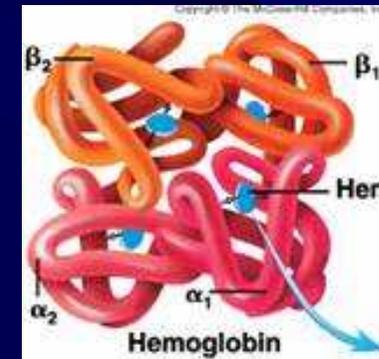
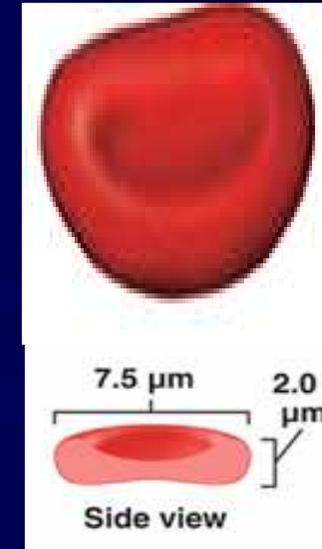
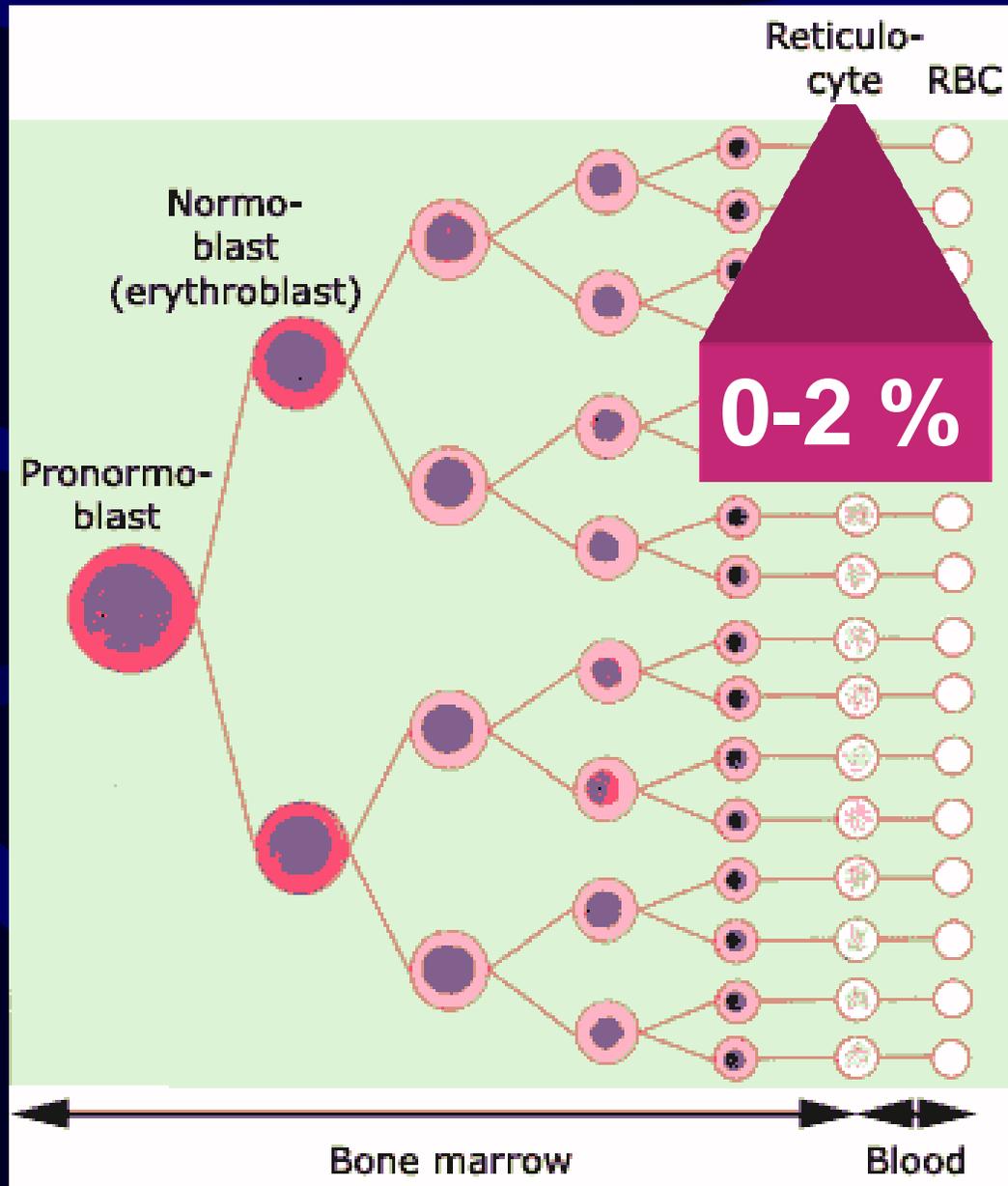
Eritropoietina umana

- I livelli normali di EPO nel sangue sono circa 2-25 mU/ml, ma possono aumentare di 100-1000 volte come risposta all'ipossia
- Il meccanismo a sensore d'ossigeno porta ad interrompere la produzione di EPO quando il numero dei GR e/o la fornitura di ossigeno ai tessuti ritorna all'equilibrio
- Il meccanismo a feedback assicura una produzione adeguata di GR per prevenire l'anemia e l'ipossia tissutale, ma non troppo elevata da portare a policitemia con eccessiva viscosità del sangue e conseguenti rischi cardiovascolari
- La sovrapproduzione di EPO che porta a policitemia (secondaria da distinguere dalla policitemia vera o primaria: disordine mieloproliferativo dove proliferano cloni, indipendenti dall'EPO, di cellule progenitrici con incremento sia di GR che di granulociti e piastrine) può derivare da patologie cardiache o respiratorie, dall'altitudine, da ostruzioni del flusso sanguigno al sito di produzione dell'EPO, da tumori produttori EPO
- Nella policitemia secondaria i livelli di EPO sono in genere elevati, ma possono anche essere nella norma per aumento del suo turnover

Eritropoietina umana

- E' noto che le differenze genetiche esistenti tra gli atleti possono essere un elemento alla base delle diverse capacità di prestazione
- Tra le possibili differenze genetiche alcune possono riguardare l'eritropoiesi in generale e specificatamente l'eritropoietina
- Un esempio è la storia del fondista finlandese Eero Mäntyranta, doppia medaglia d'oro alle Olimpiadi del 1964 ad Innsbruck
- Era nato con una mutazione genica dell'Epo (espressa a livello recettoriale) che aumentava del 25-50% la sua capacità di trasporto di O₂ con i GR
- Tale condizione para-fisiologica potrebbe essere riprodotta attraverso manipolazione genica

Formazione dei globuli rossi



Maschi <17 g/dl

Femine <16 g/dl

Eritropoietine esogene

Eritropoietina ricombinante umana (epoietina, rHuEPO)

- Presenta solo lievi differenze (a livello delle catene di carboidrati) rispetto all'EPO fisiologica, che tuttavia si riflettono sul comportamento chimico e fisico della molecola, ad esempio vi sono differenze nella carica elettrica
- Ai fini ergogenici la rHuEPO viene utilizzata con somministrazioni iniettabili ogni 2-3 gg, per 3-4 settimane, associata a preparati di Ferro. Infatti, in condizioni di stimolazione da eritropoietina, diventa necessario fare sintetizzare l'emoglobina negli atleti ad un ritmo molto più elevato che di norma e ciò necessita di un adeguato rifornimento di ferro per mantenere l'efficienza eritropoietica. Emivita e.v. 8,5 ore
- Raggiunta la fase di mantenimento l'assunzione può avvenire a dosi più basse, di più difficile individuazione ai controlli antidoping

Darbepoietina

- Più stabile dell'EPO, con emivita più prolungata (e.v. 25,3 ore) e maggiore efficacia; è più facilmente identificabile per caratteristiche strutturali diverse dal prodotto umano endogeno e per la minore clearance

EPO di terza generazione:

Continuous erythropoietin receptor activator (CERA)



Riccardo Riccò



Emanuele Sella

La CERA è una nuovissima molecola, sviluppata per il trattamento dell'anemia, che attiva i recettori dell'EPO innescando l'eritropoiesi.

La sua emivita, decisamente superiore rispetto a quella dell'eritropoietina ma anche a quella della darbopoietina (circa 5-6 volte), consente di somministrarla 1-2 volte al mese.

E' utilizzata solo in ambito ospedaliero. Al mercato nero sembra che il costo di una singola siringa si aggiri intorno ai 1000 euro

Usi terapeutici dell'eritropoietina

(epoetina; Eprex[®], Globuren[®], Neorecormon[®];
darbepoetina: Aranesp[®], Nespo[®])

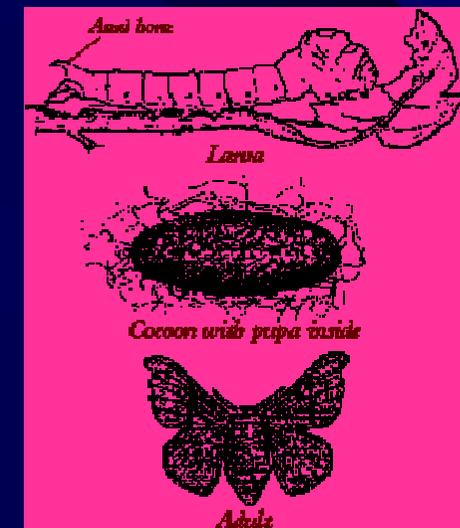
- Anemia in corso di insufficienza renale cronica
- Anemia da zidovudina (anti-HIV)
- Anemia "refrattaria"
- Anemia post-chemioterapia antitumorale
- Carenze patologiche di EPO
- Mieloma
- Sindromi mielodisplasiche

La ricerca sull'eritropoietina in rapido e continuo sviluppo



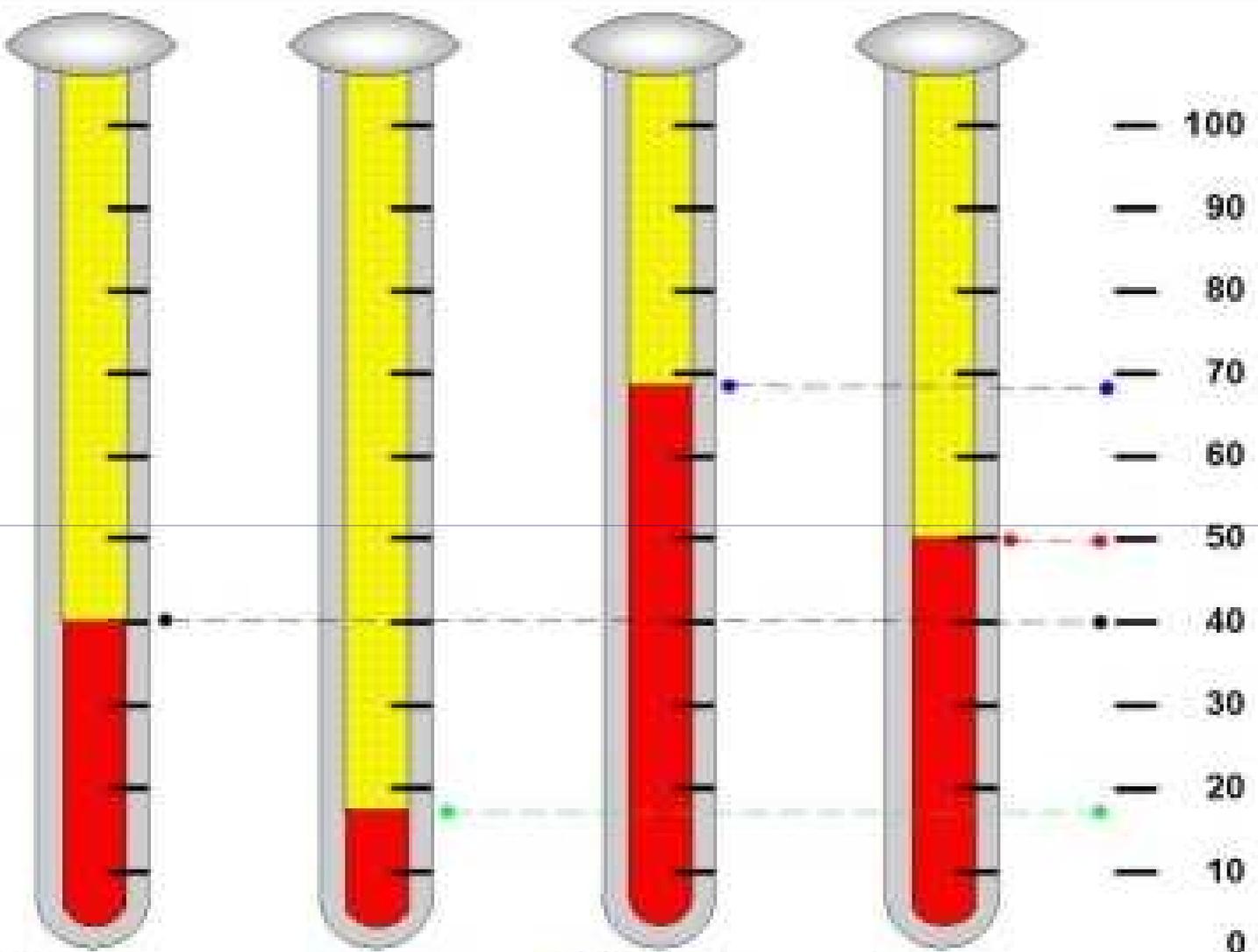
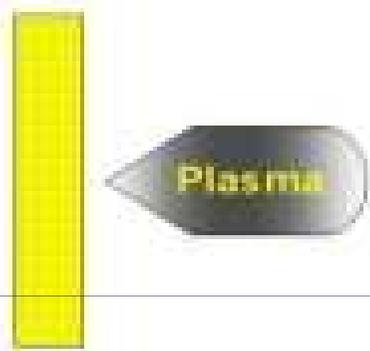
Prodotti che mimano l'attività dell'EPO

- Piccoli peptidi o composti non peptidici che possono legarsi, attivandoli, ai recettori dell'EPO (Science 1996; 273:458. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:12156)
- Recentemente, ad esempio, in esperimenti in vitro, è stato dimostrato che l'emolinfa del baco da seta inibisce l'apoptosi di cellule che producono EPO incrementando la produzione dell'EPO di 5 volte (Biotechnol Bioeng 2005; 91:793)



I problemi dei test per l'EPO

- **Misure indirette** per l'EPO
 - Misura della densità dei GR (ematocrito espresso in percentuale), dei livelli di emoglobina, conta dei reticolociti
 - Nel ciclismo misurazioni dell'ematocrito superiori al 50% portano alla sospensione. Valori superiori al 50% vengono ritenuti sospetti dal CIO
 - La Federazione Internazionale di Sci ha imposto un limite di emoglobina di 18,5 g/dL nell'uomo e di 16,5 g/dL nella donna, se riscontrati prima di una gara l'atleta non può partecipare per preservare la sua salute
 - Bisogna sottolineare che i valori di ematocrito ed emoglobina possono variare da atleta ad atleta e in risposta allo stesso esercizio. L'ideale è avere il profilo ematologico nel tempo di ciascun atleta



Enzo Boncompagni, MD

I problemi dei test per l'EPO

- Le indagini per individuare l'uso di EPO si sono estese a diversi sport ed ovviamente alle Olimpiadi
 - Marco Pantani fu squalificato dal Giro d'Italia per un valore di ematocrito del 52 %
 - Nel 2003 il mezzofondista keniano Bernard Lagat (secondo miglior tempo di sempre nei 1500 m) è risultato positivo (ricerca di rHuEPO nelle urine) per assunzione di EPO prima dei Campionati del Mondo di atletica leggera di Parigi (a cui non ha potuto partecipare) le successive contro-analisi lo hanno però scagionato. Questo caso ha dimostrato la necessità di ricercare test più attendibili.



All rights reserved. ©IAAF

Recentemente è stato messo a punto (con buoni risultati) un nuovo metodo isoelettrico, diretto, per distinguere l'EPO esogena dall'endogena nei campioni di urine, sviluppato nel laboratorio francese di Chatenay-Malabry (Nature 2000; 405:635; Anal Biochem 2002; 311:119; Clin Chem 2003; 49:901). Si è riusciti ad individuare EPO esogena anche dopo 3 giorni dall'assunzione

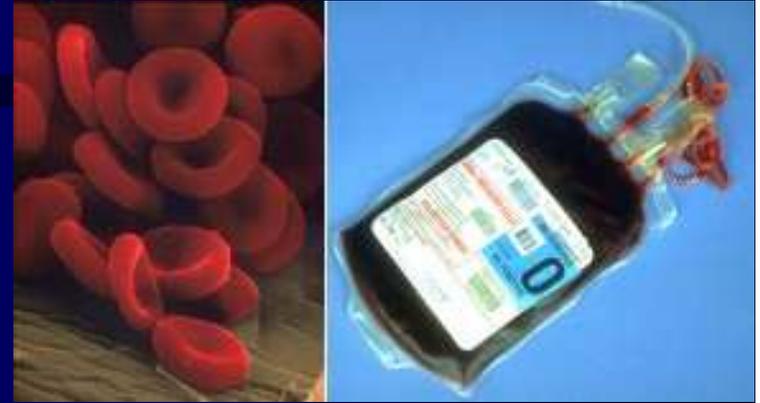
Reazioni avverse da eritropoietina esogena

- Ipertensione arteriosa (Incidenza 1-30%. Il meccanismo non è del tutto chiarito, l'EPO ha un'azione vasocostrittrice inoltre l'esposizione cronica provoca resistenza all'azione vasodilatatrice dell'ossido nitrico. Infine, l'EPO promuove la crescita delle cellule muscolari lisce dei vasi con rimodellamento vascolare e ipertrofia che può contribuire al mantenimento dell'ipertensione [Am J Kidney Dis 1999; 33:821-8])
- **Dolore osseo (non grave, transitorio, incidenza elevata = 40%)**
- Convulsioni (per rapido incremento viscosità del sangue e perdita vasodilatazione ipossica con conseguente aumento resistenze vascolari)
- **Cefalea**
- Fenomeni tromboembolici (EP, IMA, ictus), tutti legati all'iperviscosità ematica
- **Anemia post-trattamento per diminuita produzione EPO endogena**
- Aplasia pura della serie rossa (formazione anticorpi anti-EPO?)
- **Disordini mieloproliferativi (studi su animali, trattamenti a lungo termine?)**

Danni da eritropoietina come doping

- I dati sulle reazioni avverse dell'eritropoietina elencate in precedenza derivano quasi esclusivamente dai trattamenti terapeutici su pazienti con patologie sottostanti
- **Non ci sono studi sul danno dell'eritropoietina usata come doping su atleti sani**
- Uno studio su atleti a cui fu data EPO per 6 settimane ha evidenziato un significativo incremento della pressione sistolica in risposta ad esercizio sub-massimale
- **Il numero di morti tra ciclisti belgi e olandesi tra il 1987 e il 1990 è stato messo in relazione all'uso di EPO** (*Gambrell e Lombardo. Drugs and doping: blood doping and recombinant human erythropoietin. In: Mellion, M.B. (ed.): Sports medicine secrets. Philadelphia: Hanley & Belfus, 1994, pp. 130-3*)
- Non è sbagliato pensare che le reazioni avverse evidenziate nei pazienti possano verificarsi anche negli atleti sani anche se con un'incidenza inferiore

Doping ematico



- Prima dell'EPO si utilizzava la tecnica delle trasfusioni di sangue per incrementare il numero di globuli rossi
- L'EPO ha rimpiazzato le trasfusioni in quanto determina un maggiore aumento di GR. Negli ultimi tempi, tuttavia, ci sono segnali di un ritorno alle autotrasfusioni in quanto non individuabili nei test
- Effetti simili a quelli dell'EPO e del doping ematico si possono ottenere anche con gli allenamenti in altura e con le tende ipo-ossigenate

Doping ematico



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



Doping ematico



- 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

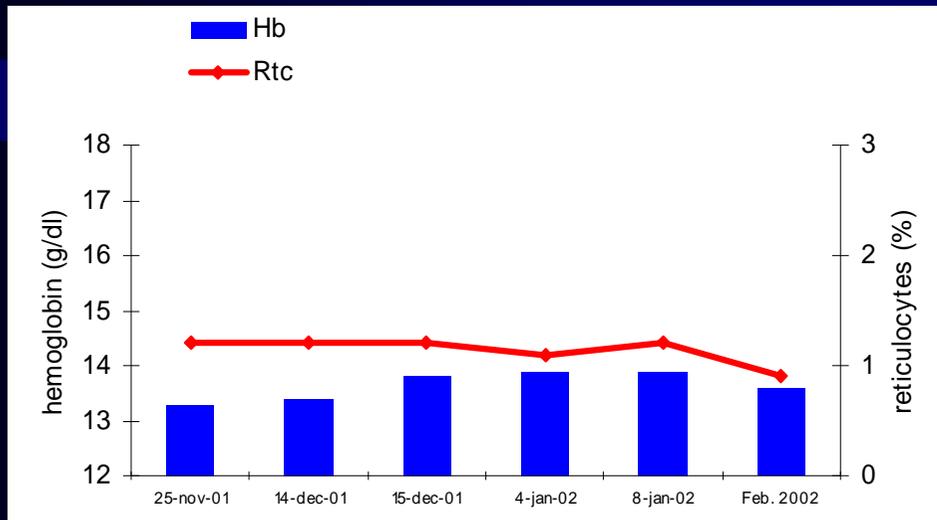
Con le trasfusioni si può incrementare la massa eritrocitaria del 20%

Vantaggi e svantaggi del doping ematico autologo

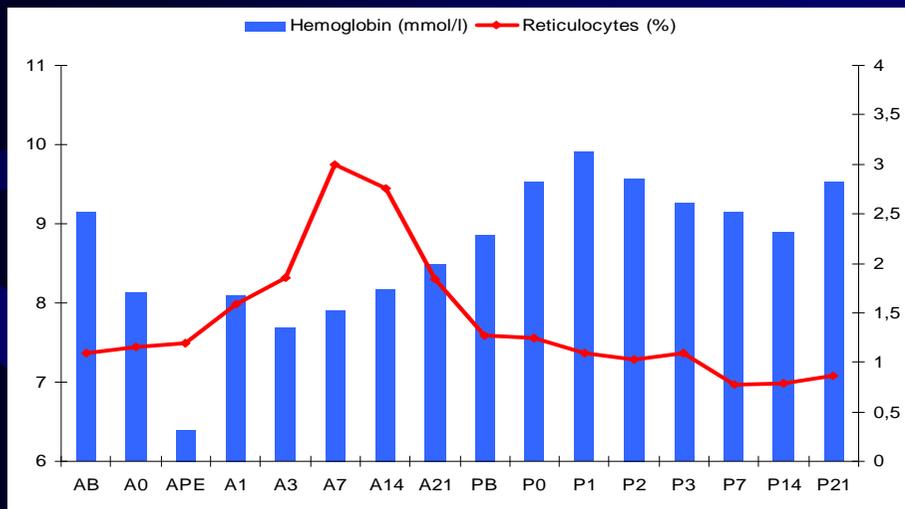
- Vantaggi
 - “Nessun metodo di detenzione”
 - Evitare patologie tipo AIDS ed epatiti
 - Evitare reazioni da sangue non compatibile
- Svantaggi
 - Diminuita performance durante l’allenamento dopo l’estrazione del sangue

Vantaggi e svantaggi del doping ematico omologo

- 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

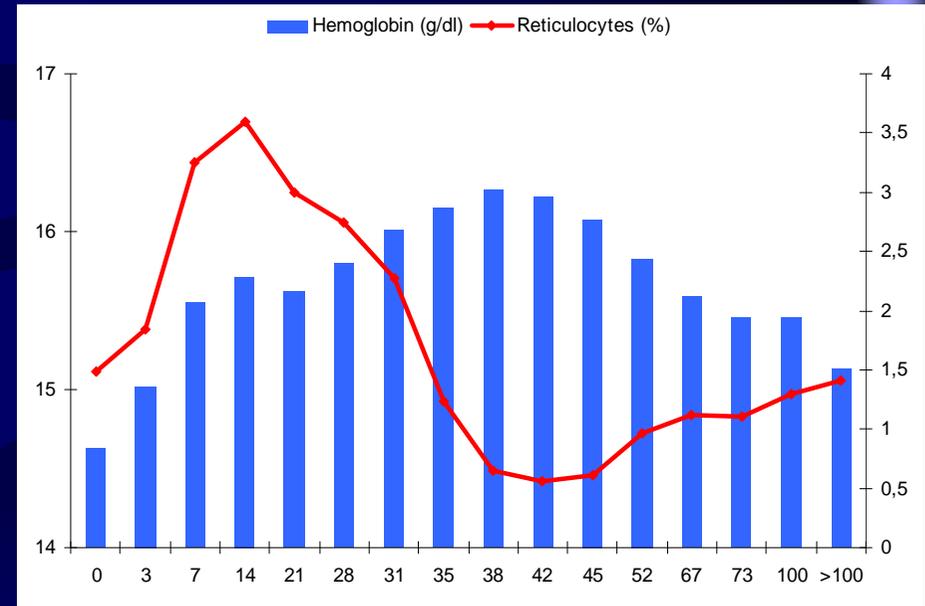


Atleta "pulito"



Doping ematico autologo (~ 1L)

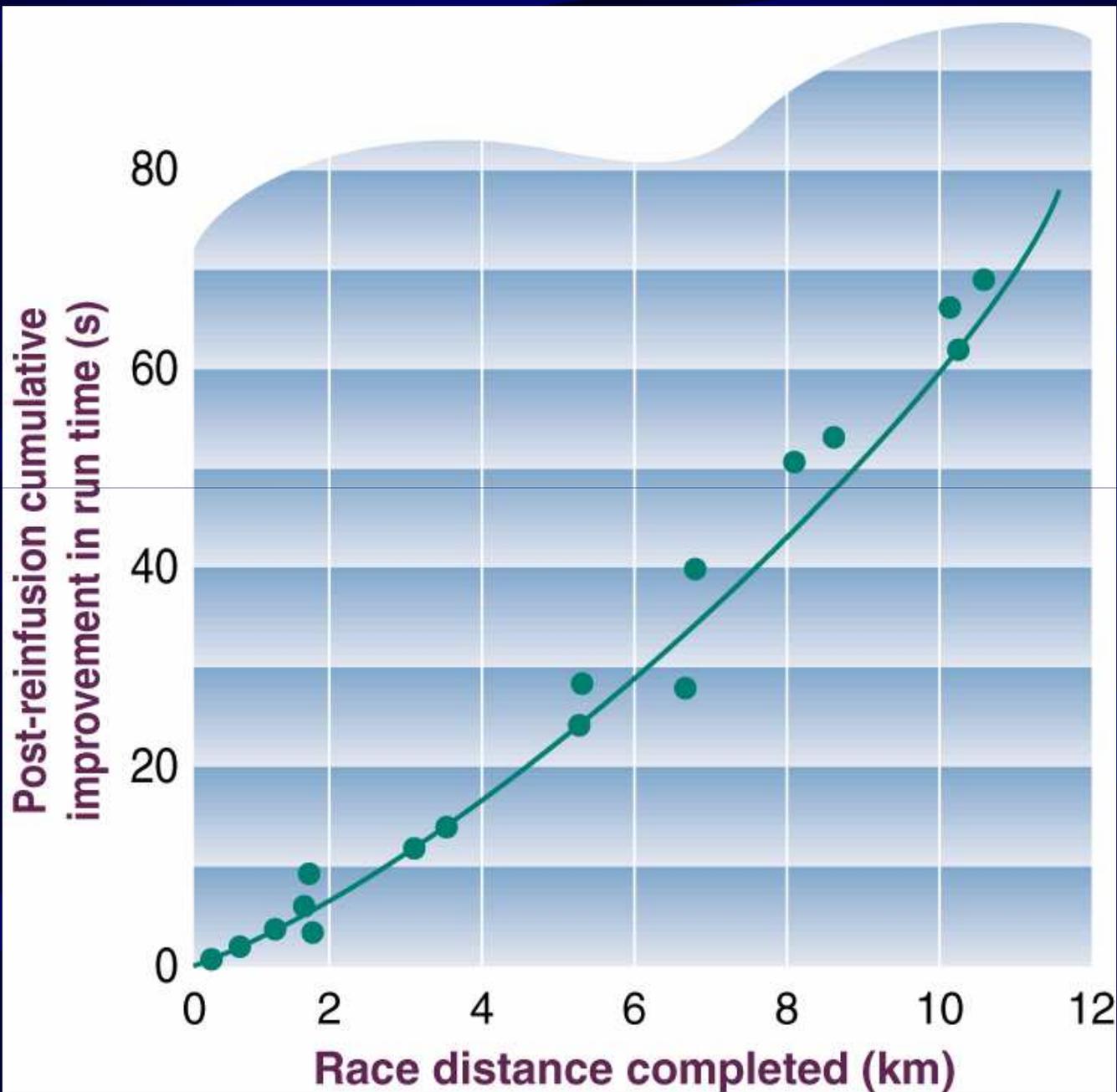
SP Mortensen, et al.. J Physiol. 1st revision



Soggetti trattati con Aranesp®

C. Lundby & R. Damsgaard. Scand J Med Sci Sports 2005

Performance dopo doping ematico



Altre tecniche per aumentare la disponibilità di O₂ nel sangue

I trasportatori di ossigeno come i **perfluorocarburi** (PFC), particelle inerti in forma di emulsioni, possono aumentare la concentrazione o la disponibilità di ossigeno arterioso per i muscoli, senza aumentare la concentrazione di emoglobina e/o il numero dei globuli rossi circolanti. I PFC sono capaci di aumentare la concentrazione di ossigeno disciolto come gas (senza quindi utilizzare l'emoglobina dell'organismo) con effetto praticamente immediato dopo la somministrazione e con successiva rapida eliminazione per via respiratoria. Le controindicazioni e i rischi non sono del tutto conosciuti. Tuttavia sono state registrate le seguenti reazioni avverse:

Incremento temperatura corporea (oltre 40°C)

Diarrea

Tossicità renale, epatica e polmonare

Infezioni ematologiche batteriche con prodotti contaminati

Tromboembolia

Altre tecniche per aumentare la disponibilità di O₂ nel sangue

Le **emoglobine di varia origine** (umana, bovina, prodotta attraverso tecniche di ingegneria genetica) variamente modificate per renderle più stabili e meno tossiche possono essere conservate, a differenza del sangue, per un lungo periodo. Queste emoglobine di sintesi non sono rintracciabili nelle urine, ma sono identificabili esclusivamente nel sangue, purché il prelievo del campione venga effettuato praticamente a ridosso della gara (poche ore prima o poche ore dopo). Si tratta infatti di sostanze che vengono rapidamente eliminate dal circolo sanguigno entro 12-24 ore al massimo.

Modificatori allosterici dell'emoglobina

- Rientrano tra le sostanze dopanti anche quei prodotti che consentono di modificare allostericamente l'emoglobina al fine di aumentare il rilascio di ossigeno della stessa a livello periferico
- Esempio i modificatori allosterici della serie RSR (2-[4-[(3.5 diclofenilcarbomoi)metil]-2-metil-propionato), il 2-3-difosfoglicerato e il metil-acetil-fosfato.