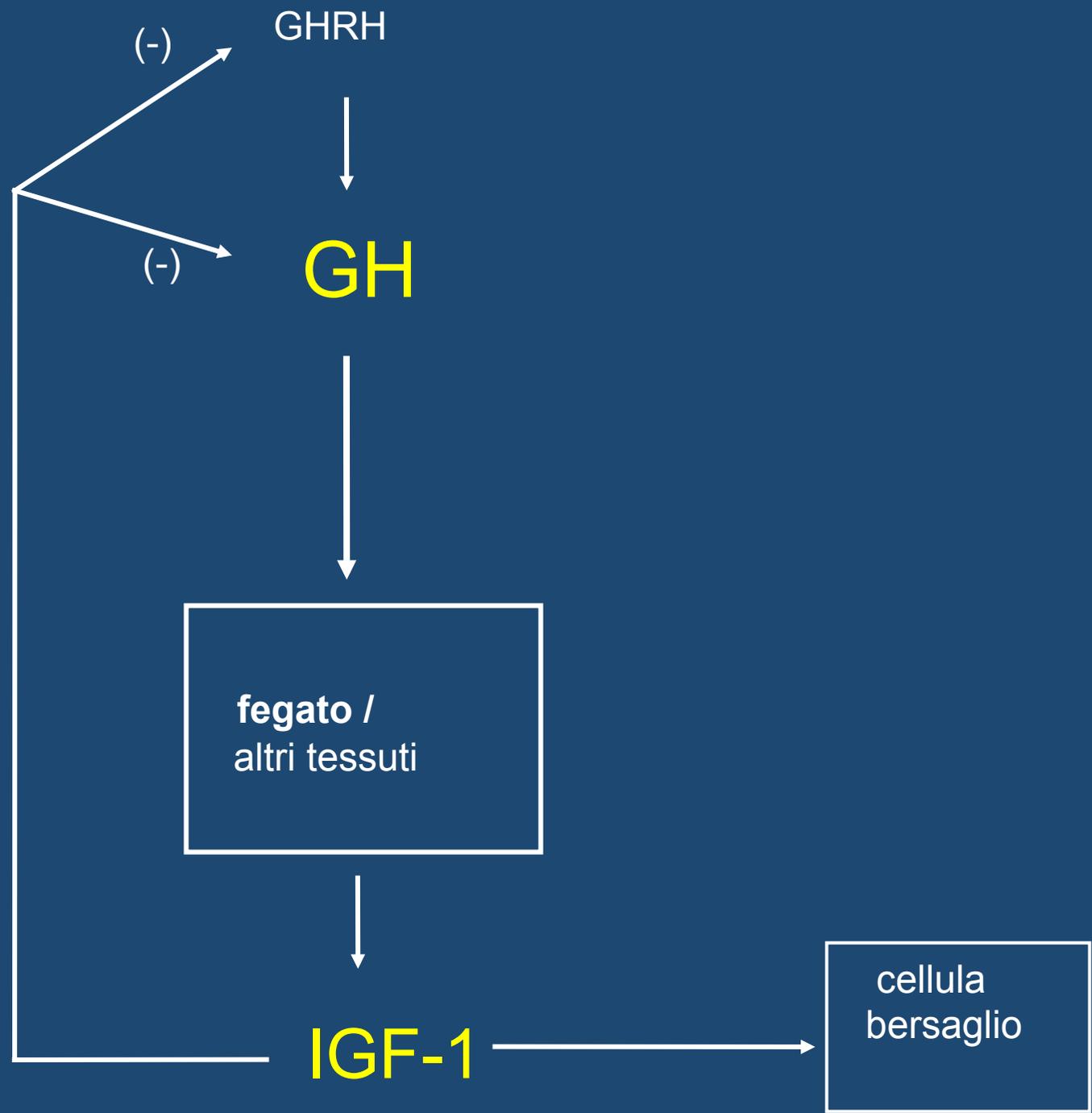




**C. CHIAMULERA**  
**Università degli Studi di Verona**

**Corso di**  
**“Farmacologia”**  
**ORMONE DELLA CRESCITA**  
**E DOPING GENETICO**

**Capitolo 36 Conforti (Sorbona ed.)**



# AZIONI DEL GH SULL'OSSO EPIFISARIO

GH



precondrocita



differenziazione  
cellulare



produzione  
IGF-1



maturazione e  
proliferazione condrociti



## Effetti dell'Ormone della Crescita

- Stimola la crescita di tutti i tessuti del corpo capaci di crescere
- Stimola la produzione di IGF-1 (Insulin-like growth factor) che media molti degli effetti del GH
- Effetti del GH sui processi metabolici:
  - Incrementata sintesi proteica in tutte le cellule
  - Diminuita utilizzazione dei carboidrati da parte delle cellule
  - Aumentata mobilizzazione degli acidi grassi liberi ed utilizzo degli acidi grassi per produrre energia

## EFFETTI GENERALI DEL SISTEMA GH/IGF-I

- Effetti sul metabolismo osseo
  - stimolo condrogenesi
  - stimolo apposizione ossea
  - aumento assorbimento intestinale calcio
  
- Effetti sul metabolismo intermedio
  - aumento sintesi proteica (az. anabolica)
  - aumento lipolisi e chetogenesi
  - aumento gluconeogenesi
  - modulazione azione insulinica
- Stimolo proliferazione cellulare
- Aumento massa magra e riduzione grasso viscerale
- Effetti cardiovascolari
  - aumento contrattilità
  - stimolo ipertrofia miocardica
  - riduzione natriuresi
  
- Modulazione benessere psico-fisico

# Effetti metabolici del GH

## Effetto acuto (<2h)

- azione insulinosimile

## Effetti cronici

- stimolo
- sintesi proteica -
- stimolo gluconeogenesi epatica -
- inibizione utilizzazione periferica del glucosio -
- stimolo lipolisi

# GH ed esercizio fisico

L'esercizio acuto aumenta la secrezione di GH, tanto più precocemente quanto maggiore è la sua intensità

La risposta è proporzionale a intensità e durata dell'esercizio

L'allenamento sembra aumentare la secrezione di GH e la sua risposta all'esercizio acuto, con aumento dell'IGF-1

## Razionale all'uso di GH nello sport

- Stimola la sintesi proteica, incrementa la massa magra. Azione lipolitica: riduce la massa grassa.
- Effetto complessivo di entità pari a quello degli steroidi anabolizzanti con possibile azione additiva e sinergica con steroidi anabolizzanti.

## Effetti di trattamenti con dosi sovrafisiologiche di GH su composizione corporea e apparato muscolare

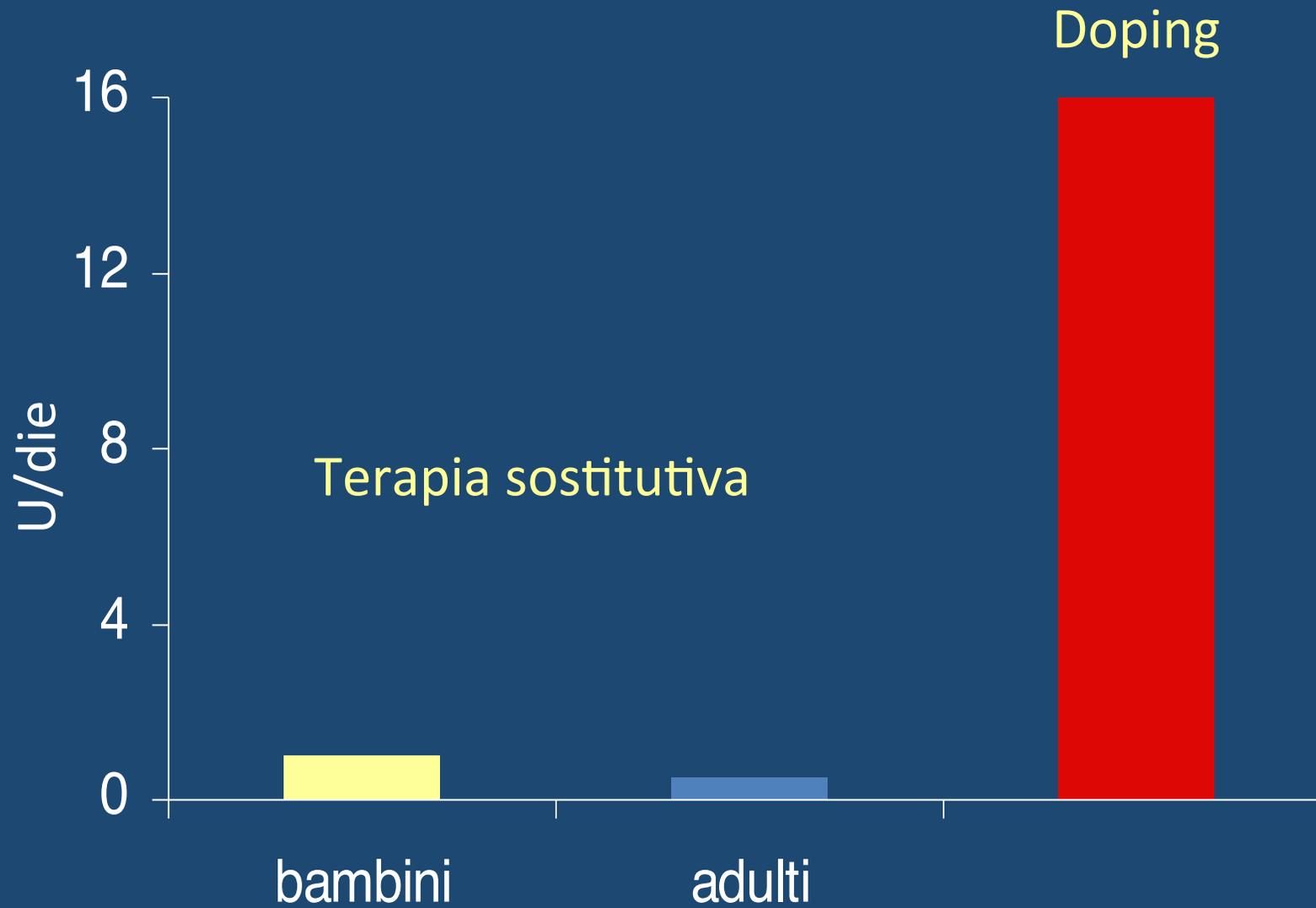
- aumento massa magra e riduzione massa grassa
- aumento tessuto connettivo
- aumento massa muscolare ?
- aumento forza muscolare?

# Fonti di GH esogeno

Sintesi (costo elevato)

Estrazione da cadavere (rischio di malattia di Creutzfeldt-Jacob)

# Posologia media del GH



# Uso di GH nello sport

- L'Underground Steroid handbook" –California- già conteneva le informazioni sul hGH prima che se ne parlasse nella letteratura scientifica. L'uso del GH è iniziato con il GH estrattivo, ancora oggi esistono traffici al mercato nero di **ipofisi umane**.
- L'approvvigionamento di GH umano ricombinante (rhGH) deriva da furti, ricette false, vendita da genitori di bambini affetti da GHD.

# Abuso di GH nei bodybuilders

L'eccesso di GH determina ipertrofia muscolare, facilita la lipolisi.

L'eventuale perdita di efficienza del muscolo è di secondaria importanza in questa categoria di soggetti.

# EFFETTI ACUTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI GH SUL SISTEMA CARDIOVASCOLARE

┌ frequenza (azione diretta?)

┌ output

| resistenze vascolari



**SINDROME IPERCINETICA**

# Effetti avversi di dosi sovrafisiologiche di GH

- ritenzione idrica con edemi
- dolori muscolari e articolari, sindrome del tunnel carpale
- ipersudorazione
- aumento dei valori pressori
- insulinoresistenza con alterazioni della tolleranza ai carboidrati (diabete)
- aumentato rischio cardiovascolare (?)
- aumentato rischio di neoplasie maligne (?)

# Effetti avversi dell'eccesso di IGF-1 (oltre a quelli dell'eccesso di GH)

- Lipodistrofia (in sede di iniezione)
- Ingrossamento milza, reni, linfonodi
- Ipoglicemia

# Rischi associati alla somministrazione di dosi sovrafisiologiche di GH

## ACROMEGALIA

Malattia determinata da ipersecrezione di GH nell'età adulta, caratterizzata da eccessiva crescita ossea e da ispessimento dei tessuti molli, ad andamento insidioso e progressivo, disabilitante, associata ad aumentata mortalità cardiovascolare e neoplastica. Se il quadro si realizza prima della saldatura delle cartilagini epifisarie si ha il gigantismo.

# Il GH effettivamente incrementa le capacità muscolari degli atleti?

Non ci sono dati che dimostrano l'efficacia

Pelissier-Alicot Al., Leonetti G. Am Bio Clin 2003; 61:41-8

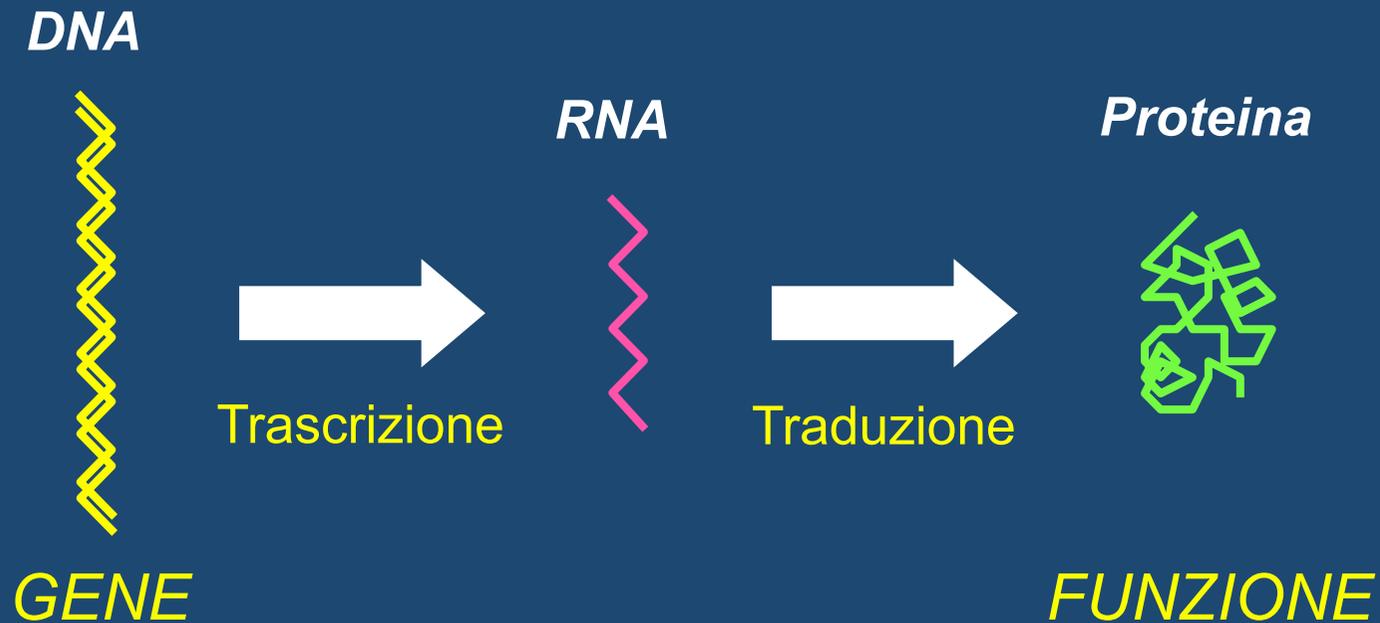
Non ci sono evidenze di aumento della forza muscolare in atleti in allenamento

Dean H. Clin J Sport Med 2002; 12:250-3

# *Il futuro del doping: i geni?*

- **Doping genetico**

- I progressi nell'ambito della genetica con la definizione del genoma umano (circa 30.000 differenti geni) aprono prospettive molto interessanti per il trattamento di diverse patologie
- Il timore è che la manipolazione genetica venga applicata anche per cercare di migliorare la performance sportiva
- Segnali in questo senso sono già emersi. E' già stato inserito nella lista WADA dei metodi proibiti
- Non bisogna credere che la manipolazione genetica delle cellule somatiche sia una pratica esente da rischi



Per Terapia Genica si intende il trasferimento di materiale genetico (DNA o RNA) alle cellule somatiche umane allo scopo di prevenire o trattare patologie.

Il Doping genetico usa le stesse tecniche della Terapia Genica allo scopo di migliorare la prestazione sportiva.

# Ingegneria genetica / tecniche di manipolazione

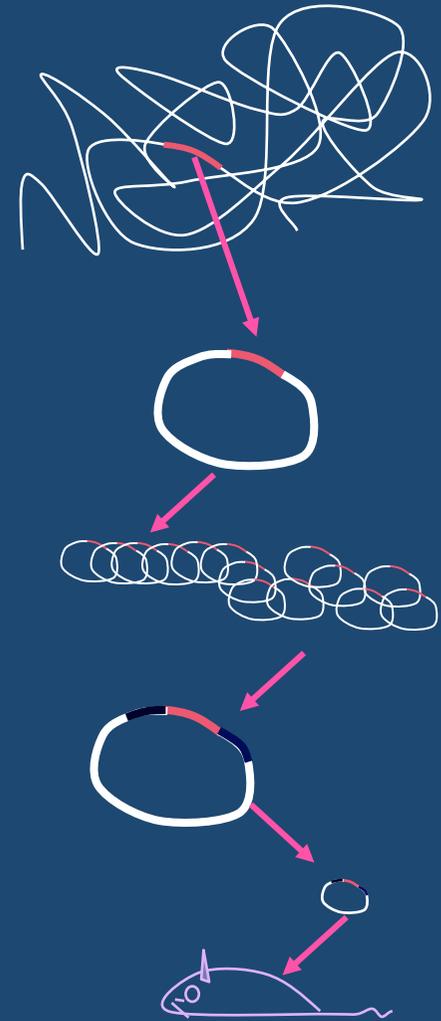
Segmenti specifici di DNA possono essere tagliati e isolati

I segmenti isolati si possono ricombinare con un vettore plasmidico

Il plasmide è trasferito in un batterio dove viene moltiplicato

Il DNA ricombinato può essere ricombinato ulteriormente per ottenere la molecola finale desiderata

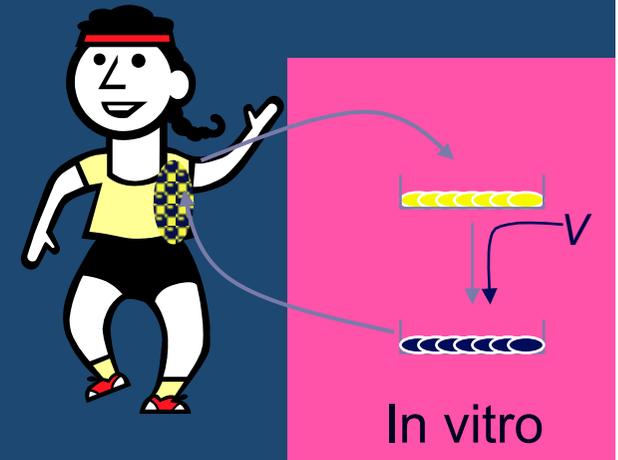
La molecola finale è trasferita nelle cellule o nell'organismo



# Tre diverse modalità di trasferire materiale genetico

## EX-VIVO

*Le cellule target vengono isolate dal soggetto, coltivate, modificate geneticamente in vitro e quindi reimpiantate nello stesso soggetto*



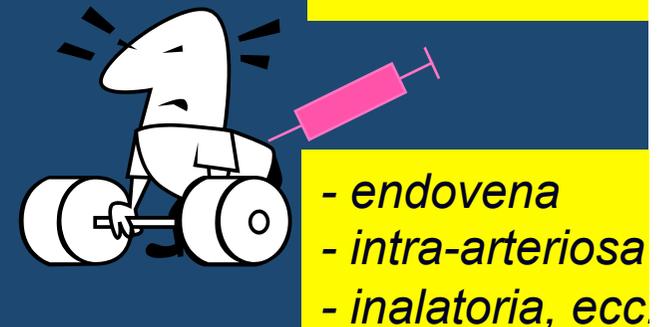
## IN-VIVO topico

*Introdurre dei vettori contenenti materiale genetico in una specifica localizzata sede del corpo*



## IN-VIVO sistemico

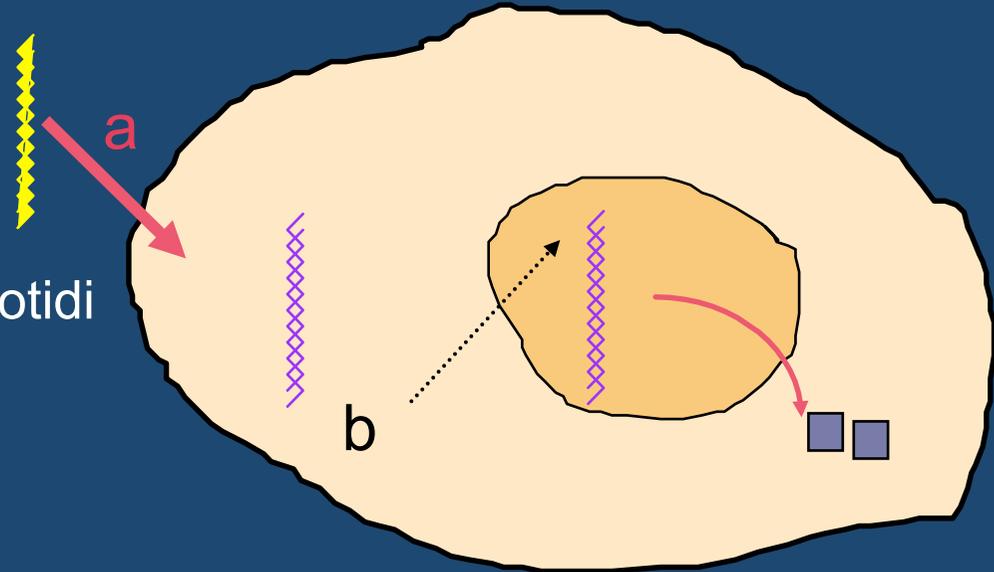
*Introdurre dei vettori contenenti materiale genetico nel sangue*



# Due tipi di vettori per il trasferimento di materiale genetico

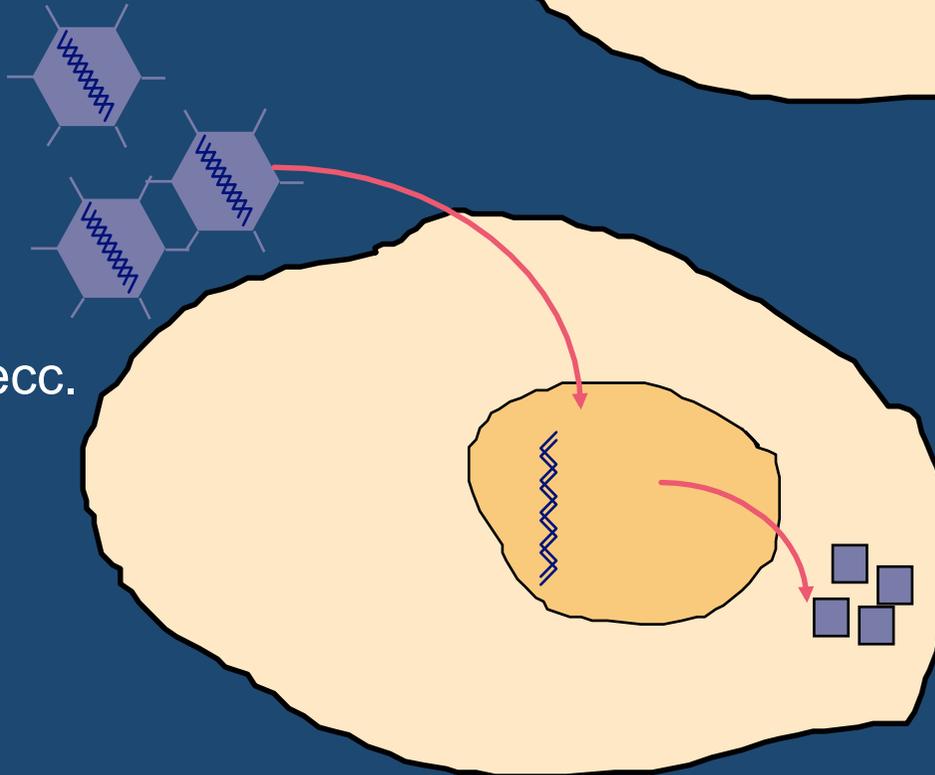
## Trasferimento non-virale (transfettazione)

DNA nudo, liposomomi, oligonucleotidi



## Trasferimento virale (infezione)

Adenovirus, retrovirus, ecc.



## Quali approcci di ingegneria genetica si possono ipotizzare come doping?

- ex vivo, tessuto emopoietico:  
modificare l'emopoiesi (recettore EPO, trasporto O<sub>2</sub>...)
- 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

### ➔ Ormone della crescita umano (hGH)

- Transfettazione 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

## Approcci al doping genetico

- ➔ 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

## Approcci al doping genetico

### ➔ Eritropoietina

- Inserire il 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)

Potremmo diventare tutti come Eero Mäntyranta!!

## Approcci al doping genetico

### ➔ 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)

# Approcci al doping genetico

## ➔ Gene della 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)

# La costruzione del muscolo

Le cellule che “costruiscono” il muscolo sono i mioblasti

I mioblasti si fondono a formare miotubi multinucleati

Dai miotubi si formano le fibre muscolari striate

I mioblasti persistono nell’adulto come cellule satelliti mononucleate

Le risposte plastiche volumetriche del muscolo sono legate a:

- Aumento del contenuto di fibrille contrattili nel citoplasma
- Fusione di altre cellule satelliti con le fibre

# Controllo del differenziamento

Il differenziamento implica il controllo trascrizionale di geni per proteine muscolo-specifiche

Fattori trascrizionali che regolano il differenziamento:

- Myogenin
- MRF4
- Mef2

I fattori trascrizionali di differenziamento si legano a promotori altamente conservati tra specie e geni.

In una prima fase il differenziamento è reversibile

Il differenziamento diventa irreversibile quando i mioblasti si fondono con i miotubi

# Fattori di controllo negativo della proliferazione delle cellule satelliti

TGF- $\beta$  (transforming growth factor): inibisce la fusione in miotubi

Miostatina:

- membro di famiglia TGF; attiva sistema di proteolisi intracellulare
- anticorpi inducono ipertrofia muscolare
- la produzione di miostatina e/o suo recettore è controllata
- è un dei fattori che contribuisce all'atrofia da disuso

Fattori da contatto (presente sulla membrana delle cellule muscolari)

TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor):

- citochina coinvolta in atrofia da sepsi o tumore
- non sembra essere coinvolta nell'atrofia da disuso

## *Esperimenti su topi*

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



T. Hertrampf et al, FIT 1/2004

**Gli inibitori della miostatina sono già in vendita!!!**

**BIOTEST MYOSTAT (BT-Myostat) (80 Capsules)**

**MYOSTATIN – INHIBITOR  
CSP3, Alga: Cystoseira carnariensis**



**Special Offer!**  
**(Inc. V.A.T.) £66.99**  
**Suggested Retail Price:**  
**(Inc. V.A.T.) £84.99**  
**Our Regular Price:**  
**(Inc. V.A.T.) £84.99**



**„... Biotest Myostat Supplement helps promote muscle growth, company claims.“**

## *Approcci al doping genetico*

### ➔ *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 (Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:15603)
- *Risultato: incremento della forza muscolare*
- La NASA sta conducendo esperimenti genetici per prevenire l'atrofia muscolare indotta dai viaggi spaziali (BJ Med Sports 2006; 40:4)

### ➔ *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

## *Nuovi approcci al doping genetico*

- ➔ *Nel 2000 sono stati identificati due nuovi fattori di crescita, espressi dal muscolo, derivati dal gene del IGF-1 per splicing alternativo*
- *Muscle L. IGF-1 simile all'IGF-1 epatico*
- *Mechano Growth Factor (MGF) 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*

## *Nuovi approcci al doping genetico*

- Vi sono anche evidenze che il 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*

# 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