

# *Sviluppo e plasticità del tessuto muscolare*

I muscoli, le vertebre, le coste, i tendini, i vasi originano da progenitori presenti nel mesoderma parassiale che forma i somiti

Il mesoderma si forma per l'azione di fattori sia solubili (es. FGF) che trascrizionali (es Wnt e T-box) che sono spazio-specifici

Da ciascun somite originano specifici muscoli

Migrazione, proliferazione e differenziamento sono regolati da fattori trascrizionali e da fattori extracellulari

Ruolo fondamentale di SF-HGF (scatter factor-hepatocyte growth factor) la cui espressione è sotto controllo di FGF e Shh

# Muscle Regulatory Factors

Gli MRF sono fattori trascrizionali

**MyoD:** Una volta attivo rimane autoregolato  
(permanente)

**Myf5:** precoce e transitorio (regolazione diversa in varie  
parti, vedi figura)

**Myogenin:** tardivo, importante durante il differenziamento

**MRF4:** tardivo, importante durante il  
differenziamento

# 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 della proliferazione dei mioblasti

I mioblasti sono progenitori proliferanti differenziati che esprimono Myf5 e MyoD

Fattori che controllano la proliferazione dei mioblasti: mitogeni, FGF, TGF $\beta$ , IGF, integrine

I mioblasti vengono sottratti al ciclo cellulare per attivazione di myogenin, MRF4, MEF2

# Controllo del differenziamento

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

Fattori trascrizionali che regolano il differenziamento:

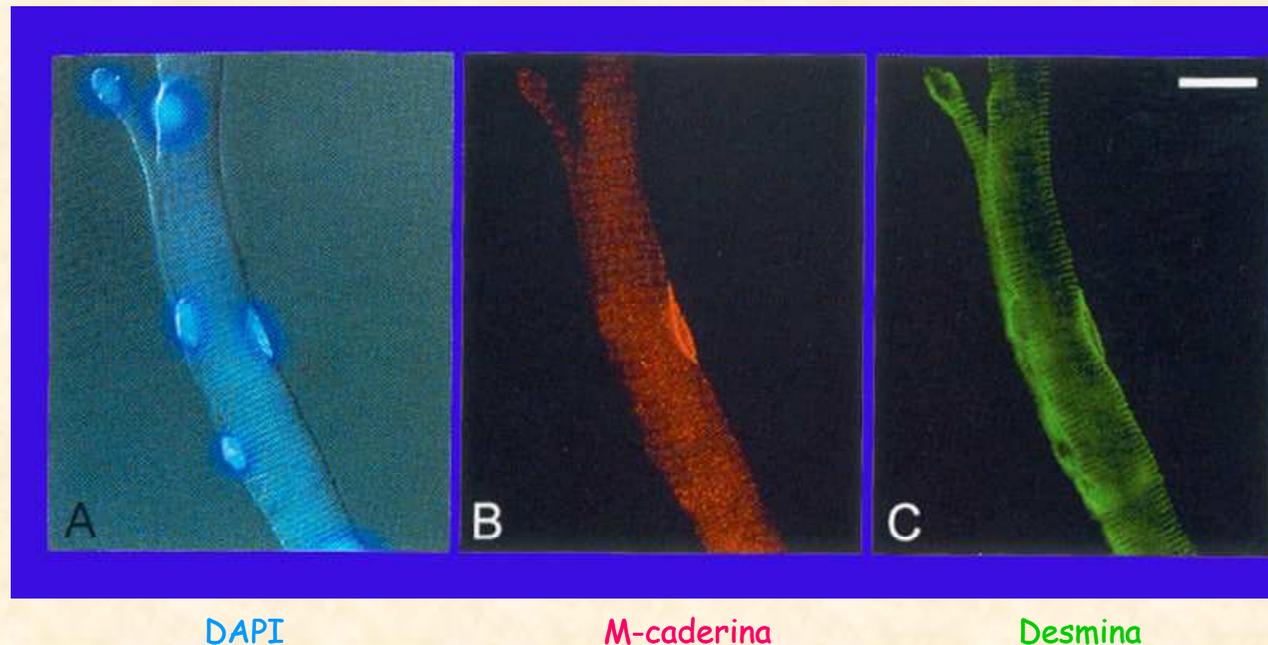
- Myogenin
- MRF4
- Mef2

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

Nel muscolo adulto esiste una quota di cellule capaci di proliferare e di differenziarsi



DAPI

M-caderina

Desmina

Fibra muscolare isolata

in queste si vedono i nuclei che appartengono alla fibra muscolare ad eccezione di uno che in B è colorato in rosso e che appartiene ad una cellula satellite

# Controllo della proliferazione delle cellule satelliti

Il passaggio dalla fase quiescente alla proliferativa richiede fattori di competenza e di progressione

Riposo o G<sub>0</sub> → ingresso in G<sub>1</sub> → progressione a mitosi  
Fattore di competenza                      Fattore di progressione

# Fattori di competenza

## FGF

- legato a proteoglicani della lamina basale, rilasciato dopo lesioni
- L'espressione aumenta dopo lesione, in ipertrofia
- Agisce su cellule satelliti, ma anche su innervazione, vascolarizzazione, fibroplasia

# Fattori di progressione

## IGF

- Due isoforme, dette IGF-I e IGF-II
- IGF-I è il mediatore degli effetti di GH; IGF-II induce proliferazione cellule miogeniche durante lo sviluppo
- E' trasportato via sangue dove è legato a proteine di trasporto;
- Desametazone (Cortisonico) potenzia le risposte da IGF
- Da solo induce differenziamento
- In combinazione con FGF induce proliferazione

# 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 uno 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

# Atrofia da disuso

Connessa ad attivazione di NF- $\kappa$ B (sistema di regolazione trascrizionale inizialmente scoperto nei linfociti B, ma poi identificato in diversi tessuti; consente la conversione di segnali extracellulari in eventi di regolazione dell'espressione genica)

**L'ATROFIA E' UNO SPECIFICO PROGRAMMA  
CELLULARE CHE RICHIEDE ENERGIA ED  
ESPRESSIONE GENICA CONTROLLATA**

# 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

DNA



GENE

RNA



Proteina



FUNZIONE

*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

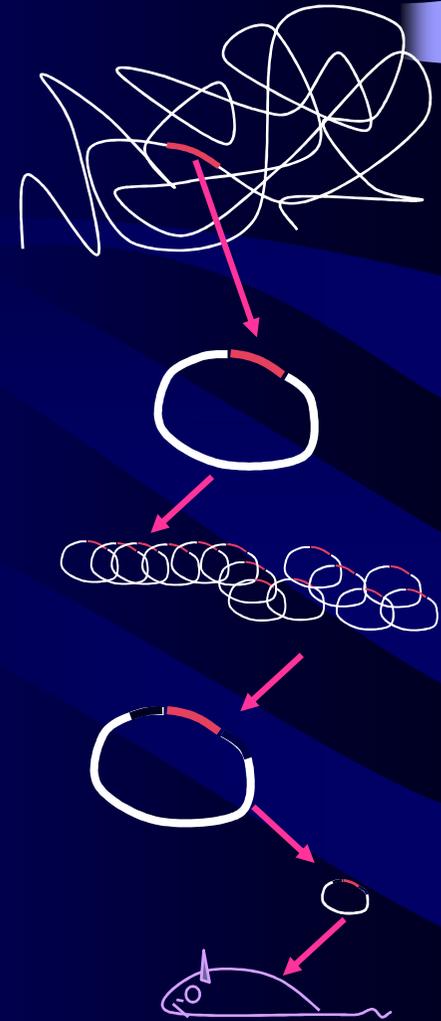
Segmenti specifici di DNA possono essere tagliati e isolati

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

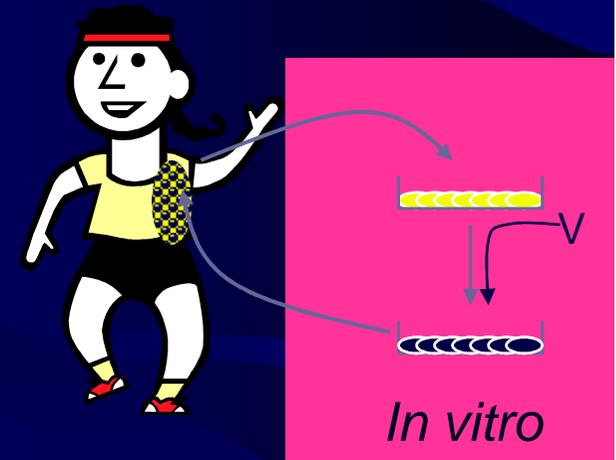
La molecola finale è trasferita nelle cellule o nell'organismo



# 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



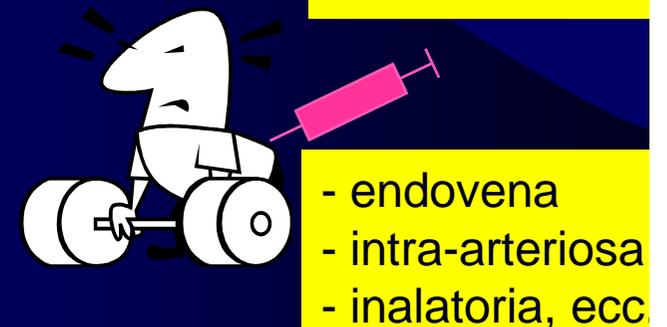
## IN-VIVO topico

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



## IN-VIVO sistemico

Introdurre dei vettori contenenti materiale genetico nel sangue



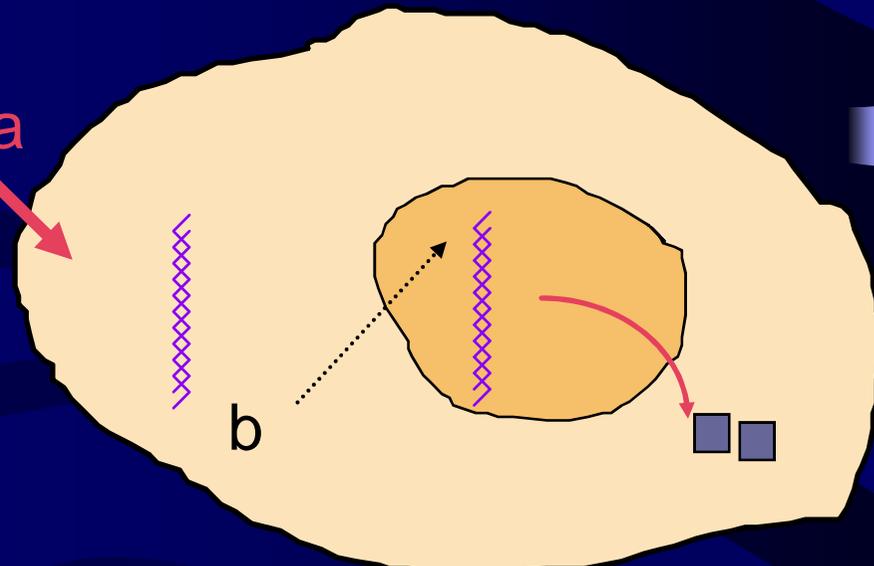
# Due tipi di vettori per il trasferimento di materiale genetico

## Trasferimento non-virale (transfettazione)

DNA nudo, liposomomi, oligonucleotidi

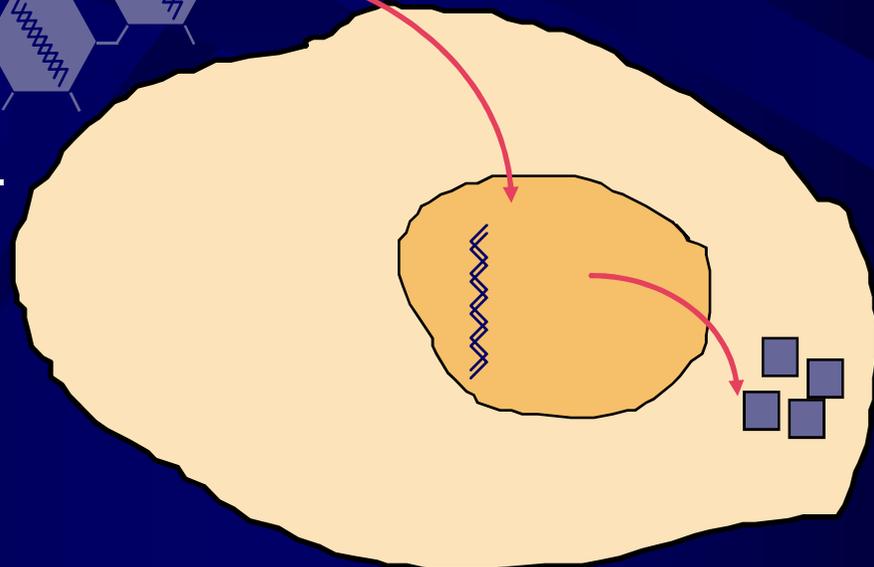
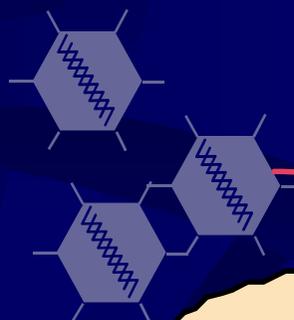


a



## Trasferimento virale (infezione)

Adenovirus, retrovirus, ecc.



## I tre possibili livelli del doping genetico

**Prima della competizione**  
(effetti anabolizzanti)

Manipolazione  
genetica

**Durante la competizione**  
(sostanze che migliorano  
la performance)

Dopo la competizione  
(sostanze di riparo)



# 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)

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

## Esperimenti su topi

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



T. Hertrampf et al, FIT 1/2004

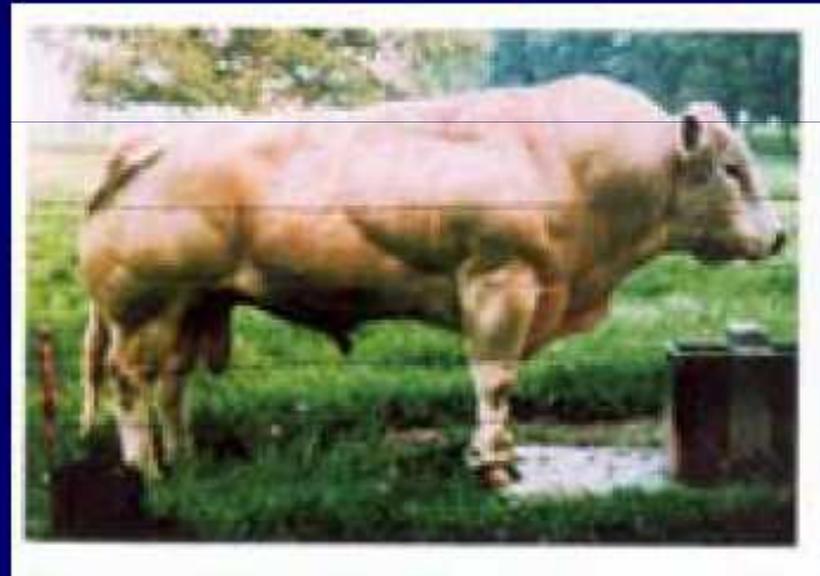
**Gli inibitori della miostatina sono già in vendita!!!**

**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

www.sciam.com

Un gene sintetico, all'interno un vettore, può essere posto in un muscolo. Il vettore trasporterà il gene in un nucleo da dove dirigerà la produzione di una proteina.

Se il gene produce IGF-I o una proteina che blocca la miostatina questo porterà a maggiore proliferazione delle cellule satelliti e quindi all'irrobustimento della fibra muscolare.



## 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

## Record legati alle differenze genetiche tra le popolazioni?

| Distance      | Athlete                  | Time           | Ancestry     |
|---------------|--------------------------|----------------|--------------|
| 100 m         | Asafa Powell (JAM)       | 9.77 s         | West Africa  |
| 110 m hurdles | Colin Jackson (GBR)      | 12.91 s        | West Africa  |
| 200 m         | Michael Johnson (USA)    | 19.32 s        | West Africa  |
| 400 m         | Michael Johnson (USA)    | 43.18 s        | West Africa  |
| 400 m hurdles | Kevin Young (USA)        | 46.78 s        | West Africa  |
| 800 m         | Wilson Kipketer (KEN)    | 1 min 41.11 s  | East Africa  |
| 1000 m        | Noah Ngeny (KEN)         | 2 min 11.96 s  | East Africa  |
| 1500 m        | Hicham El Guerrouj (MOR) | 3 min 26.00 s  | North Africa |
| Mile          | Hicham El Guerrouj (MOR) | 3 min 43.13 s  | North Africa |
| 3000 m        | Daniel Komen (KEN)       | 7 min 20.67 s  | East Africa  |
| 5000 m        | Kenenisa Bekele (ETH)    | 12 min 37.35 s | East Africa  |
| 10000 m       | Kenenisa Bekele (ETH)    | 26 min 20.31 s | East Africa  |
| Marathon      | Paul Tergat (KEN)        | 2 h 4 min 55 s | East Africa  |

Table: Men's world running records

*Gli studi ci dicono che le differenze genetiche sono maggiori tra gli individui che non tra le popolazioni*

Lancet 2005; 366 (suppl 1): S16

# Gli studi genetici per selezionare gli atleti

- I progressi nel campo della genetica aprono la prospettiva di individuare quale corredo genetico è più o meno favorevole per la riuscita in un determinato sport.
- Effettuando uno screening genetico sui bambini si potranno individuare quelli da indirizzare ad una certa attività sportiva, quelli da indirizzare ad un'altra attività sportiva, quelli da "scartare".
- Lo screening genetico potrebbe essere attuato anche ad atleti adulti per selezionare individualizzati e specifici metodi di allenamento.
- Per fortuna non siamo determinati solo dalla sequenza delle basi del nostro DNA.....

Vedi per approfondimento: Rankinen T. et al. Med Sci Sports Exerc 2001; 33:855; Med Sci Sports Exerc 2002; 34:1219