

Il doping genetico: ipotesi surreale o inquietante realtà?

Prof. G. Novelli

Il Doping in ogni sua forma lede i principi del fair play nello sport e implica forti rischi per la salute degli atleti. Bisogna ricordare che l'uomo ha comunque sempre cercato di aumentare le proprie forze in modo artificiale, in tempi antichi si faceva uso di sostanze vegetali contenute in alcune piante o funghi particolari, oggi nuove tecnologie aprono la strada a nuovi metodi illeciti.

Il doping convenzionale si evolve lasciando spazio alle nuove frontiere della scienza per dare luce al Doping Genetico che sfrutta impropriamente le più recenti scoperte della terapia genica, ovviamente non per scopi terapeutici (1).

Il doping consiste nell'impiego di sostanze vietate nella pratica sportiva o durante la fase di allenamento ed è classificato come doping anche il ricorso a metodi illeciti per alterare la prestazione (ad es. doping ematico) o la manipolazione dei campioni utilizzati per il controllo.

La discussione sul doping genetico ha preso avvio nel 2001 quando la Commissione Medica dell'International Olympic Committee ha promosso un incontro sul tema: "La terapia genica ed i suoi impatti futuri nello sport", manifestando preoccupazione per il possibile uso della terapia genica al fine di potenziare le prestazioni degli atleti. Nel 2003 la World Anti-Doping Agency inserisce il Doping Genetico nell'elenco delle sostanze e metodi proibiti, intendendo con tale concetto l'utilizzo non terapeutico di geni, acidi nucleici, sequenze nucleotidiche o la modulazione dell'espressione genica volti ad aumentare la performance atletica. La Terapia Genica, procedimento atto a curare o alleviare una malattia modificando geneticamente le cellule del paziente, potrebbe cioè essere utilizzata per scopi illeciti quali il miglioramento delle prestazioni dell'atleta (Fig. 1).

Doping Genetico.....una tentazione per gli atleti

Gli attuali metodi antidoping si basano sull'identificazione delle sostanze dopanti nel sangue e/o nelle urine, tali mezzi però risultano spesso essere inadeguati per rilevare in maniera efficace l'uso di sostanze illecite. Poter evidenziare casi di doping genetico, in cui la "sostanza" dopante è rappresentata dal gene stesso del tutto indistinguibile dalla sua controparte endogena, è certamente impossibile con i metodi attualmente in uso. Molto spesso i fattori genetici hanno un ruolo nell'attendibilità e nella sensibilità dei metodi antidoping tradizionali, come descritto in un recente articolo in cui si sottolinea l'importanza di polimorfismi genetici nel gene UGT2B17 (2) in test antidoping che misurano i livelli di testosterone escreto nelle urine.

E' evidente, quindi, la necessità di metodi antidoping all'avanguardia che tengano conto sia delle nuove frontiere del doping, sia dell'influenza di fattori genetici (Fig.2).

Sebbene in teoria ogni proteina che influenza la performance fisica potrebbe essere un target del doping genetico alcuni geni/proteine hanno suscitato forte interesse e potrebbero diventare futuri candidati per il doping genetico. Possibili target dell'atleta potrebbero essere i geni dell'ormone della crescita, del fattore di crescita dell'insulina IGF-1, della miostatina, del testosterone o dell'eritropoietina. L'IGF-1, ad esempio, è direttamente connesso all'ipertrofia muscolare: l'allenamento stimola le cellule satelliti, strettamente associate con le fibre muscolari, che hanno un importante ruolo nella crescita e riparazione del tessuto muscolare. Studi recenti hanno dimostrato che il trasferimento mediante vettori virali del gene IGF-1 nel muscolo di topi, induce marcata

ipertrofia (3), se combinato poi con esercizi di resistenza in animali adulti si assiste a un forte incremento della massa e della forza muscolare. Tale aumento è molto più intenso rispetto alla condizione in cui si ha solo il trasferimento del gene o solo l'esercizio fisico (4).

La miostatina, regolatore negativo che inibisce la proliferazione delle cellule satellite nelle fibre muscolari, potrebbe essere un altro possibile target di doping genetico. Bloccare l'attività della miostatina migliora la condizione rigenerativa in pazienti che soffrono di malattie gravi, come ad esempio la distrofia di Duchenne (5), ma altresì potrebbe permettere agli atleti di avere un rapido aumento della massa muscolare (6). Solo recentemente è stata scoperta una mutazione del gene della miostatina in un bambino tedesco che ha sviluppato una straordinaria massa muscolare (7).

Doping genetico e salute dell'atleta

Il problema del doping non riguarda solamente il fair play e l'etica sportiva, ma presenta per l'atleta rischi imprevedibili. In particolare nel caso del doping genetico, tali rischi sono legati sia alla difficoltà di controllare l'espressione del gene inserito, ma anche alle metodiche utilizzate per il trasferimento genico (ad esempio i vettori virali) che possono provocare morbilità, stadi di infiammazione e risposte immunitarie incontrollate (8). Inoltre un' aumentata espressione endogena continuativa di geni proliferativi della cellula e anti-apoptotici, potrebbero incrementare il rischio di sviluppare tumori (9).

Ma la tentazione del doping genetico potrebbe comunque essere attraente e atleti geneticamente modificati potrebbero già esistere, rendendo reale quella che fino a poco tempo fa poteva essere considerata soltanto un'ipotesi. Le recenti Olimpiadi di Pechino 2008 hanno evidenziato su più di 4000 controlli effettuati 6 casi di positività, mentre il CIO ne aveva previsti almeno 40; sono inoltre state caratterizzate da una serie di record a ripetizione oltre che da una vera e propria rivoluzione dell'età dell'atleta, vedendo gli atleti più "anziani" ottenere prestazioni rilevanti. Queste considerazioni hanno lasciato spazio al dubbio di un doping genetico anche in considerazione che gli attuali metodi di rilevamento risultano del tutto inefficaci nell'individuare i "geni doping" che sono indistinguibili da quelli endogeni. Si potrebbe quindi pensare non tanto ad una sorta di redenzione degli atleti dall'uso del doping, ma piuttosto ad una sottostima degli atleti che hanno fatto uso di doping proprio perché il doping genetico potrebbe non essere stato rilevato.

In altre parole il "vantaggio" del doping genetico potrebbe proprio essere quello di non essere ad oggi rilevabile.

Metodi ANTI-doping genetico: nuove prospettive

Sulla base di queste considerazioni è pressante la necessità di nuove metodologie che permettano di svelare i nuovi sistemi di doping non convenzionali e che tengano conto dell'influenza dei fattori genetici.

Il corpo umano utilizza differenti meccanismi di adattamento all'attività fisica e la maggior parte di questi sono mediati da cambiamenti nell'espressione genica. Proprio per questo si è pensato di creare dei metodi che disegnino una sorta di molecular profiling dell'atleta caratterizzata da analisi del trascrittoma, da proteomica e metabonomica. Identificare i cambiamenti dei livelli di espressione, dei livelli delle proteine e dei livelli dei metaboliti nel sangue e nelle urine è di estrema importanza per stabilire dei livelli range di soglia su cui impostare nuovi metodi antidoping basati proprio sull'analisi del trascrittoma (Fig.3). La maggior parte degli studi effettuati per capire i cambiamenti del trascrittoma in conseguenza all'attività sportiva sono stati eseguiti su biopsie muscolari, tale metodo presenta però diversi limiti tra i quali l'invasività della tecnica ed il fatto che

l'area della microbiopsia non può essere indicativa di tutto il muscolo (10). Solo di recente le differenze di espressione genica sono state esaminate utilizzando le cellule polimorfonucleate (PBMC) del sangue, identificato come tessuto sentinella in grado di essere sensore di cambiamenti esterni quali la stessa attività fisica e/o l'assunzione di sostanze anche per doping (11). Valutare la risposta genomica all'attività fisica sulle cellule del sangue permette di avere a disposizione un campione facilmente accessibile senza ricorrere alle biopsie muscolari che risultano invasive e quindi difficilmente accettate dalla comunità sportiva per eventuali controlli antidoping.

Nuovi obiettivi sono perciò quelli di individuare più sottili strumenti in grado di evidenziare nuovi sistemi utilizzati nell'uso delle sostanze vietate per doping e la genetica diventa sempre più importante nell'evoluzione di metodi antidoping in grado di rilevare il doping genetico.

La ricerca, svolta nei laboratori di Genetica Medica e Patologia Generale della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Roma Tor Vergata, ci ha portato a dimostrare che i geni del metabolismo degli androgeni e dell'insulina mostrano livelli di espressione individuabili e quantificabili nel sangue, primo passo fondamentale per poter utilizzare il sangue come campione di riferimento per valutare modificazioni dell'espressione genica. A tale proposito abbiamo sviluppato un oligoarray low density (Androchip2) composto di 190 geni selezionati sulla base del loro ruolo nel metabolismo e nella biosintesi degli androgeni e dell'insulina, geni che possono essere influenzati da una eventuale assunzione di steroidi anabolizzanti (Fig.4).

Questi geni sono stati suddivisi in differenti classi: geni che regolano il metabolismo degli androgeni, recettore degli androgeni e coregolatori dell'AR come ad esempio ARA70, geni la cui espressione è androgeno-regolata e geni che hanno un ruolo nei pathway dell'insulina.

L'analisi del profilo di espressione di questi geni ha fornito importanti informazioni non solo su come si possano modificare i loro livelli di espressione nel sangue ma ha fornito anche le basi per la messa a punto di metodi all'avanguardia per l'identificazione di casi di doping da anabolizzanti. Il nostro studio è stato condotto su atleti agonisti e amatoriali e su soggetti di controllo che non praticano attività sportiva ed ha permesso di dimostrare che tutti i geni fissati sull'AndroChip2 mostrano livelli di espressione identificabili e misurabili nelle cellule linfocitarie del sangue (Fig.5).

Questo rappresenta un importante risultato: l'espressione nel sangue dei geni del metabolismo degli androgeni e dell'insulina presenti sull'Androchip2 permette di affermare che questo tessuto e le tecniche di analisi del profilo trascrizionale possano venire utilizzati come nuovi strumenti per l'antidoping da steroidi ed anche per il doping genetico.

I risultati ottenuti con la tecnica del microarray sono stati confermati da ulteriori esperimenti eseguiti selezionando un pannello di 19 geni (rappresentativi del 10% dei geni totali dell'Androchip2) ed effettuando delle qRT-PCR sui PBMC dei soggetti facenti parte della ricerca (atleti agonisti e amatoriali e controlli sedentari). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti sia sui pools di linfociti già utilizzati per gli esperimenti di microarray che su altri 30 soggetti esterni ai pools (10 agonisti, 10 amatoriali e 10 controlli). I risultati ottenuti hanno dimostrato che nessuno dei geni esaminati mostra valori significativamente differenti nei tre gruppi testati, permettendo quindi di affermare che non si osservano differenze di espressione nei geni analizzati in relazione alla differente attività sportiva. L'indipendenza dall'attività fisica dei profili trascrizionali dei geni analizzati sottolinea quindi la possibilità di utilizzare l'Androchip2 e l'analisi del profilo di espressione dei geni del metabolismo degli androgeni e dell'insulina come strumento innovativo per identificare casi di doping da steroidi anabolizzanti (Fig.6).

Sulla base dei risultati ottenuti abbiamo voluto sperimentare la validità del nostro metodo in relazione all'assunzione di steroidi nell'ipotesi di rilevare variazioni nell'espressione genica, a tal fine abbiamo esteso il nostro studio a soggetti ipogonadici in trattamento con testosterone; in considerazione, infatti, delle difficoltà di reperire volontari sani che si sottoponevano al trattamento abbiamo utilizzato una condizione in grado di mimare quella di un possibile doping da steroidi anabolizzanti.

Sono stati selezionati ad oggi 7 pazienti affetti da ipogonadismo ancora non sottoposti a trattamento farmacologico con testosterone (controlli) e 8 pazienti ipogonadici trattati con testosterone, ciascuno dei soggetti è stato sottoposto a prelievo di sangue periferico da cui sono stati estratti i linfociti. L'analisi di espressione genica, eseguita sulle PBMC dei soggetti in trattamento e dei controlli, è stata eseguita utilizzando lo stesso pannello di 19 geni già testato negli esperimenti precedenti e che non aveva mostrato alterazione nei livelli di espressione in relazione all'attività sportiva.

I risultati preliminari ottenuti negli esperimenti eseguiti sui soggetti trattati con testosterone e sui relativi controlli hanno mostrato geni diversamente espressi, permettendo di ipotizzare che siano questi geni target la cui espressione è sensibile all'assunzione di doping da steroidi anabolizzanti e possano quindi essere considerati biomarcatori in grado di evidenziare la possibile assunzione di sostanze utilizzate per doping (Fig. 7).

L'interazione tra sport e genetica è ormai evidente e sempre più inevitabile. Recenti studi hanno evidenziato l'associazione di polimorfismi genetici con una differente performance atletica. Il gene studiato è l'ACNT3 la cui variante R o X è stata associata agli scattisti o a maratoneti rispettivamente (12). Sembrerebbe quindi apparentemente possibile individuare i geni che determinano la predisposizione genetica di un soggetto per un particolare sport e speculare su ricerche di questo tipo diventa facile nella società di oggi. Negli USA è stato messo in commercio, al costo di pochi dollari, il test ATLAS (*Athletic Talent Laboratory Analysis System*) che permette di determinare le variazioni genetiche di ACNT3 e di "predire" un futuro campione, fornendo un attestato di "vantaggio genetico" all'attività sportiva. Si apre così uno scenario inquietante: la possibilità per chi possiede il gene «sbagliato» di farsi iniettare quello «giusto» e l'identificazione di atleti che verrebbero esclusi a priori da un certo tipo di attività sportiva per mancanza di geni adatti. Inoltre la delusione per chi si avvicina con forti speranze a questi test è certa: la performance atletica è, infatti, qualcosa di molto più complesso, e non è di certo determinata dall'azione di un singolo gene ma dall'azione sinergica e della interazione di molti geni che cooperano insieme ad allenamento, nutrizione e fattori ambientali per "creare" un campione.

Sembra paradossale pensare che la genetica si trovi oggi di fronte al problema di inventare nuove metodiche sempre più all'avanguardia per sconfiggere qualcosa che deriva dai suoi stessi progressi creati in realtà per curare le malattie.

Eppure il doping genetico esiste e "gli atleti geneticamente modificati, per quanto ne sappiamo, potrebbero già esistere" come afferma Theodore Friedmann eminente studioso dell'Università di San Diego (13). I rischi per la salute degli atleti sono reali e la genetica cerca nuove frontiere per salvaguardare lo sport e lo spirito sportivo che rappresenta la celebrazione dello spirito umano, del corpo e della mente.

Acknowledgement

Il progetto "Messa a punto di un nuovo metodo di identificazione di biomarcatori molecolari utili ad evidenziare casi di doping da steroidi anabolizzanti" è stato finanziato dal Ministero della Salute,

Commissione per la vigilanza ed il controllo sul doping e per la tutela della salute nelle attività sportive, anno 2006.

Bibliografia

- 1) Baoutina A, Alexander IE, Rasko JE, Emslie KR. Potential use of gene transfer in athletic performance enhancement. *Mol Ther*. 2007 Oct;15(10):1751-66. Epub 2007 Aug 7.
- 2) Schulze JJ, Lundmark J, Garle M, Skilving I, Ekström L, Rane A. Doping test results dependent on genotype of uridine diphospho-glucuronosyl transferase 2B17, the major enzyme for testosterone glucuronidation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Jul;93(7):2500-6. Epub 2008 Mar 11.
- 3) Musarò A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL, Rosenthal N. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*. 2001 Feb;27(2):195-200.
- 4) Lee S, Barton ER, Sweeney HL, Farrar RP. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol*. 2004 Mar;96(3):1097-104
- 5) Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittmore LA, Ahima RS, Khurana TS. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*. 2002 Nov 28;420(6914):418-21.
- 6) Joulia-Ekaza D, Cabello G. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Curr Opin Pharmacol*. 2007 Jun;7(3):310-5.
- 7) Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*. 2004 Jun 24;350(26):2682-8.
- 8) Wells DJ. Gene doping: the hype and the reality. *Br J Pharmacol*. 2008 Jun;154(3):623-31.
- 9) Perry JK, Emerald BS, Mertani HC, Lobie PE. The oncogenic potential of growth hormone. *Growth Horm IGF Res*. 2006 Oct-Dec;16(5-6):277-89. Epub 2006 Nov 13. Review.
- 10) Guescini M, Fatone C, Stocchi L, Guidi C, Potenza L, Ditroilo M, Ranchelli A, Di Loreto C, Sisti D, De Feo P, Stocchi V. Nutr Metab Cardiovasc Dis. Fine needle aspiration coupled with real-time PCR: a painless methodology to study adaptive functional changes in skeletal muscle. 2007 Jun;17(5):383-93.
- 11) Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med*. 2006 Mar;147(3):126-32.

12) Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, Hahn AG, Beggs AH, Eastal S, North K. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. Am J Hum Genet. 2003 Sep;73(3):627-31. Epub 2003 Jul 23.

13) Friedmann T, Rabin O, Frankel MS. Ethics. Gene doping and sport. Science. 2010 Feb 5;327(5966):647-8.

FIGURE

Fig.1- Nuove frontiere del doping:l'utilizzo improprio di tecniche di terapia genica.



Fig.2. - Attuali metodi antidoping.

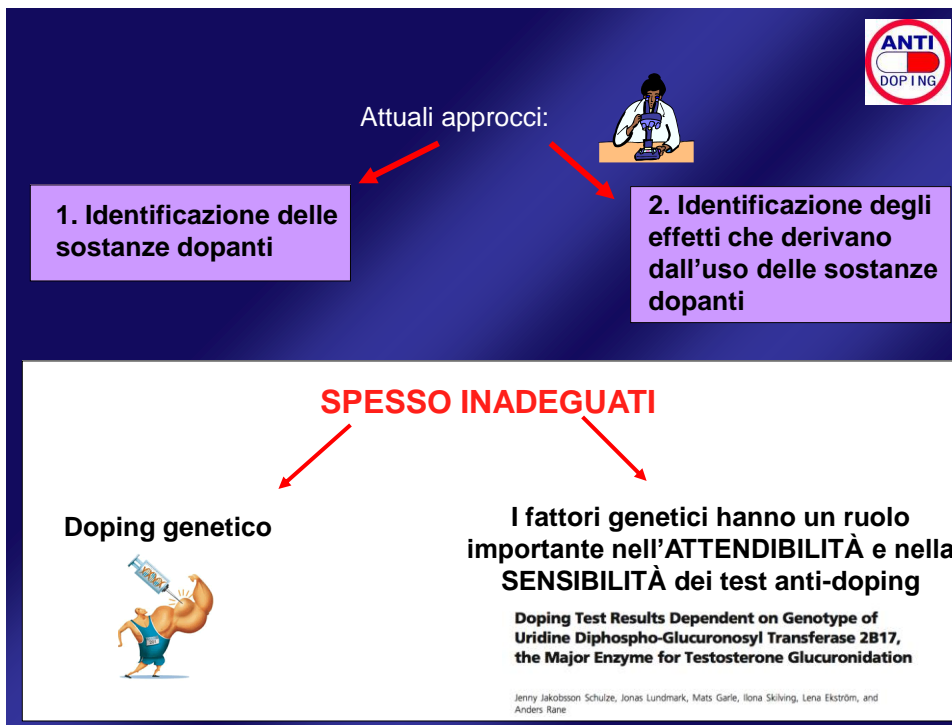


Fig.3 – Molecular profiling dell'atleta alla base di nuovi metodi antidoping.

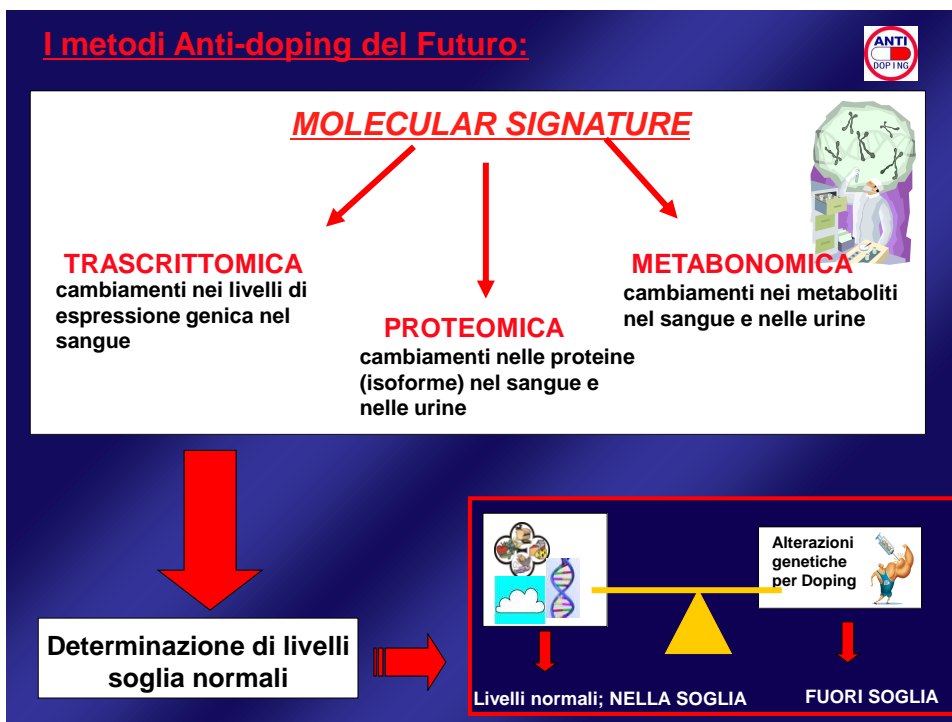


Fig.4- Studio dell'espressione genica in PBMC per l'identificazione di doping da steroidi.

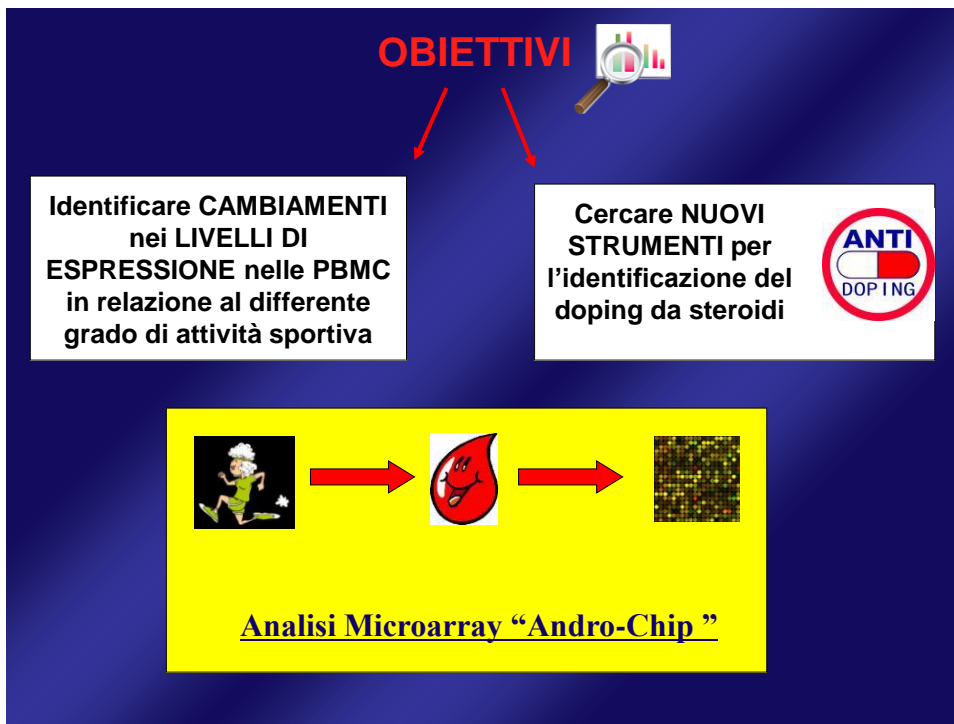


Fig.5 – Il sangue campione facilmente accessibile per l'identificazione di nuovi biomarcatori molecolari.



Fig. 6 - “Gene expression signature” dei geni degli androgeni e dell’insulina nelle cellule del sangue di atleti.

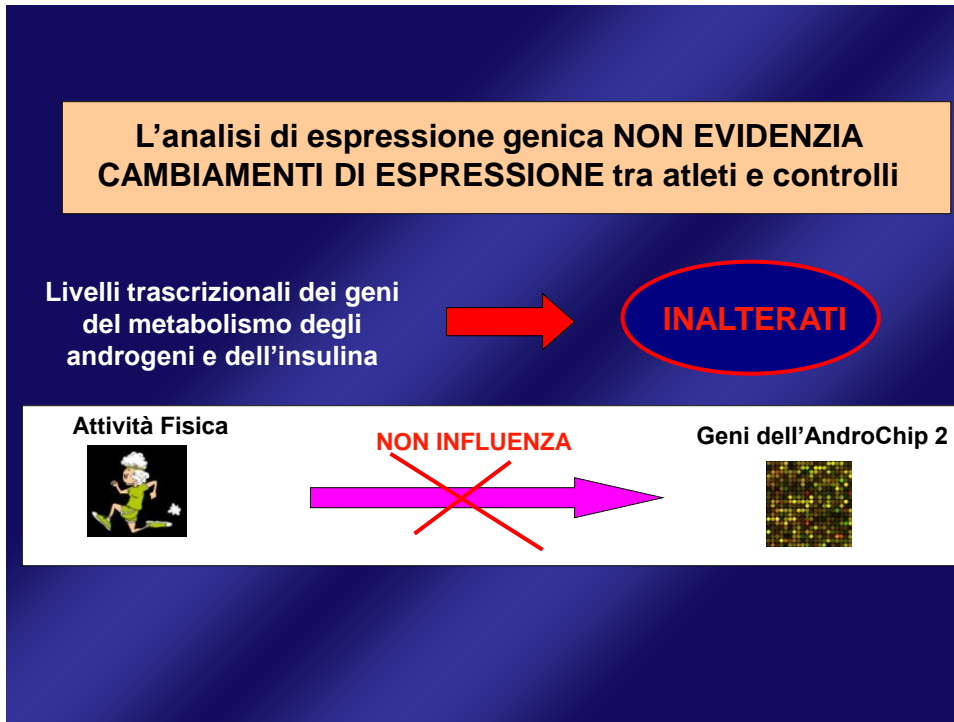


Fig.7 – Possibili biomarcatori per l’identificazione di casi di doping da steroidi anabolizzanti.

