

## EPO e doping ematico

L'Eritropoietina, o dei trasportatori dell'ossigeno in genere, oltre alla pratica dell'emotrasfusione rappresentano frequenti mezzi di doping ematico, usati prevalentemente nelle specialità sportive di resistenza come il ciclismo, lo sci di fondo, il triathlon, la pallanuoto e così via, allo scopo di migliorare la performance fisica dell'atleta e quindi l'esito della gara.

Tutti questi mezzi, infatti, fondamentalmente incidono sui meccanismi di trasporto e di cessione dell'ossigeno ai tessuti impegnati nel lavoro muscolare, aumentandone così la disponibilità durante lo sforzo fisico. In questo modo favoriscono l'utilizzo di acidi grassi e diminuiscono la formazione di acido lattico.

Purtroppo, nonostante la forte repressione, sia da parte della Magistratura sportiva che di quella ordinaria, queste pratiche sono significativamente presente fra gli sportivi, in particolare a livello agonistico, ignorando i pesanti effetti tossici che inducono, con conseguenze morbose sia immediate che a lungo termine, provocando danni irreversibili all'organismo (Fig. 1).

L'eritropoietina, chiamata brevemente Epo, è un ormone glicoproteico inserito nella classe E della lista delle sostanze vietate e dei metodi proibiti, riguardante gli ormoni peptidici, le sostanze ad azione mimetica ed analoghi (Fig. 2).

Essa è prodotta principalmente dal rene ed in minima parte dal fegato, in risposta a variazioni della concentrazione di ossigeno nel sangue.

Appartiene ai fattori di crescita emopoietici, che stimolano l'eritropiesi, regolano cioè la proliferazione ed il differenziamento delle cellule progenitrici presenti nel midollo osseo. Una volta sintetizzata, essa viene immessa rapidamente nel circolo ematico dove si distribuisce, per poi raggiungere il midollo osseo. A questo punto, si lega ed interagisce con specifici recettori espressi sulle cellule progenitrici staminali, le Colonie Formanti le Unità Eritroblastiche, che formano gli eritroblasti da cui derivano gli eritrociti o globuli rossi.

Questi recettori sono del tipo tirosinchinasico, tipico di certi ormoni e fattori di crescita.

L'attivazione della componente interna, tirosinchinasica, del recettore induce la trascrizione dei geni coinvolti nei processi di crescita e differenziazione cellulare, determinando così una maggiore produzione di eritrociti maturi.

L'eritropoietina endogena, fisiologica, viene prodotta nel rene in risposta ad ipossia tissutale. Maggiore è l'ipossia, maggiore eritropoietina sarà prodotta dal rene e quindi maggiore sarà la produzione di eritrociti dal midollo osseo.

Fisiologicamente esiste una correlazione inversa fra l'ematocrito o i livelli di emoglobina, e quelli di eritropoietina nel sangue.

L'ematocrito è la frazione volumetrica occupata dai globuli rossi nel sangue. E' un indice della quantità dei globuli rossi.

Normalmente la massa dei globuli rossi è il 45% della massa sanguigna e le sue modificazioni, dovute per esempio ad esposizioni in ambienti con variazioni di ossigeno, sono fisiologicamente molto lente (Fig. 3).

La funzione principale dei globuli rossi è quella di captare l'ossigeno che entra nei polmoni attraverso l'inspirazione e trasportarlo ai vari tessuti, attraverso il sangue arterioso.

L'emoglobina è la proteina presente nei globuli rossi, responsabile del trasporto dell'ossigeno dai polmoni ai tessuti, poiché, grazie alla sua struttura, è in grado di formare legami reversibili con l'ossigeno.

Essa è costituita da un nucleo ferro-porfirinic chiamato eme, combinato con catene della proteina globina.

Una volta arrivato ai tessuti, l'ossigeno verrà consumato durante le varie fasi dei processi metabolici cellulari, che produrranno conseguentemente un aumento della concentrazione di anidride carbonica. Quest'ultima, quindi, si legherà all'emoglobina dei globuli rossi, che attraverso la circolazione venosa torneranno a livello polmonare, dove, attraverso l'espiazione, l'anidride carbonica sarà eliminata. Così l'emoglobina sarà di nuovo libera di legare molecole di ossigeno (Fig. 4).

L'eritropoietina viene utilizzata, nella pratica clinica, come terapia di gravi forme di anemie o di varie malattie primitive del midollo osseo.

Essa è stata di fatto il primo fattore ematopoietico umano ad essere isolato ed è stata ottenuta inizialmente dalla purificazione dell'urina di pazienti affetti da anemia.

Dopo somministrazione per via endovenosa, l'eritropoietina ha un'emivita di 4-13 ore, anche se la sua concentrazione plasmatica rimane significativamente elevata per 48 ore. Oggi, la forma di eritropoietina più usata è quella sintetica, o meglio Eritropoietina ricombinante umana. Essa è prodotta in oociti di cavia, mediante la tecnica del DNA ricombinante, cioè attraverso una manipolazione del gene dell'eritropoietina umana. La somministrazione dell'Epo sintetica è per via sottocutanea ed il meccanismo di stimolazione a livello del midollo osseo, è per gran parte analogo a quello dell'eritropoietina naturale.

Quest'ultima è in grado di favorire l'attivazione di un processo apoptotico, cioè di morte programmata, sulle cellule progenitrici, selezionando quelle "buone" e consentendo così solo a queste di passare attraverso diverse vie di maturazione per diventare eritrociti. Al contrario, l'eritropoietina sintetica, per un'attività anti-apoptotica, non ha la capacità di effettuare questa selezione e questo comporta che tutte le cellule progenitrici, anche quelle imperfette, passino alla maturazione in globuli rossi.

Infine, recentemente è stata sintetizzata una nuova molecola, più efficace dell'eritropoietina sintetica, nello stimolare l'eritropoiesi, la Darbepoietina, chiamata più semplicemente con la sigla NESP (novel erithropoiesis stimulating protein).

Essa è stata ottenuta modificando l'EPO con tecniche di ingegneria genetica ed ha una maggiore durata d'effetto, consentendo così un numero ridotto di somministrazioni (Fig. 5)

Gli effetti collaterali più frequenti dell'eritropoietina esogena sono prevalentemente legati all'aumento troppo rapido dell'ematocrito e dei livelli di emoglobina.

Co-fattori importanti, inoltre, sono i dosaggi molto alti ed il tempo di trattamento protratto dell'EPO, come quelli dei protocolli attuati nel doping.

Tutto questo comporta una forte tendenza alla formazioni di trombi. Essi possono essere dovuti sia all'ematocrito notevolmente aumentato, che ad un'azione inibitoria diretta dell'EPO su alcuni fattori della coagulazione. Per questo, anche con valori di ematocrito basso si possono sviluppare trombi intravascolari nei diversi distretti ed organi corporei, come il fegato, il rene, i polmoni.

L'EPO inoltre sembra favorire l'aumento delle resistenze vascolari, nelle zone profonde del cervello, con conseguenti possibilità di ischemie cerebrali.

Inoltre, anche a livello del circolo periferico, una complicanza molto comune è rappresentata dall'ipertensione arteriosa, con l'accresciuta possibilità di rischio di infarto del miocardio.

Infine, in particolare l'eritropoietina ricombinante umana, proprio per la sua spiccata attività anti-apoptotica, sembra favorire nel tempo lo sviluppo di gravi forme di leucemie, oltre che altre gravi patologie a carico delle cellule midollari (Fig. 6).

Il doping ematico ed i trasportatori artificiali di ossigeno appartengono alla categoria delle pratiche vietate, inserite come secondo gruppo della Lista delle sostanze vietate e dei metodi proibiti, riportata dal Codice Antidoping del Movimento Olimpico.

Essendo la capacità di trasportare ossigeno di fondamentale supporto nelle discipline sportive a base aerobica, realmente l'uso di tali sostanze altera in modo consistente la performance agonistica (Fig. 7).

Il doping ematico consiste nella somministrazione endovenosa di eritrociti o emoderivati contenenti eritrociti.

L'emotrasfusione è una pratica molto utilizzata nel mondo sportivo.

L'intenso allenamento di fondo, o di resistenza, favorisce un'adeguata modificazione di vari fattori fisiologici, oltre che nell'apparato respiratorio e cardiocircolatorio anche nel tessuto muscolare, dove sono aumentati i processi di diffusione dell'ossigeno e quindi il suo utilizzo nei sistemi biochimici implicati nel meccanismo della contrazione.

Il rifornimento dell'ossigeno ai muscoli da parte dei globuli rossi rimane però inalterato ed è quindi inadeguato alla richiesta.

Questo comporta l'accumulo di acido lattico nei muscoli e, di conseguenza, intenso dolore per l'atleta.

L'emotrasfusione può riequilibrare lo sbilanciamento che acutamente si viene a creare fra richiesta ed apporto di ossigeno, aumentando il contenuto di globuli rossi e favorendo così il trasporto di ossigeno nel sangue.

L'emotrasfusione può essere omologa, cioè un'autotrasfusione, o eterologa, quando il sangue è prelevato da un donatore.

Nel caso dell'autotrasfusione, la procedura ha inizio alcuni mesi prima delle gare, con una donazione di sangue compresa tra 1 e 4 unità, dove ad 1 unità corrispondono circa 450

ml. Dopo immediata centrifugazione del sangue prelevato, il plasma è infuso di nuovo, mentre la parte sedimentata, composta prevalentemente dalle cellule, viene congelata a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Il sangue prelevato viene quindi trasfuso da 1 a 7 giorni prima della gara. Il massimo rendimento viene ottenuto trasfondendo il sangue 3-8 settimane dopo il prelievo, tenuto conto del tempo necessario all'organismo per reintegrare la quota dei globuli rossi prelevata. Se praticata correttamente, questa tecnica può aumentare la massa eritrocitaria e l'emoglobina fino al 20% (Fig. 8).

L'emotrasfusione favorisce un massiccio aumento dell'ematocrito, non solo a livello muscolare ma anche in altri distretti dell'organismo.

L'atleta che ne fa quindi uso, sottopone il proprio organismo a rischi considerevoli come:

- l'emosiderosi, che consiste nella formazione di depositi di ferro nel fegato, nel pancreas, nel cuore, nelle ghiandole.
- crisi emolitiche acute, cioè la rottura dei globuli rossi dovuta soprattutto all'uso di sangue non compatibile;
- l'ipertermia, per azione sul centro termoregolatore ipotalamico, da parte di tossine presenti nel sangue trasfuso.

Inoltre, si possono manifestare numerose reazioni allergiche provocate dai conservanti, dai farmaci o dagli additivi presenti nel sangue, che possono portare l'atleta fino al collasso cardiocircolatorio e shock (Fig. 9).

I trasportatori artificiali di ossigeno sono composti in grado di aumentare la solubilità dell'ossigeno, consentendo così un elevato incremento della sua concentrazione nel sangue e quindi una maggiore cessione ai tessuti, in particolare a quello muscolare. Essi ricoprono un ruolo fondamentale nelle terapie di pronto soccorso ed in casi di emergenze chirurgiche e rappresentano un notevole successo della ricerca scientifica e dell'evoluzione tecnologica. Fino a qualche anno fa, infatti, era ritenuto impossibile produrre sinteticamente dei prodotti alternativi al liquido biologico più importante, come è il sangue.

Si tratta comunque di particolari "sostituti" ematici, non possedendo tutte le funzioni biochimiche del sangue. Ad oggi, infatti, la maggior parte delle attività immunologiche e coagulative del sangue sembrano ancora difficilmente riproducibili nei prodotti sintetici. Per questo, è più giusto definirli solo trasportatori di ossigeno che sostituti del sangue.

Questi prodotti presentano alcuni considerevoli vantaggi rispetto alle usuali trasfusioni di sangue: hanno un lungo periodo di conservazione, sono privi della caratterizzazione dei gruppi sanguigni e del fattore Rh, risultando così assolutamente privi di incompatibilità, ed infine sono molto più facilmente reperibili.

Attualmente esistono due tipi di trasportatori: quelli a base emoglobinica ed i perfluoro derivati.

I trasportatori a base emoglobinica, di prima generazione, sono stati realizzati utilizzando l'emoglobina estratta dai globuli rossi umani; ma questo tipo di tecnica è risultata scarsamente praticabile, perché le molecole ottenute risultavano estremamente instabili. L'emoglobina è una molecola costituita da quattro subunità che, una volta somministrata in vena, subisce una dissociazione in due parti comprendenti ognuna due subunità, con una conseguente riduzione della capacità di legare l'ossigeno. Inoltre, questo tipo di struttura è risultata anche parzialmente tossica.

I trasportatori successivi sono stati realizzati attraverso la produzione di una emoglobina modificata mediante tecniche genetiche a DNA ricombinante, legata in modo da formare una poliemoglobina, o coniugata con polimeri solubili, per aumentarne la stabilità. Queste ultime rappresentano le emoglobine coniugate.

Il secondo tipo di trasportatori dell'ossigeno sono rappresentati sostanzialmente da perfluoro derivati. Queste molecole hanno un'elevata capacità di rendere solubile l'ossigeno, fino ad ottenere concentrazioni 50 volte superiori, rispetto a quelle presente fisiologicamente nel sangue.

Tuttavia, per poter essere infusi, devono essere legati a molecole lipidiche, formando così in soluzione acquosa un'emulsione iniettabile.

Ad oggi, i prodotti di questa categoria più attivi sono i perfluorocarburi ed i perfluorottilbromuri, che utilizzano il fosfolipide lecitina come supporto.

Gli effetti collaterali di questi prodotti sono di notevole gravità.

Essi sono gli stessi riscontrati con l'abuso di Epo, a livello cardiocircolatorio, con ipertensione arteriosa sistemica e polmonare. Inoltre, determinano un aumento della temperatura corporea.

Infine, risultano essere particolarmente tossiche a livello renale ed epatico (Fig. 10).

