

# DOPING

## IL RENDIMENTO SPORTIVO PUÒ ESSERE IMPLEMENTATO CON SOSTANZE

che aumentano il rendimento muscolare



- Ormoni steroidei (androgeni, estrogeni, progestinici)
- Eritropoietina
- Ormone GH
- IGF-1

che agiscono a livello del SNC



- Amfetamine
- Cocaina
- Efedrina
- Metilefedrina

**UNA DELLE MAGGIORI SFIDE PER I LABORATORI ANTI-DOPING È QUELLA DI :**

**RICONOSCERE e RILEVARE l'abuso di sostanze illecite**

# Sostanze Proibite sempre

«in e out» competizione:

- S.1 Agenti anabolizzanti
- S.2 Ormoni e sostanze correlate
- S.3 Beta-2 agonisti
- S.4 Agenti con attività anti-estrogenica
- S.5 Diuretici ed agenti mascheranti



## Sostanze Proibite in competizione:

- S.6 Stimolanti
- S.7 Narcotici
- S.8 Derivati della cannabis
- S.9 Farmaci Corticosteroidi

# Sostanze proibite in particolari discipline sportive

**P1.Alcool**, proibito nelle competizioni di automobilismo (>0.10 g/L), arco (>0.10 g/L), biliardo (>20 g/L), karate (>0.10 g/L), ecc.

**P2.Beta-bloccanti** (es. atenololo, labetalolo, metoprololo, nadololo, sotalolo, timololo, ecc.) , proibito nelle competizioni di automobilismo, arco, bridge, ginnastica, nuoto sincronizzato, ecc.

# METODI DI DOPING

# Metodi vietati in e fuori competizione

## **M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO**

- ✓ Doping ematico
- ✓ Uso di prodotti che aumentano l'assorbimento, il trasporto o il rilascio dell'ossigeno
- ✓ Camera ipobarica

## **M2. MANIPOLAZIONE FARMACOLOGICA, CHIMICA E FISICA**

uso di sostanze e metodi che possano alterare l'integrità e la conformità dei campioni raccolti nei controlli antidoping

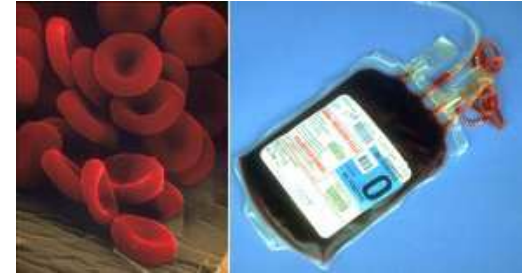
**M3. DOPING GENETICO** uso non terapeutico dei geni, elementi genetici e/o cellule, che hanno la capacità di migliorare la prestazione sportiva

## **M1. AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO**

### **Doping Ematico**

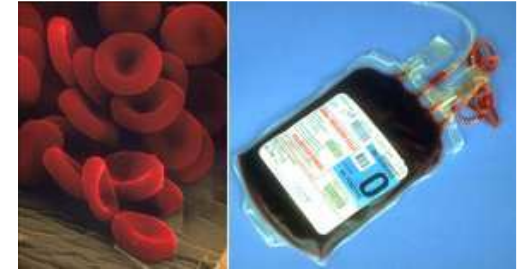
- a. Emotrasfusione**
- b. Uso di Emoglobine sintetiche**
- c. Utilizzo della Camera ipobarica**

# 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

a. Emotrasfusione



## **Doping ematico: Autoemotrasfusione**

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





## Doping ematico

### Eritropoietina ricombinante (r-HUEPO)

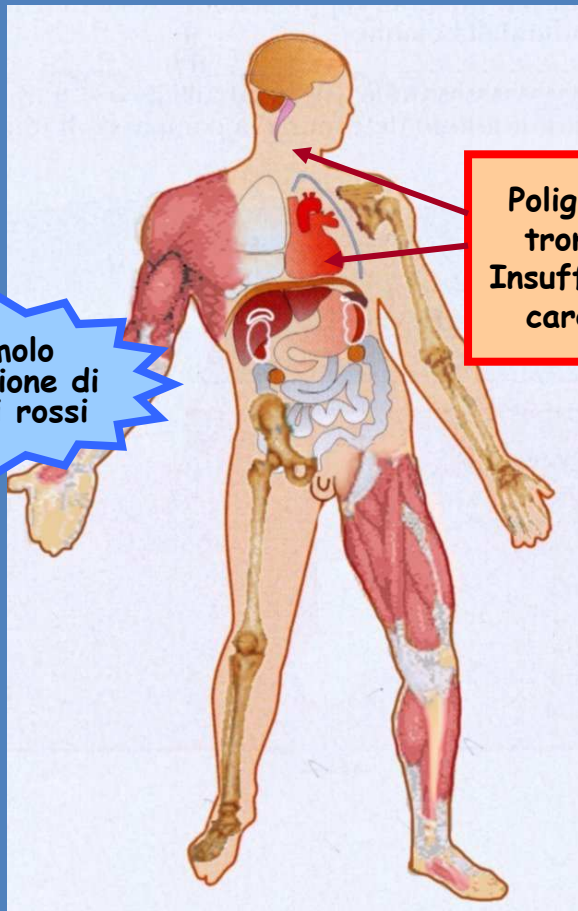
- ▶ Nel 1987 è stata introdotta l'EPO ricombinante (r-HuEPO) con struttura ed azione sovrapponibili a quella endogena.
- ▶ La somministrazione di r-HuEPO consente di aumentare la massa eritrocitaria e i livelli di emoglobina per 3-4 settimane, con aumento del VO<sub>2</sub>max (*il massimo volume di ossigeno consumato per minuto*) pari al 10%.
- ▶ La somministrazione di r-HuEPO consente quindi di migliorare la capacità aerobica dell'atleta. Gli effetti sono additivi a quelli dell'allenamento, che consente di aumentare il VO<sub>2</sub>max fino ad un massimo del 20%.

# S2- Eritropoietina (EPO)

## Effetti

- Stimola la produzione dei globuli rossi
- Aumenta la capacità di trasporto dell'ossigeno

Stimolo  
produzione di  
globuli rossi



## Reazioni avverse

- Poliglobulia
- Aumento della viscosità del sangue
- Infarto del miocardio
- Trombosi
- Ictus
- Embolia polmonare
- Convulsioni

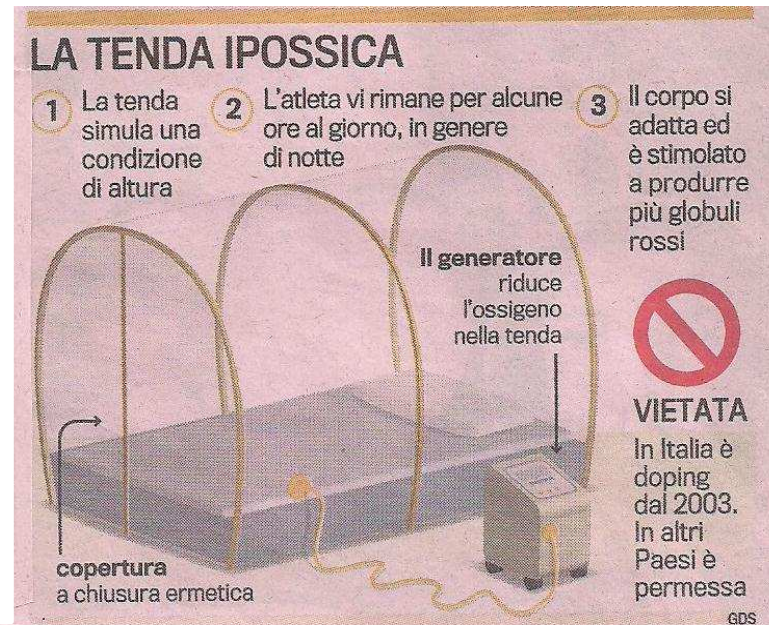
# Doping Ematico

## c. Camera ipobarica

**La camera ipobarica** riduce la percentuale di ossigeno presente nell'aria.

L'organismo quindi viene stimolato a produrre globuli rossi, aumentando la massa plasmatica.

Dunque aumenta la resistenza, crea l'effetto altitudine, migliora anche la capacità di recupero.



## M2. MANIPOLAZIONE FARMACOLOGICA, CHIMICA E FISICA

Uso di sostanze e metodi che possano **alterare l'integrità e la conformità dei campioni raccolti nei controlli antidoping**

Le manipolazioni vanno **dallo scambio dei campioni** d'urina alla diluizione con altri liquidi, fino all'inserimento in vescica, tramite catetere, dell'urina altrui. Possono inoltre essere usati i **diuretici** chiamati mascheranti, perché in grado di eliminare più velocemente, favorendo la diuresi, le sostanze proibite rintracciabili ai test antidoping. Inoltre, la prima cosa che si esamina nei campioni di urina è il pH, in quanto è possibile facilitare l'eliminazione di farmaci vietati alcalinizzando o acidificando l'urina; la seconda è la densità: un'urina con basso peso specifico, può indicare una manipolazione finalizzata ad abbassare la concentrazione di un farmaco al di sotto della soglia di rilevazione.

# M3. DOPING GENETICO

**Il WADA ha inserito nella lista dei metodi proibiti il  
DOPING GENETICO**



**E' definito come “ l'uso non terapeutico di cellule, geni, elementi genici o la modulazione dell'espressione genica che possano aumentare la performance sportiva”.**

**Il DOPING GENETICO** usa le stesse tecniche della **TERAPIA GENICA** allo scopo di migliorare la prestazione sportiva.

# Doping Genetico e Sport

**IL TESSUTO MUSCOLARE COME TARGET DI TERAPIA GENICA È OTTIMALE IN QUANTO:**

- **È molto abbondante nell'organismo**
- **Ottimamente vascolarizzato**
- **Facilmente accessibile**

Studi di laboratorio su animali, hanno dato risultati positivi utilizzando metodi in vivo ed ex vivo.

# GENI CANDIDATI nel DOPING GENETICO per migliorare le prestazioni sportive

## GENI CORRELATI ALLA RESISTENZA ALLO SFORZO (ENDURANCE)

- Eritropoietina (**EPO**)
- recettore **PPARD** che attiva la proliferazione dei perossisomi
- Geni correlati all'angiogenesi: **VEGF, TGF, HGF**

## GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA MUSCOLARE

- Fattori per il controllo della crescita muscolare: **MGF** e **IGF-1**;
- Fattori per il controllo della massa muscolare: **GH**;
- Fattori ipertrofici: **miostatina** che è considerato un regolatore negativo della crescita muscolare: l'assenza di miostatina stimola l'ipertrofia e l'iperplasia muscolare.

GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA  
MUSCOLARE e ALLA RIGENERAZIONE

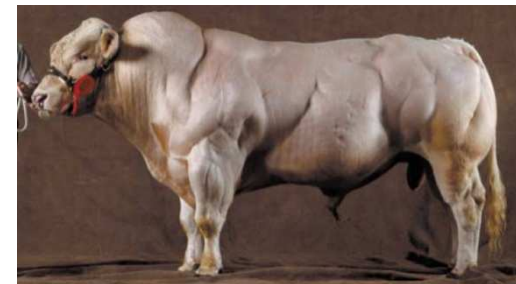
**3. Inattivazione Miostatina**





## ➔ Gene della miostatina

- La miostatina è una proteina regolatrice della crescita muscolare. Appartiene alla superfamiglia dei TGF-beta (transforming growth factor-beta)
- E' responsabile del differenziamento dei muscoli scheletrici
- Ha una funzione inibitoria della proliferazione delle cellule satelliti alle fibre muscolari.  
Mutazioni genetiche del gene miostatina provocano abnormi crescite dei muscoli:  
es. ceppo bovino *Belgium blue bull*



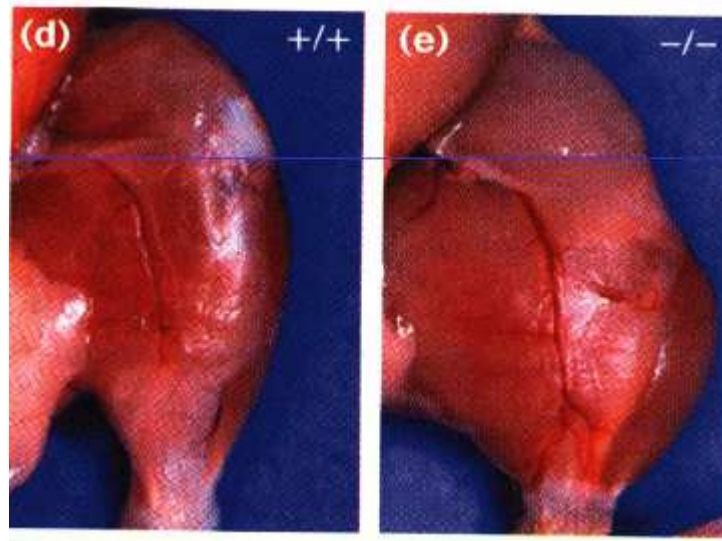
## Approcci al doping genetico

- ➔
  1. modificare per mutagenesi il gene miostatina
  2. somministrare un inibitore della miostatina: follistatina.

# Topi Schwarzenegger

## Rimozione del Gene Miostatina in topi:

Arto anteriore di un topo normale



Arto anteriore di un topo privo del gene della miostatina

Topo normale

Topo know-out: rimosso il gene miostatina

Lee et al. Curr. Opin. Gen. Dev. (1999) 9:604-607

## Esperimenti su topi

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



T. Hertrampf et al, FIT 1/2004

# RISCHI POTENZIALI DEL GENE DOPING

- Reazioni immunitarie anche letali
- Problemi correlati alla preparazione dei vettori in laboratori non controllati (contaminazioni o produzione di vettori virali virulenti)
- Problemi correlati all'eccessivo sviluppo delle masse muscolari con effetti dannosi su tendini e ossa
- Problemi legati alla integrazione del vettore nel genoma dell'individuo: possibile mutagenesi o danneggiamento di geni endogeni.
- Sviluppo di neoplasie sia per mutagenesi inserzionale sia per overespressione di sostanze (come GH) che sono potenti mitogeni e anti-apoptotici

# Si può scoprire il doping genetico?

- La proteina prodotta è uguale alla proteina endogena
- Il DNA artificiale è presente solamente in sede locale quando si pratica un'iniezione col DNA puro o con cellule modificate geneticamente
- Si dovrebbe conoscere la sequenza del DNA artificiale per poterla rilevare

# 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

**L'uso di qualsiasi sostanza  
dopante è accompagnato da  
effetti collaterali.**

Meccanismi d'azione e reazioni  
avverse delle principali sostanze  
dopanti

# **SOSTANZE PROIBITE E REAZIONI AVVERSE**



# Sostanze Proibite sempre

«in e out» competizione:

S.1 Agenti anabolizzanti

S.2 Ormoni e sostanze correlate

S.3 Beta-2 agonisti

S.4 Agenti con attività antiestrogenica

S.5 Diuretici ed agenti mascheranti



## Sostanze Proibite in competizione:

S.6 Stimolanti

S.7 Narcotici

S.8 Derivati della cannabis

S.9 Farmaci Corticosteroidi

# Steroidi anabolizzanti: Testosterone, Nandrolone....

## S1. Anabolizzanti

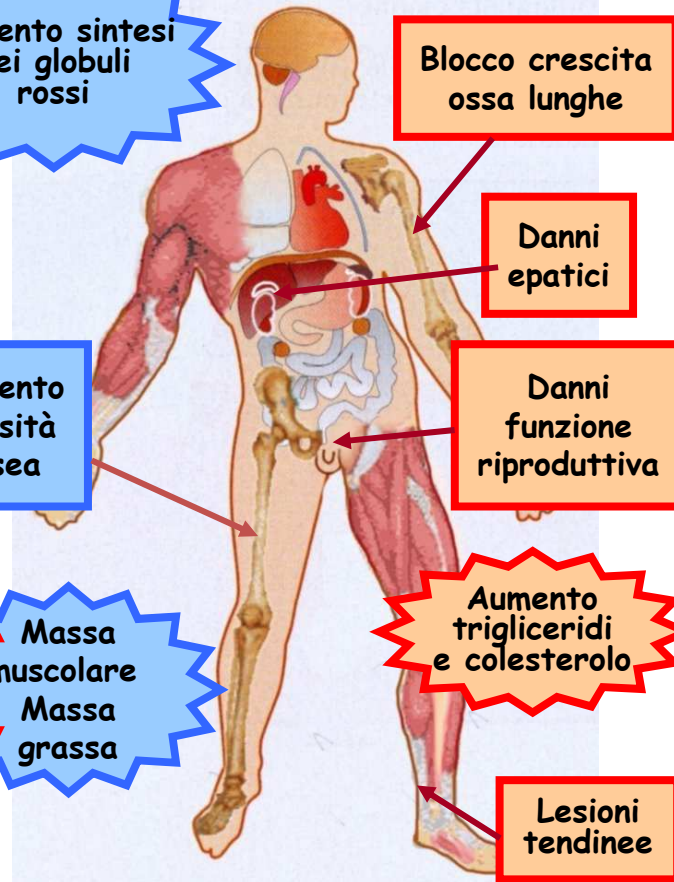
### Effetti

- Aumento della massa muscolare
- Diminuzione della massa grassa
- Aumento della resistenza alla fatica
- Diminuzione azione catabolica dei glucocorticoidi
- Aumento della sintesi dei globuli rossi
- Aumento della densità ossea

Aumento sintesi dei globuli rossi

Aumento Densità ossea

↑ Massa muscolare  
↓ Massa grassa



Acne

Blocco crescita ossa lunghe

Danni epatici

Danni funzione riproduttiva

Aumento trigliceridi e colesterolo

Lesioni tendinee

### Reazioni avverse

#### Nel maschio (età pre-puberale)

- Blocco crescita ossa lunghe
- Inibizione della spermogenesi

#### Nel maschio (età adulta)

- Oligospermia/azospermia
- Atrofia testicolare
- Ipertrofia prostatica
- Alterazione della funzione epatica con possibilità di tumori
- Aumento dei lipidi plasmatici

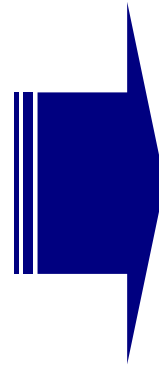
#### Nella donna

- Soppressione della funzione ovarica
- Atrofia della ghiandola mammaria
- Virilizzazione
- Alterazione della funzione epatica con possibilità di tumori

# Gli steroidi anabolizzanti



Jennifer Capriati



Possono trasformare un atleta  
in meno di due anni

Qualche volta sono così efficaci...

....da trasformare  
direttamente una  
donna in un uomo  
come Heidi  
Krieger





**Heidi Krieger oro  
nel lancio del peso  
agli Europei 1986  
all'età di 21 anni**



**Oggi Andreas Krieger**

## S2. ORMONI E SOSTANZE CORRELATE

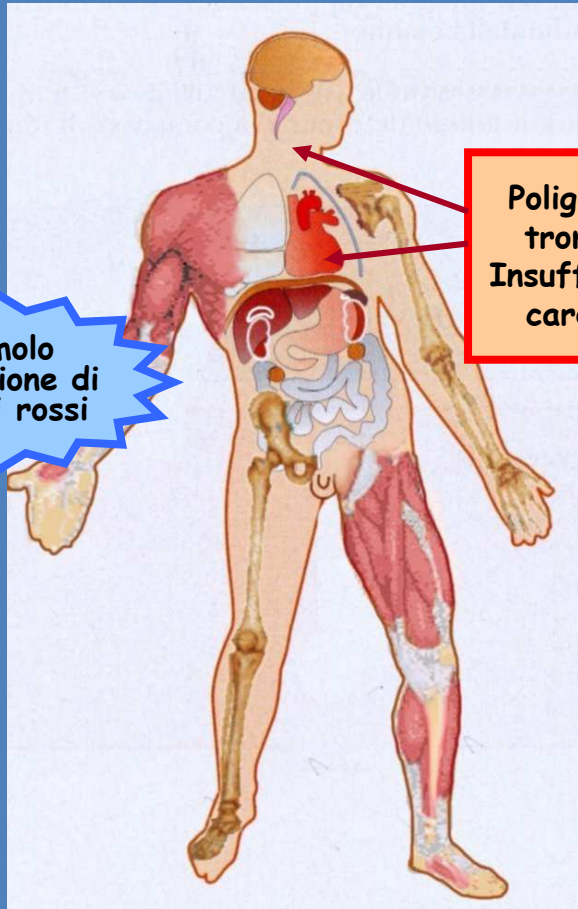
1. Agenti stimolanti l'eritropoiesi [es. **eritropoietina EPO**];
2. Gonadotropina corionica (CG) e Ormone luteinizzante (LH) proibiti negli uomini;
3. **Insuline**;
4. Corticotropine;
5. Fattori di crescita: **Ormone della crescita (GH)**, fattore di crescita insulino-simile (IGF-1), Fattori di crescita meccanici (MGF), fattori di crescita di derivazione piastrinica (PDGF), fattori di crescita del fibroblasto (FGF), fattore di crescita vascolare-endoteliale (VEGF) e fattore di crescita degli epatociti (HGF) ed altri fattori di crescita riguardanti muscoli, sintesi/degradazione delle proteine dei tendini o dei legamenti, vascolarizzazione, utilizzazione di energia, capacità rigenerativa o commutazione del tipo di fibra

# S2- Eritropoietina (EPO)

## Effetti

- Stimola la produzione dei globuli rossi
- Aumenta la capacità di trasporto dell'ossigeno

Stimolo produzione di globuli rossi



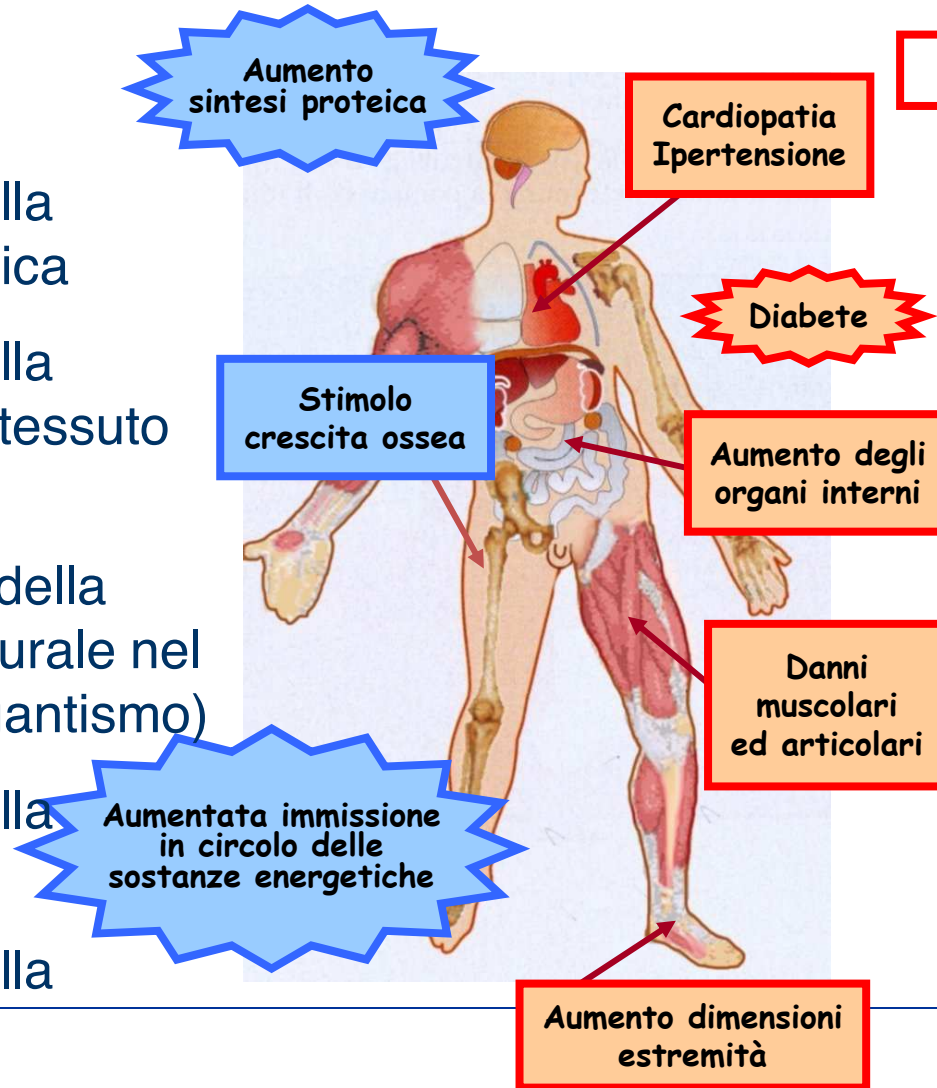
## Reazioni avverse

- Poliglobulia
- Aumento della viscosità del sangue
- Infarto del miocardio
- Trombosi
- Ictus
- Embolia polmonare
- Convulsioni

# S2. Ormone della crescita (GH)

## EFFETTI

- Aumento della sintesi proteica
- Aumento della crescita del tessuto muscolare
- Incremento della crescita staturale nel giovane (gigantismo)
- Aumento della lipolisi
- Aumento della glicemia



## REAZIONI AVVERSE

- Acromegalia nell'adulto (gigantismo)
- Ritenzione idrica ed edema (generalizzato e periferico)
- Artropatie; sindrome del tunnel carpale
- Cardiomiopatia
- Ipertensione arteriosa
- Iperglicemia
- Diabete



## S2. Ormone della crescita (GH)

Flo Jo” Griffith morì a 38 anni nel 1998 per aver assunto l’ormone della crescita al fine di migliorare la propria massa muscolare. In quel periodo non esisteva ancora la formulazione artificiale e il rischio che si correva con l’utilizzo di ormone estratto da cadavere era di contrarre la malattia di Creutzfeldt-Jacob, Encefalopatia Spongiforme Bovina, comunemente detta malattia della “mucca pazza”, un virus a lenta azione che si può manifestare anche dopo parecchio tempo. Questo fu un caso clamoroso, ma si contano ben 150 altri decessi fra coloro che hanno assunto l’ormone estratto da cadavere.



(December 21, 1959 – September 21, 1998)

### Esempi di morte da doping

“Flo Jo” Griffith (1959-1998) contrasse una malattia infettiva per abuso di ormone della crescita estratto da cadavere.

Aveva detto:  
“quando arrivi sempre seconda, puoi accettarlo o tentare di diventare la numero uno”.



## S.3 BETA-2 AGONISTI

Sono anabolizzanti non ormonali:  
antiasmatici o broncodilatatori

### Beta 2 agonisti Azione stimolante e anabolizzante

#### EFFETTI

- Broncodilatazione
- Aumento dell'efficacia contrattile del miocardio
- Azione lipolitica (aumento degli acidi grassi liberi)
- Ipertrofia delle fibre muscolari tipo II

Azione  
cardiostimolante

Broncodilatazione

Azione  
lipolitica

Ipertrofia fibre  
muscolari tipo II

Agitazione  
Irritabilità  
Insonnia

Disturbi ritmo  
cardiaco

Iperidrosi

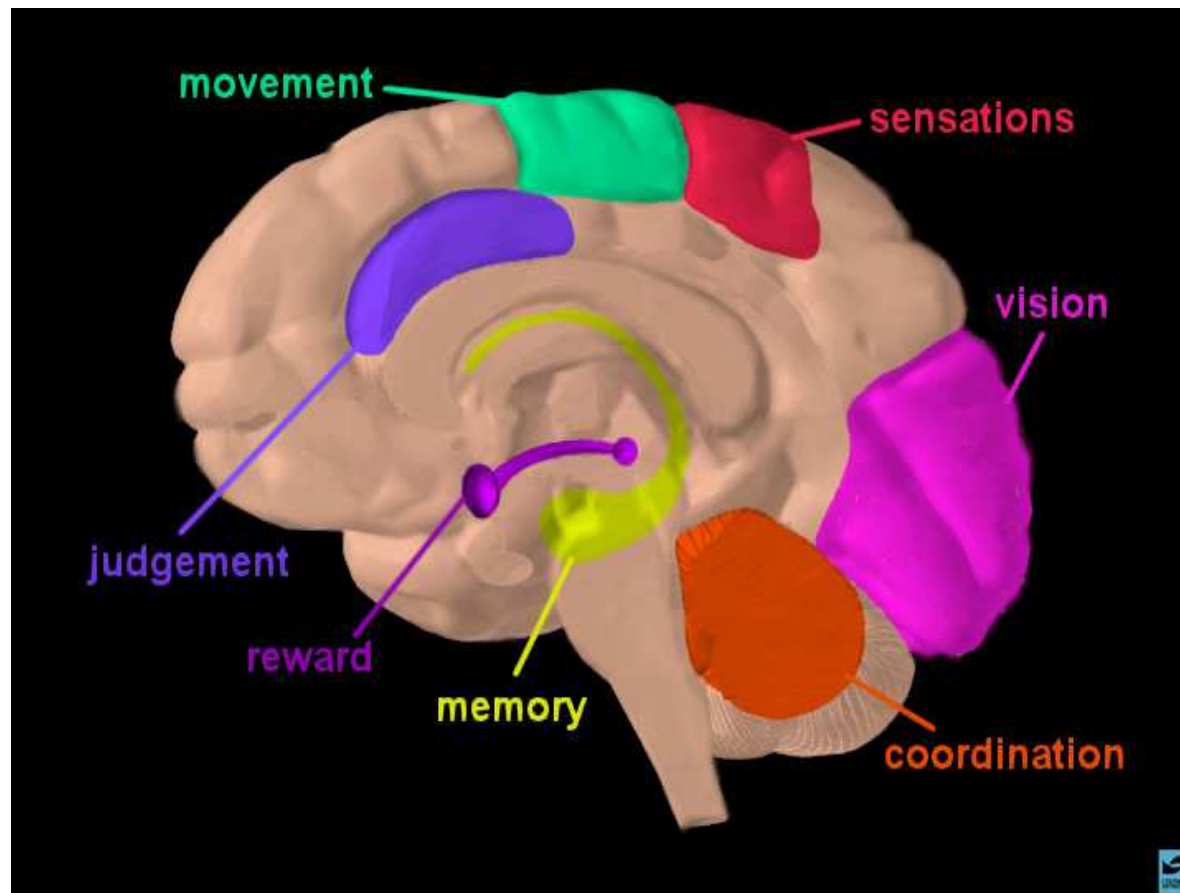
Ritenzione  
urinaria

#### EFFETTI INDESIDERATI

- Tremori, agitazione, irritabilità e insonnia
- Iperidrosi
- Scialorrea
- Ritenzione urinaria
- Anoressia
- Ipopotassiemia
- Alterazioni della pressione arteriosa
- Tachicardia e disturbi del ritmo
- Dispnea

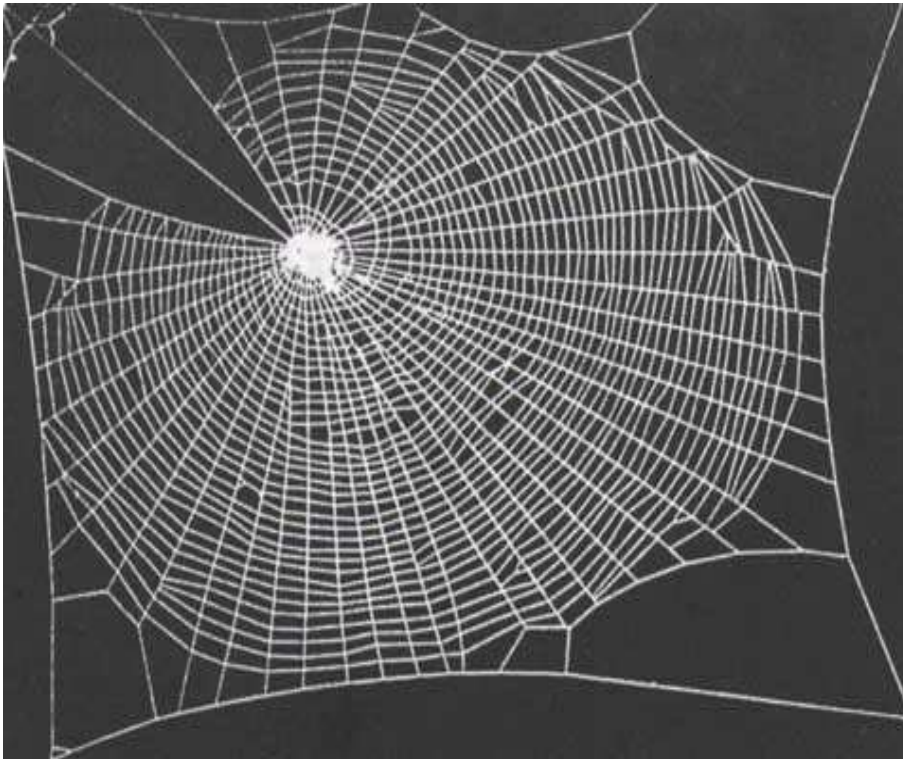
## S6. STIMOLANTI

Gli stimolanti (es. cocaina, oppioidi, amfetamine, cannabinoidi) alterano le aree cerebrali che mediano le sensazioni di motivazione e di piacere: **area “reward”** cioè della gratificazione.



## **S6. STIMOLANTI**

**Effetto dell'ecstasy sulle capacità del ragno a tessere la tela**



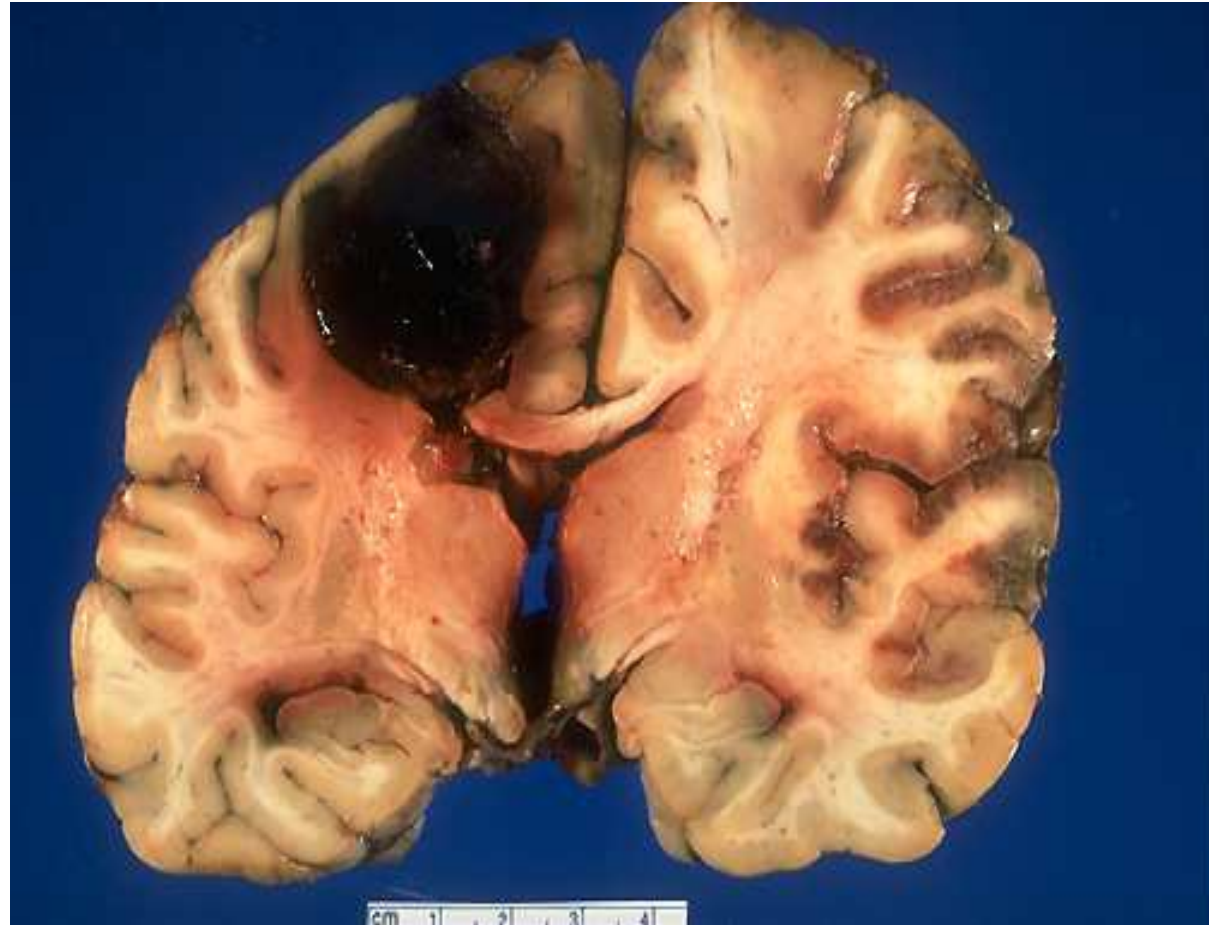
**Condizioni basali**



**Dopo ecstasy**

## **S6. STIMOLANTI**

### **Emorragia cerebrale da cocaina**



## S6. Stimolanti: Amfetamina, Efedrina, Cocaina...

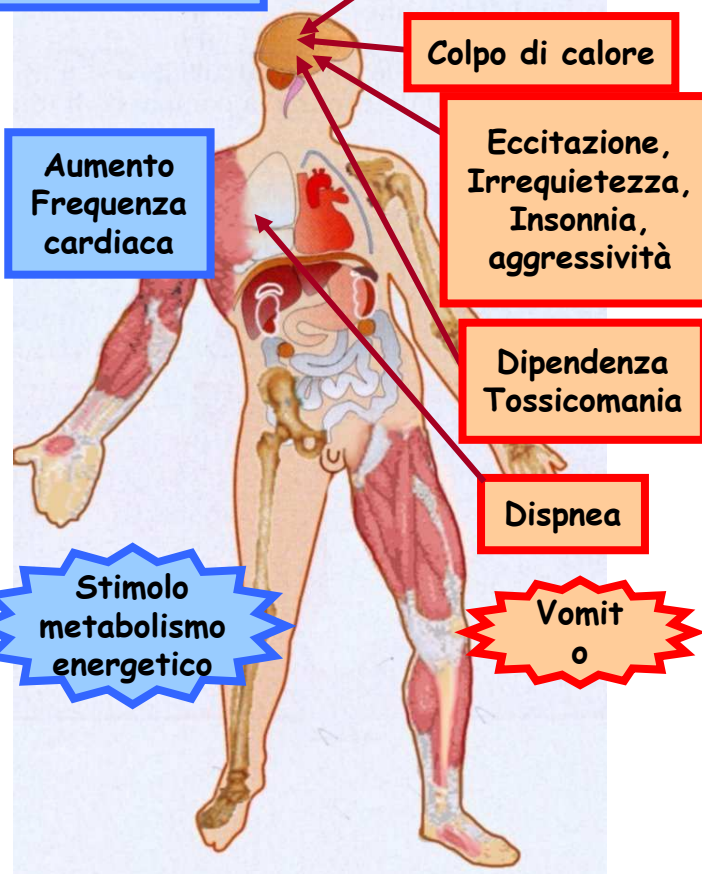
### EFFETTI

- Spiccata azione stimolante sul sistema nervoso centrale (aumento dell'attenzione della competitività, senso di benessere, euforia, riduzione del senso di fatica)
- Aumento della frequenza cardiaca
- Aumento della glicemia e degli acidi grassi liberi
- Riduzione del senso di fame (effetto anoressizzante)

Riduzione fatica, euforia

Aumento Frequenza cardiaca

Stimolo metabolismo energetico



Ictus

Colpo di calore

Eccitazione, Irrequietezza, Insonnia, aggressività

Dipendenza Tossicomania

Dispnea

Vomit

### EFFETTI INDESIDERATI

#### Sistema nervoso centrale

- Tremori, eccitazione, aggressività
- Perdita del senso critico
- Cefalea
- Insonnia
- Vomito, anoressia
- Iperpiressia (colpo di calore)
- Convulsioni
- Forte stato depressivo, psicosi

#### Sistema cardiocircolatorio

- Vasocostrizione
- Iperensione
- Tachicardia
- Disturbi del ritmo
- Infarto del miocardio

# S9. Glucocorticosteroidi

farmaci anti-infiammatori e analgesici

Proibiti per via orale, rettale, im. o ev. per le altre vie è richiesta certificazione medica

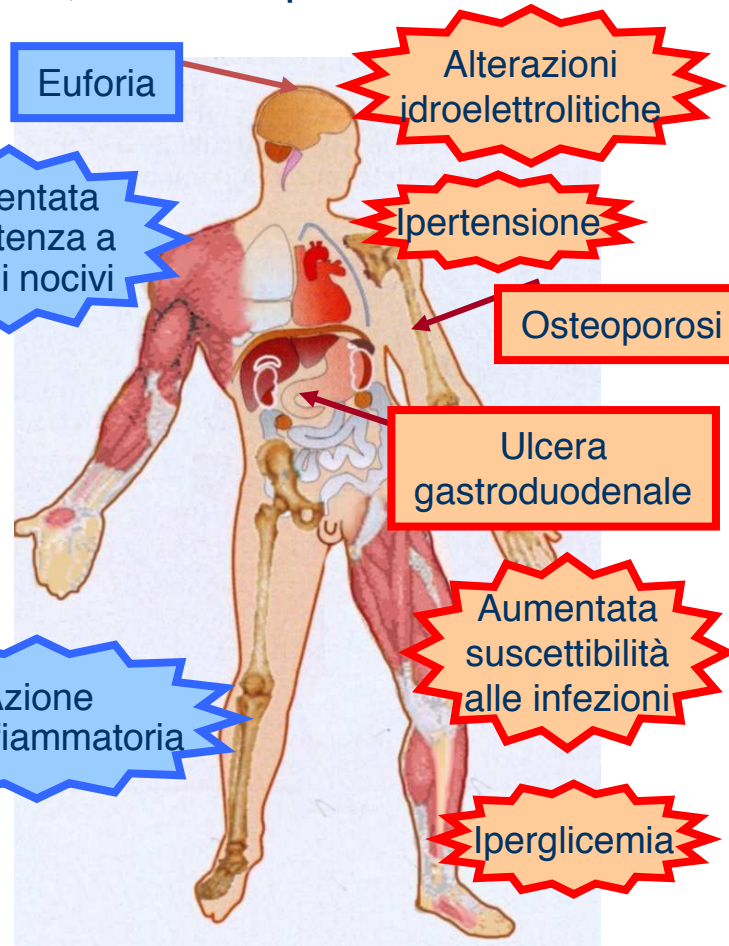
## EFFETTI

- Potente azione anti-infiammatoria
- Effetto euforizzante
- Aumentata capacità di resistere a stimoli nocivi

Azione anti-infiammatoria

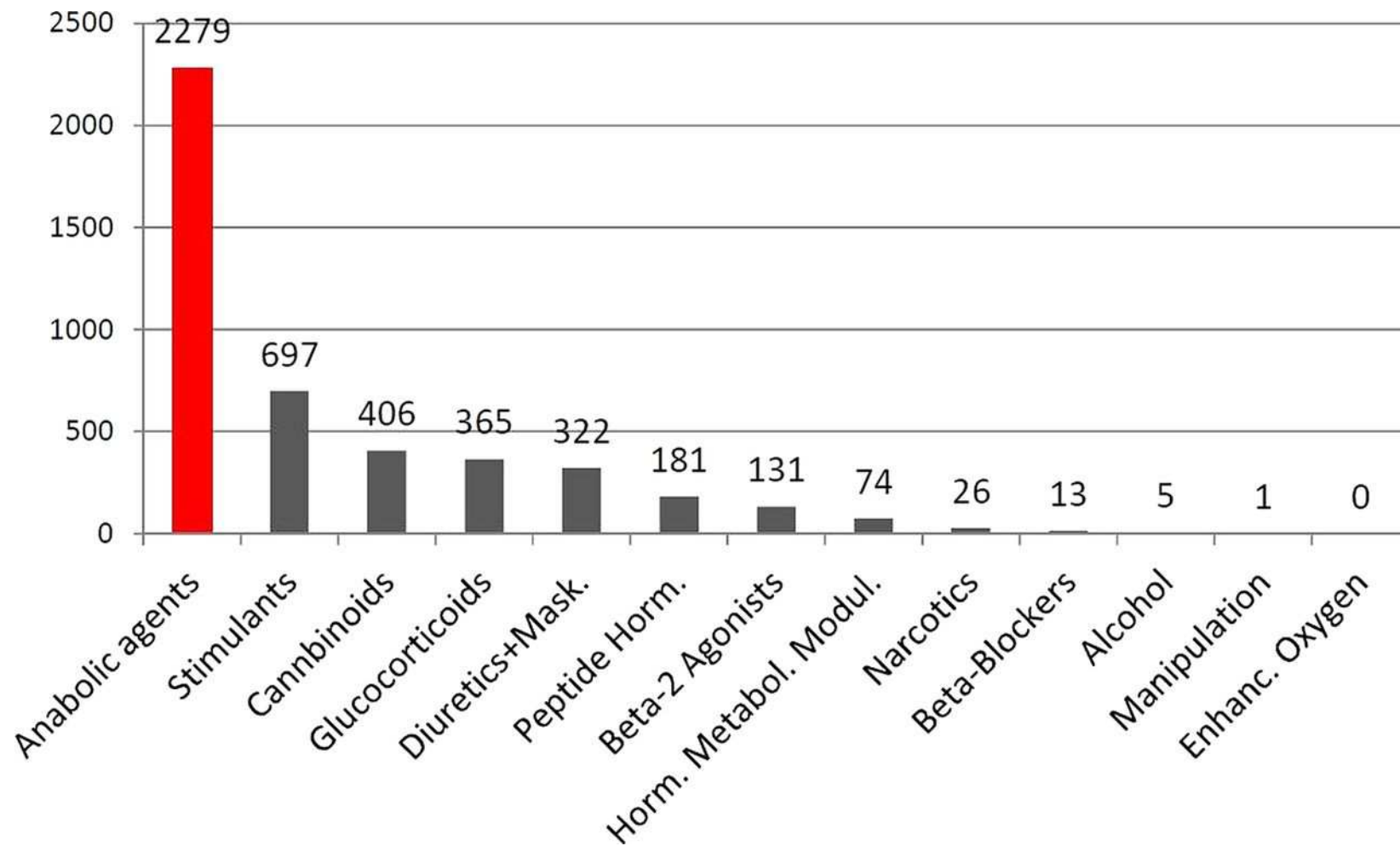
Euforia

Aumentata Resistenza a stimoli nocivi



## EFFETTI INDESIDERATI

- Alterazione del bilancio elettrolitico
- Ipertensione
- Iperglicemia
- Iperlipidemia
- Iperuricemia
- Aumento della suscettibilità alle infezioni
- Ulcera peptica
- Osteoporosi
- Insonnia
- Cataratta



**Risultati (2012) dei laboratori accreditati dell'Agencia mondiale antidoping (WADA) tramite antidoping Amministrazione e Management System (ADAMS).**



# Anti-Doping Administration & Management System (ADAMS)

## Cosa è ADAMS ?

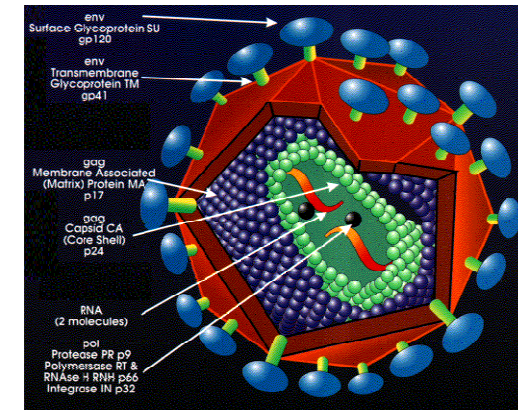
é uno strumento che assiste nell'implementazione di controlli anti-doping. E' in pratica un calendario messo su rete a cui accedono atleti e controllori.

Gli atleti forniscono la propria reperibilità, i laboratori riportano i dati e le autorità coordinano le azioni

## ADAMS PER SPORT DI SQUADRA

- ADAMS contiene un modulo per squadre compilato da un responsabile di squadra. Questi inserisce le info dei suoi giocatori relative alla reperibilità
- ADAMS quindi informa il singolo atleta delle info fornite dal responsabile e chiede conferma
- Gli atleti sono responsabili della propria reperibilità e non vi è possibilità di palleggiamento di responsabilità con il responsabile di squadra.

## Lentivirus



- **Genoma ad RNA.**
- **A differenza degli altri retrovirus possono infettare cellule proliferanti e post-mitotiche.**
- **Integrazione casuale (mutagenesi inserzionale)**
- **Scarsissime reazioni immunologiche.**
- **Elevata efficienza di trasduzione.**
- **Ottime prospettive per la terapia genica in vivo.**

# VETTORI PER TERAPIA GENICA

## Vettori virali:

- Adenovirus
- Retrovirus
- Virus adeno-associati
- Lentivirus (derivati da HIV)
- Herpesvirus

## Vettori non virali:

- Plasmidi nudi
- Liposomi e polimeri
- Elettroporazione in vivo

# Funzioni principali di ADAMS

## **Reperibilità degli atleti**

Essendo via web, l'atleta può aggiornare da dove vuole; se non ha accesso alla rete, può inviare sms

Strumento cruciale per i controlli a sorpresa

**Clearing House** – Contiene tutte le informazioni dell'atleta e consente a tutte le organizzazioni di avere semplice e rapido accesso alle informazioni.

Rappresenta garanzia di trasparenza.

- É la “banca dati” in cui i dati dell'atleta sono conservati, in particolare:
- Risultati di laboratorio
- Autorizzazioni TUE (Therapeutic Use Exemption)
- Violazioni delle norme anti-doping

## **Doping Control Platform**

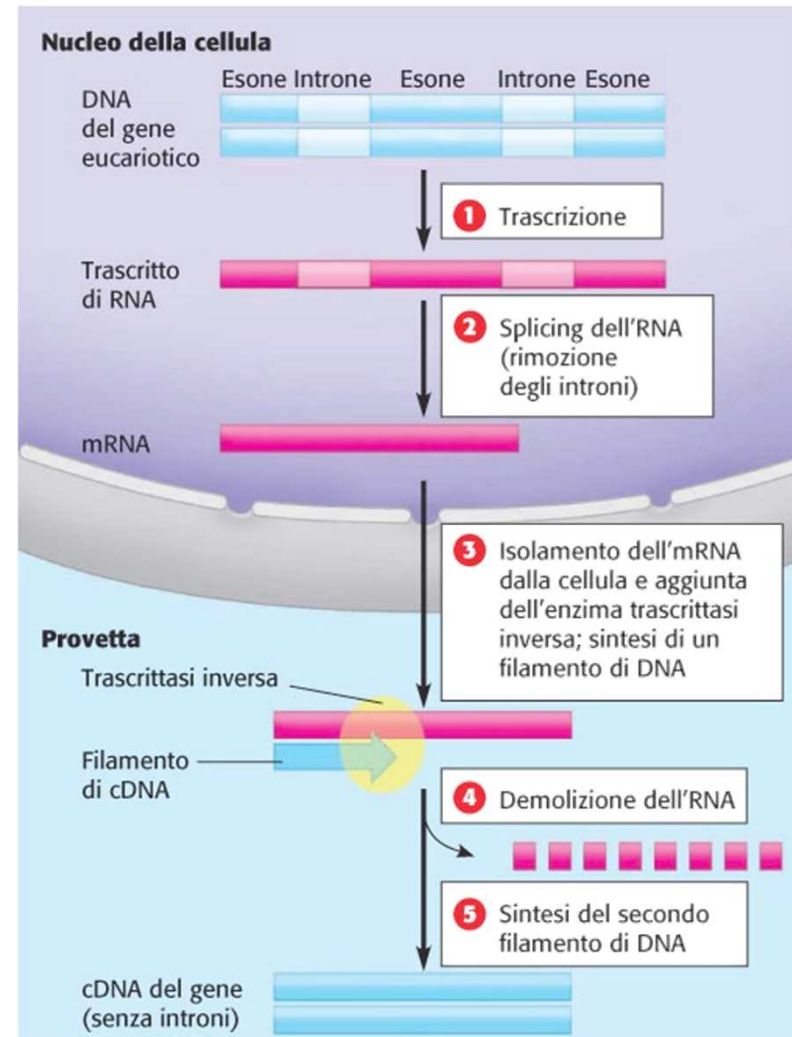
Strumento fondamentale per pianificare, coordinare, ordinare controlli e serve per la loro gestione. Consente, per esempio, di evitare duplicazioni non necessarie dei controlli.

# **DOPING: SOSTANZE E METODI**

# Come ottenere il DNA da clonare....

## 2. Si può produrre DNA da clonare anche mediante l'enzima trascrittasi inversa

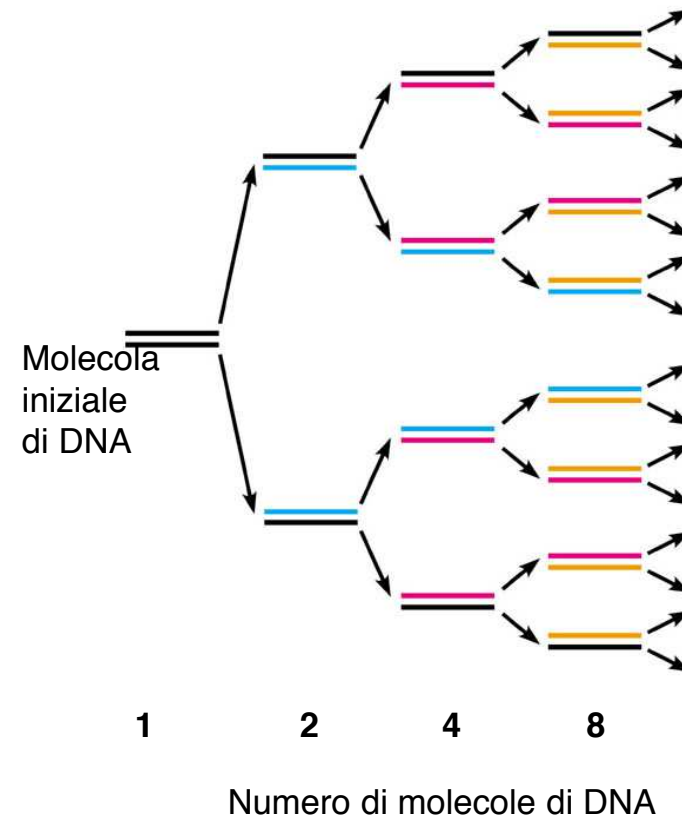
L'enzima **trascrittasi inversa** può essere usato per ottenere librerie di **DNA complementare (cDNA)** contenenti solo i geni espressi da un particolare tipo di cellula.



# Come ottenere il DNA da clonare....

## 1. Per ottenere molte copie di una specifica sequenza di DNA si utilizza comunemente la tecnica PCR

Quando il campione di DNA è scarso o impuro, la reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, o **PCR**) è un metodo più appropriato per ottenere un grande quantitativo di un particolare gene.



**La definizione di doping secondo la LEGGE 14 dicembre 2000, n°376 (art. 1) del Ministero della Salute è la seguente:**

Costituiscono doping: la somministrazione o l'assunzione di farmaci o di sostanze biologicamente o farmacologicamente attive e l'adozione o la sottoposizione a pratiche mediche non giustificate da condizioni patologiche ed idonee a modificare le condizioni psichiche o biologiche dell'organismo al fine di alterare le prestazioni agonistiche degli atleti”



# DOPING

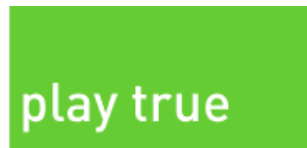
E' l'uso (o abuso) di sostanze o medicinali con lo scopo di aumentare artificialmente il rendimento fisico e le prestazioni dell'atleta.

**Il doping è vietato dai regolamenti sportivi che:**

- Regolano l'utilizzo dei farmaci
- Stabiliscono controlli anti-doping

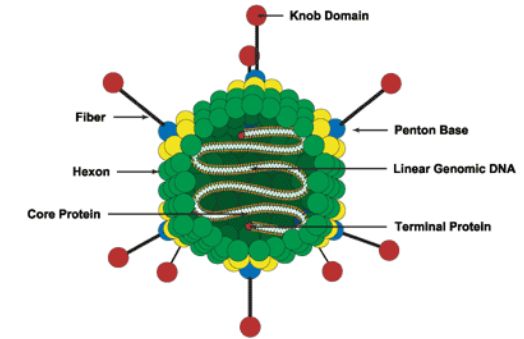
Il Comitato Internazionale Olimpico e le Federazioni Nazionali, nel 1998 formarono l'**Agenzia Mondiale Anti-Doping:**

**WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA)**



**WADA emette e aggiorna costantemente il  
Codice Mondiale Anti-Doping**

## Adenovirus



- **Genoma di DNA doppio filamento.**
- **infettano le vie respiratorie,**
- **Possono infettare cellule proliferanti e post-mitotiche.**
- **Non si integrano, ma vengono mantenuti in forma episomica. Pertanto non determinano mutagenesi inserzionale, ma sono necessari trattamenti ripetuti.**
- **Relativamente facile produrli in grandi quantità (titolo elevato).**
- **Forti reazioni immunologiche.**

# terapia genica contro la cecità

«degenerazione ereditaria della retina»

- patologia progressiva
- causata da un'alterazione di un singolo gene (RPE65)

La proteina codificata da RPE65 è coinvolta in un processo multi-step chiamato ciclo visivo, che converte la luce che entra nell'occhio in segnali elettrici che vengono trasmessi al cervello. Quando la luce colpisce pigmenti fotosensibili della retina, cambia una molecola chiamata retina 11-cis (una forma di vitamina A) a un'altra molecola chiamata retinico tutto-trans. Questa conversione innesca una serie di reazioni chimiche che creano segnali elettrici. La proteina RPE65 aiuta poi convertire tutto-trans retinico a tornare retina 11-cis così il ciclo visivo può ricominciare.

L'intervento:

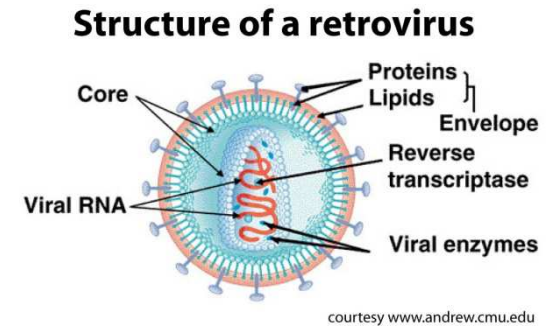
Inserire una versione sana del gene in adenovirus

Il vettore virale, geneticamente modificato, con il DNA del gene sano viene «trasportato» all'interno delle cellule dell'occhio

Per mandare il gene a più cellule possibili, deve essere usata una quantità tale di soluzione da consentire di alzare la retina causandone il temporaneo distacco.



## Retrovirus



- Genoma di RNA singolo filamento.
- Possono infettare solo cellule proliferanti
- Integrazione casuale nel genoma.
- Difficile produrli in grandi quantità (titolo elevato).
- **Poco immunogeni.**
- L'espressione può andare incontro ad attenuazione nonostante la persistenza del virus nel genoma.

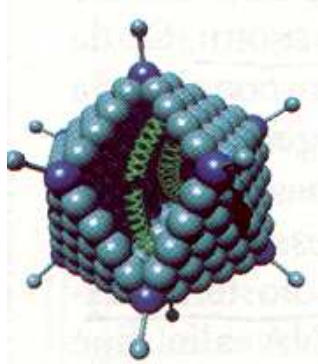
**In assoluto sono i vettori più utilizzati per la terapia genica.**

## a. Emotrasfusione

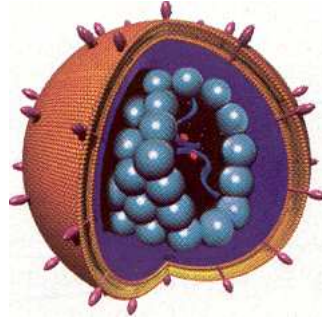
# Vantaggi e svantaggi del doping ematico **omologo**

- 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

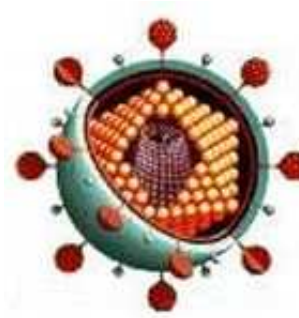
# Vettori virali



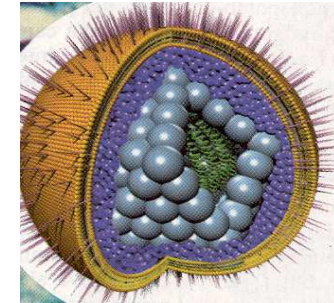
Adenovirus



Retrovirus\*



Lentivirus\*



Herpes-simplex  
virus

## Vantaggi

- ✓ altamente efficienti nel trasferimento genico
- ✓ espressione a lungo-termine\*



AAV\*

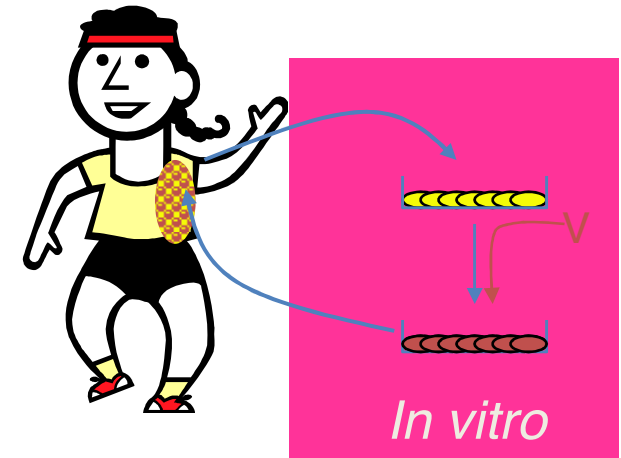
## Svantaggi

- ✓ reazione immunitaria
- ✓ tossicità
- ✓ integrazione random/mutagenesi inserzionale\*

# Tre diverse modalità di trasferire materiale genetico

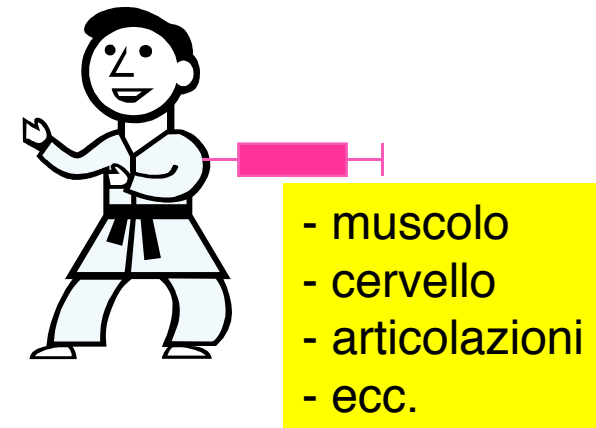
## **EX-VIVO**

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



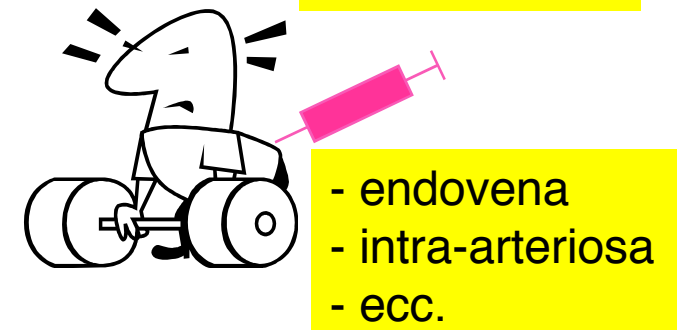
## **IN-VIVO topico**

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



## **IN-VIVO sistemico**

Introdurre dei vettori contenenti materiale genetico nel sangue



# COME PUO' ESSERE UTILIZZATO IL "GENE DOPING"

## Introducendo

### 1. ERITROPOIETINA (*EPO*)

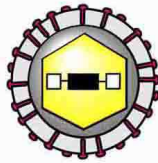
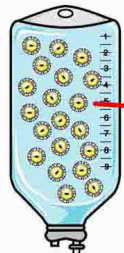
#### **PROBLEMI:**

- **Livelli eccessivi di ematocrito possono causare trombosi**
- **In famiglie in cui sono presenti mutazioni del gene EPO sono frequenti casi di morte precoce per infarto o episodi acuti cerebrali.**
- **Iniezioni ripetute possono avere effetto ridotto per lo sviluppo di risposta immunitaria verso il vettore virale.**
- **Rischio di mutagenesi inserzionale: cancro**



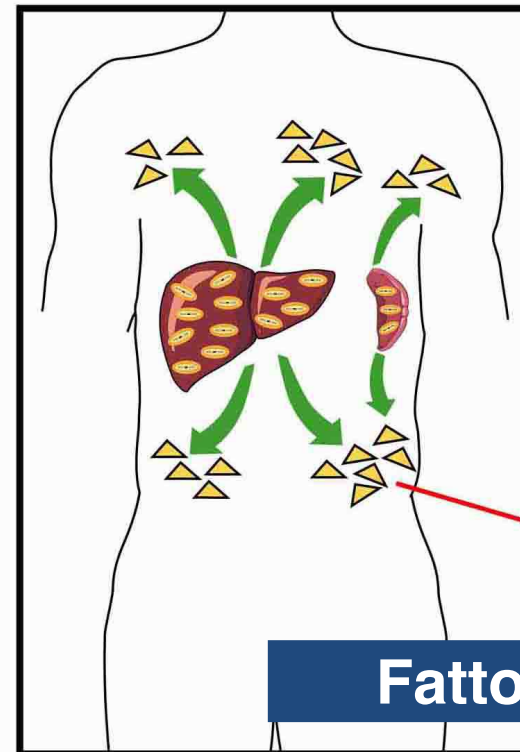
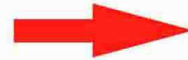
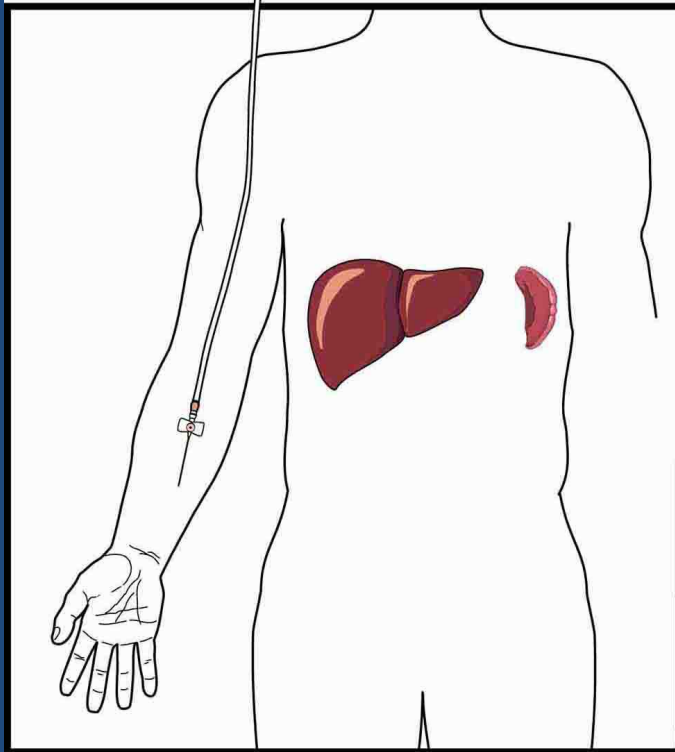
# TERAPIA GENICA «IN VIVO»

## Terapia genica per l'emofilia



Retrovirus with FVIII gene  
(black area = new gene,  
white area = modified viral genes)

Virus contenente il gene  
per il Fattore VIII



FVIII protein

**Fattore VIII**

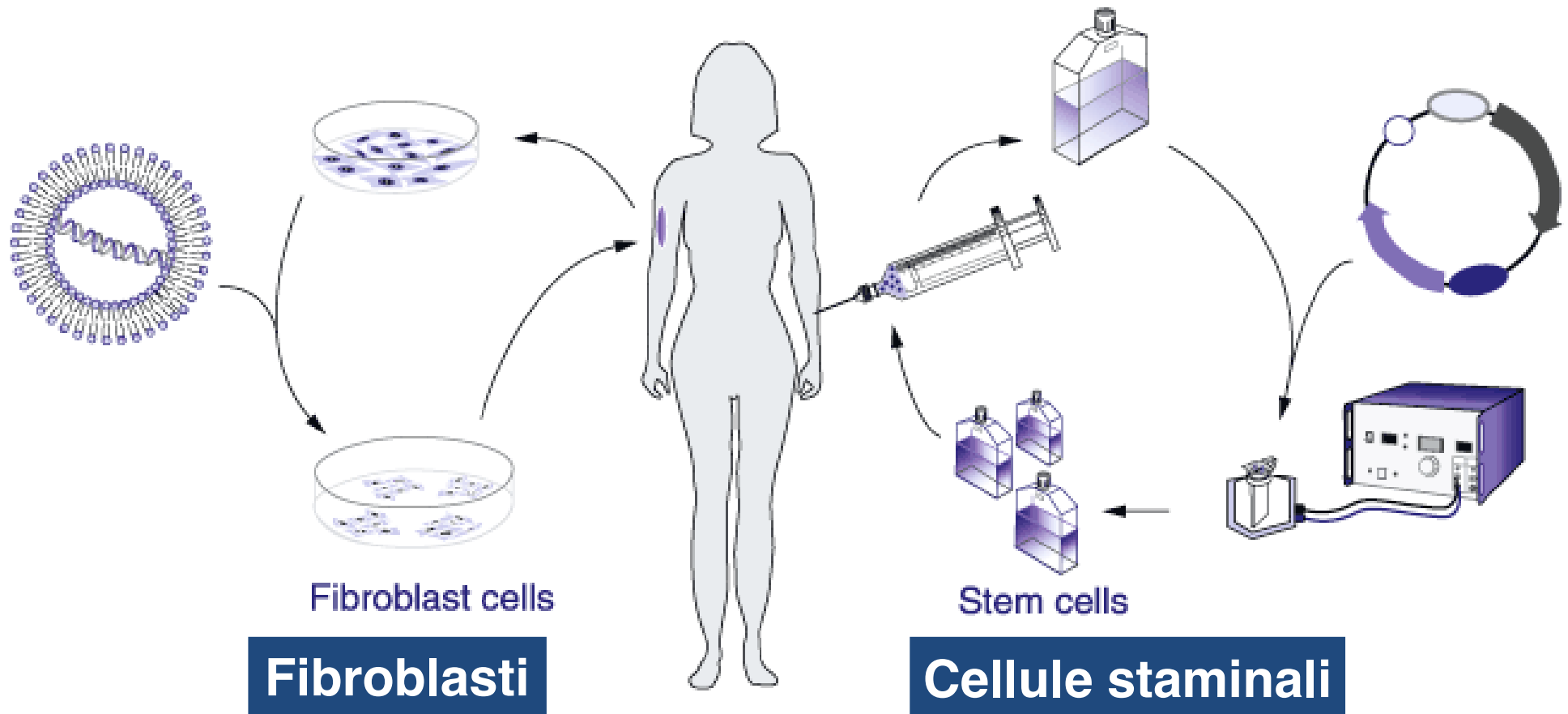
## a. Emotrasfusione

# Vantaggi e svantaggi del doping ematico **autologo** (**autoemotrasfusione**)

- 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

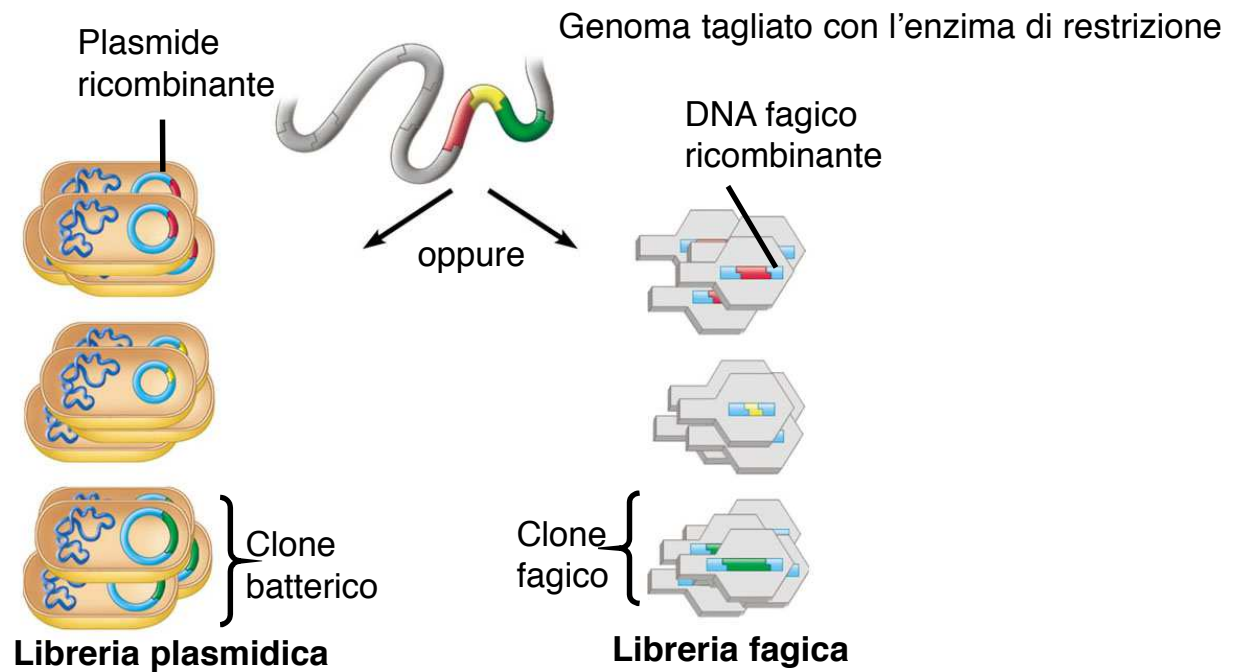
# TERAPIA GENICA EX VIVO

Ex Vivo Gene Therapy



# I geni clonati possono essere conservati in «librerie» genomiche

L'intera collezione di tratti di DNA clonati tramite *shotgun*, derivanti dalla frammentazione di tutto il genoma di una cellula, è chiamata **libreria genomica**.



## a. Emotrasfusione

# Doping Ematico

## Autoemotrasfusione

(per sport di resistenza)

Un mese prima della gara vengono estratti 700-900 ml di sangue, che vengono poi conservati e rimessi in circolo uno o due giorni prima dell'impegno agonistico.

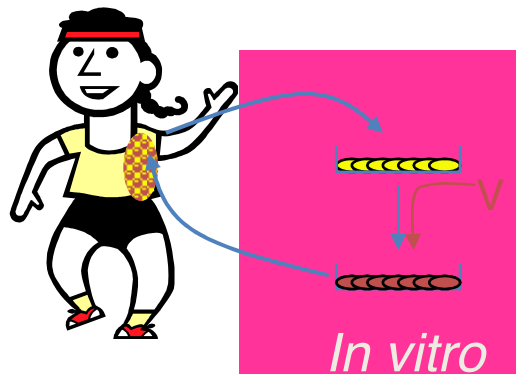
In seguito alla trasfusione si verifica un repentino miglioramento della capacità aerobica e della prestazione nelle prove di resistenza (ciclismo, maratona, nuoto di durata, triathlon, sci nordico ecc.).

- L'autoemotrasfusione non apporta invece benefici significativi agli atleti impegnati in discipline anaerobiche (sollevamento pesi, gare di salto e di sprint, lancio del peso, ecc).

# TERAPIA GENICA SOMATICA

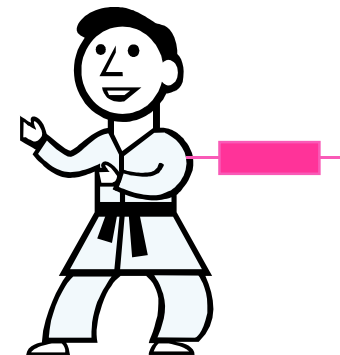
## Ex vivo

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



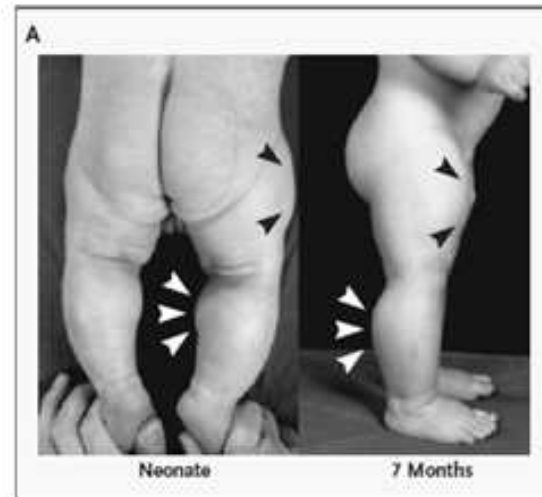
## In vivo

Si avvale dell'utilizzo di vettori contenenti materiale genetico che vengono introdotti in circolo o in un tessuto specifico.



# GENI CORRELATI ALLA CRESCITA E ALLA RIGENERAZIONE MUSCOLARE

## Gene MIOSTATINA nell'uomo:



**Nel 2004, studiando un bambino tedesco di 5 anni che presentava uno sviluppo abnorme della forza e della massa muscolare venne identificata per la prima volta nell'uomo la presenza di una mutazione nel gene che codifica per la miostatina.**

Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE et al. Myostatine mutation associate with gross muscle hypertrophy in a child. New England Journal Medicine 350:2682-88 (2004).

# Limiti della terapia genica

## TRASFERIMENTO

Negli studi sulla terapia genica, la maggior parte degli sforzi si concentra oggi sulla ricerca di vettori in grado di trasferire il DNA in modo efficiente, e soprattutto nel **tipo di cellule desiderato**. In questi ultimi anni sono stati messi a punto una varietà di vettori, alcuni dei quali in grado di fare esprimere il gene estraneo in uno specifico tipo cellulare (come i globuli bianchi, le cellule del muscolo, delle vie respiratorie etc...). Alcuni di questi sono in via di sperimentazione sull'uomo e la speranza è che possano dare buoni risultati.

## LA DURATA DELL'ESPRESSIONE

La terapia genica risulta praticamente inutile se l'espressione del gene "estraneo" non viene mantenuta per un tempo sufficiente. Le ricerche mirano a sviluppare sistemi che permettano un'espressione duratura, in modo da sottoporre il paziente ad un unico trattamento, o al limite a trattamenti ripetuti a distanza di qualche anno.

## LA SICUREZZA DELLA PROCEDURA

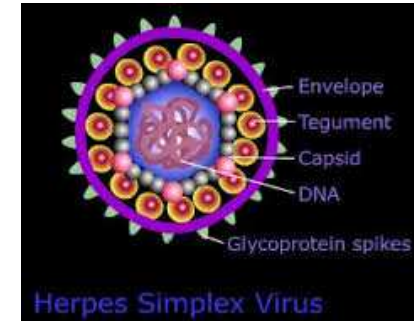
Questo è un problema particolarmente evidente per i vettori virali. Alcuni di questi derivano infatti da virus pericolosi, come l'HIV. E' quindi necessario che prima dell'utilizzo questi vettori rispondano a criteri di sicurezza, e in particolare siano privati di ogni gene che possa determinare la virulenza originaria del virus pur rimanendo in grado di infettare le cellule bersaglio.

## LA REAZIONE IMMUNITARIA

Come ogni altra sostanza estranea, il prodotto del gene nuovo, il gene stesso e soprattutto il vettore possono scatenare una risposta immunitaria da parte dell'organismo ospite. Questa può portare all'eliminazione delle cellule modificate geneticamente, o all'inattivazione della proteina prodotta dal nuovo gene. Nello sviluppo delle nuove strategie di terapia genica si cerca di evitare per quanto possibile che il vettore o il gene estraneo producano una reazione immunitaria. Si tratta di un lavoro difficile e spesso empirico, ma che si avvale sempre più delle nuove scoperte nel campo dell'immunologia.



## Herpes Simplex Virus (HSV)



- ❖ Genoma di DNA doppio filamento molto grande (152 kb) e complesso (>70 geni).
- ❖ Spiccato neurotropismo (infettano preferenzialmente le cellule nervose).
- ❖ Nelle cellule infettate spesso rimane in uno stato latente in forma episomica.
- ❖ Possibile inserire geni molto grandi.
- ❖ Forti reazioni immunologiche.
- ❖ Presenza di anticorpi contro il virus in un'elevata percentuale di casi.

## b. Uso di Emoglobine sintetiche

# Doping ematico

## Darbepoietin $\alpha$

## Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (NESP)

Eritropoietina sintetica analoga all'eritropoietina ricombinante umana

### **EPO iperglicosilata:**

cinque catene carboidratiche  
elevato contenuto in acido sialico  
elevato peso molecolare.  
clearance plasmatica rallentata  
Laboriosa metabolizzazione

Lunga emivita plasmatica  
darbepoietin  $\alpha$  = 25 ore  
rHuEpo = 8,5 ore  
(*MacDougall et al, 2001*)

**La NESP può produrre in breve tempo un aumento dell'ematocrito dai valori normali di 42%-44% fino a valori del 60% mantenendoli elevati a lungo.**

# SCOPI DELLA TERAPIA GENICA

- **Correzione di un errore del metabolismo**
- **Potenziamento di una funzione cellulare (terapia additiva)**
- **Eliminazione di un prodotto cellulare (terapia ablativa)**

# Vettori non virali



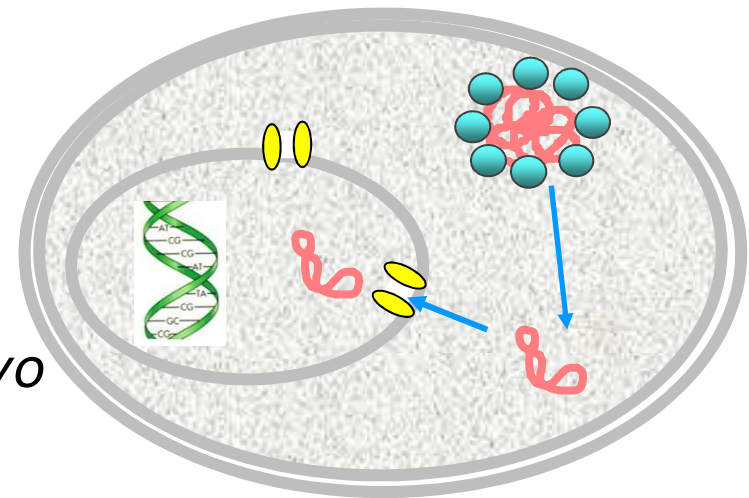
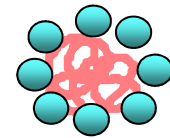
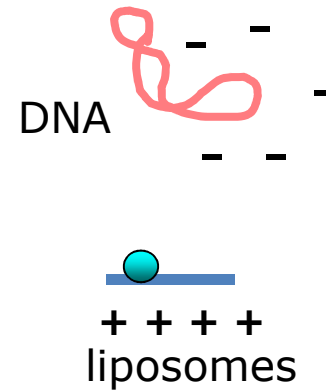
- Liposomi
- Polimeri

## Vantaggi

- ✓ non contengono geni virali
- ✓ limitata immunogenicità
- ✓ anche costrutti molto grandi

## Svantaggi

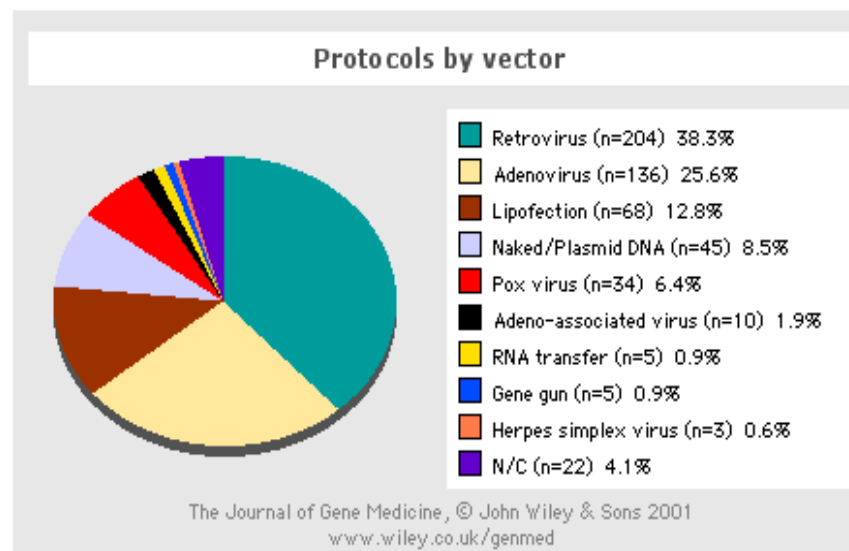
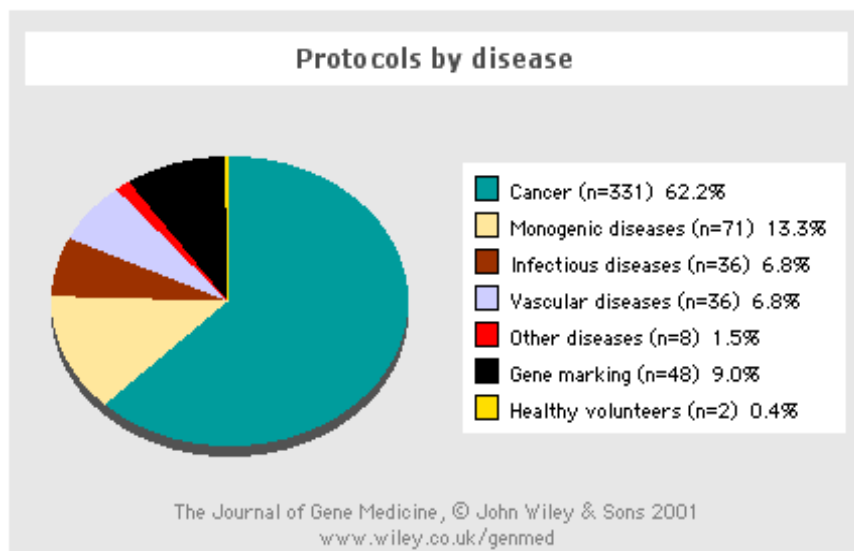
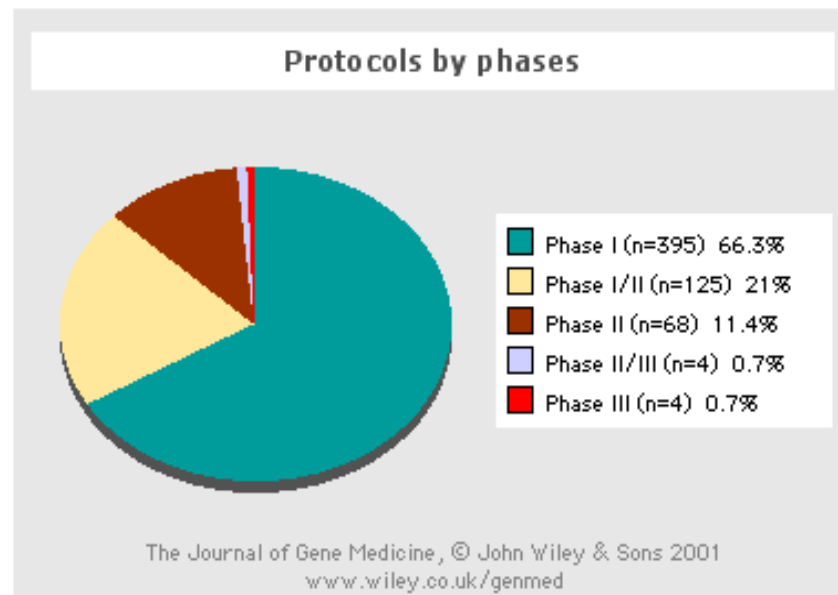
- ✓ poco efficienti nel rilascio genico *in vivo*
- ✓ espressione transitoria
- ✓ difficoltà a rilasciare il DNA nel nucleo



# Terapia genica: quale presente?

Numero di trials:380

Numero di pazienti:3173



# ***Patologie bersaglio***

## ➤ **Monogeniche**

Immunodeficienze - Distrofia muscolare - Fibrosi cistica - Emofilie  
Retinopatie - Emoglobinopatie - Ipercolesterolemia fam -  
Xeroderma pigmentosum

## ➤ **Multifattoriali**

Malattie cardiovascolari e neurodegenerative - Diabete -  
Artrite reumatoide

## ➤ **Tumorali**

Leucemie - Carcinomi

## ➤ **Infettive**

AIDS - Epatite B e C

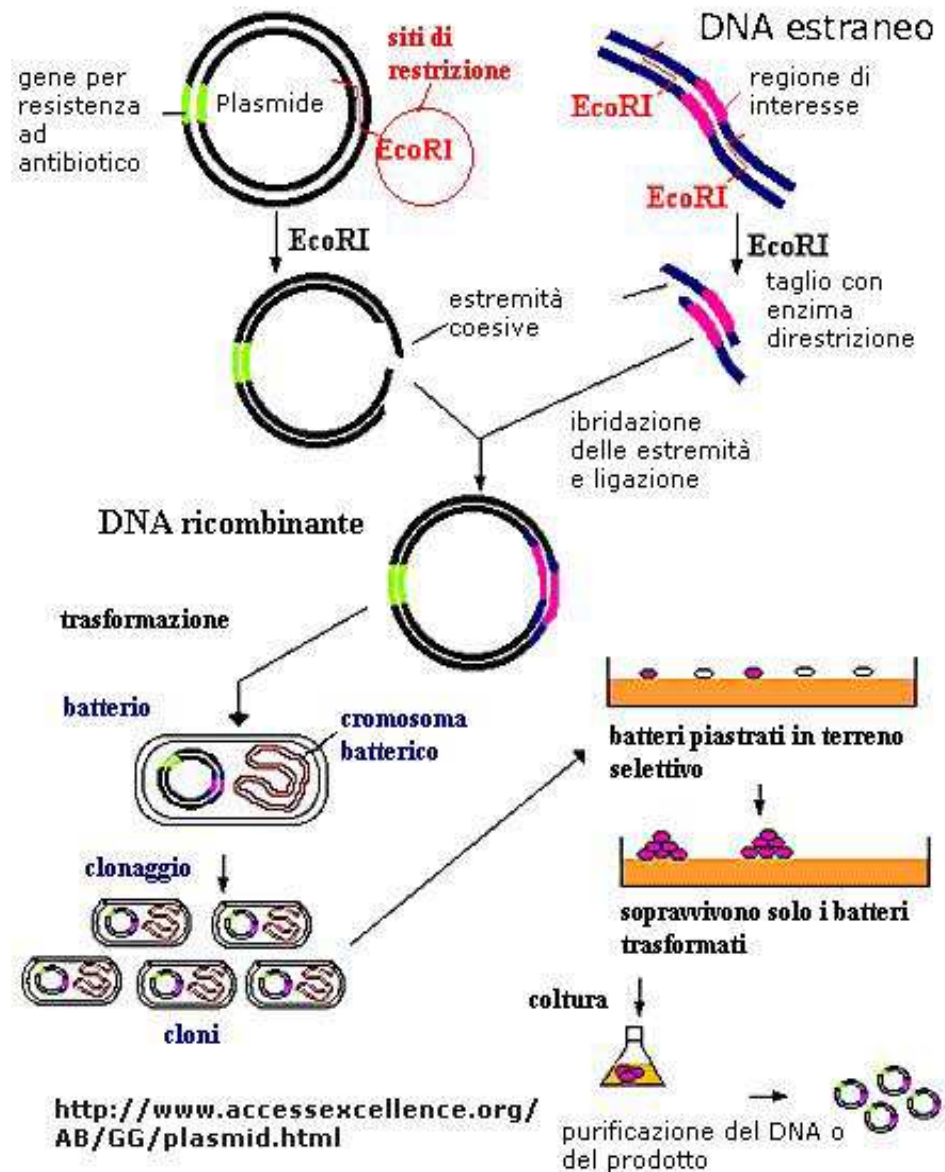
## ➤ **Acquisite**

Traumi (fratture ossee, ferite, ustioni) - Ischemie

# Vettori non virali: PLASMIDI

La conoscenza degli enzimi di restrizione in grado di tagliare il DNA in corrispondenza di sequenze specifiche, hanno portato i biologi molecolari ad utilizzare i plasmidi per introdurre del DNA estraneo, al fine di produrre proteine oppure per amplificare tratti di DNA. Inserendo un gene in un plasmide, ed immettendo il plasmide in un batterio, posso **AMPLIFICARE E PRODURRE** quantità enormi del DNA **RICOMBINANTE**.

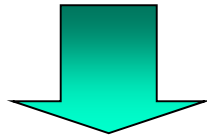
Qui vediamo uno schema dei processi di clonaggio di un plasmide in una cellula batterica.



# ***Terapia genica: quale tipo?***

## **SOMATICA**

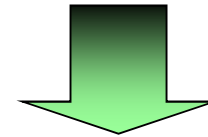
manipolazione dell'espressione genica in cellule differenziate dell'individuo adulto



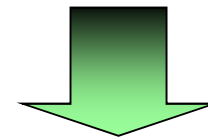
l'alterazione genica riguarda esclusivamente il paziente su cui è stata realizzata

## **GERMINALE**

manipolazione dell'espressione genica in cellule riproduttive



eventuali modificazioni geniche verrebbero trasmesse alla progenie



non autorizzata !!!!



# Come faccio a fare entrare il DNA sano nelle cellule, e cosa succede quando è entrato?

## Utilizzo la tecnologia del DNA ricombinante:

- Inserire il DNA corrispondente al gene da correggere in un vettore
- Il vettore con il “DNA ricombinante” viene poi fatto replicare in modo da formare un clone di cellule identiche.
- Il vettore così replicato viene utilizzato per gli scopi di terapia genica.

# terapia genica di patologie ereditarie

## Fibrosi cistica: malattia autosomica recessiva

- determinata da un deficit di trasporto degli ioni cloro attraverso le cellule epiteliali dovuta a mutazioni nel gene CFTR
- Quadro patologico:
  - distruzione del parenchima polmonare
  - insufficienza pancreatica

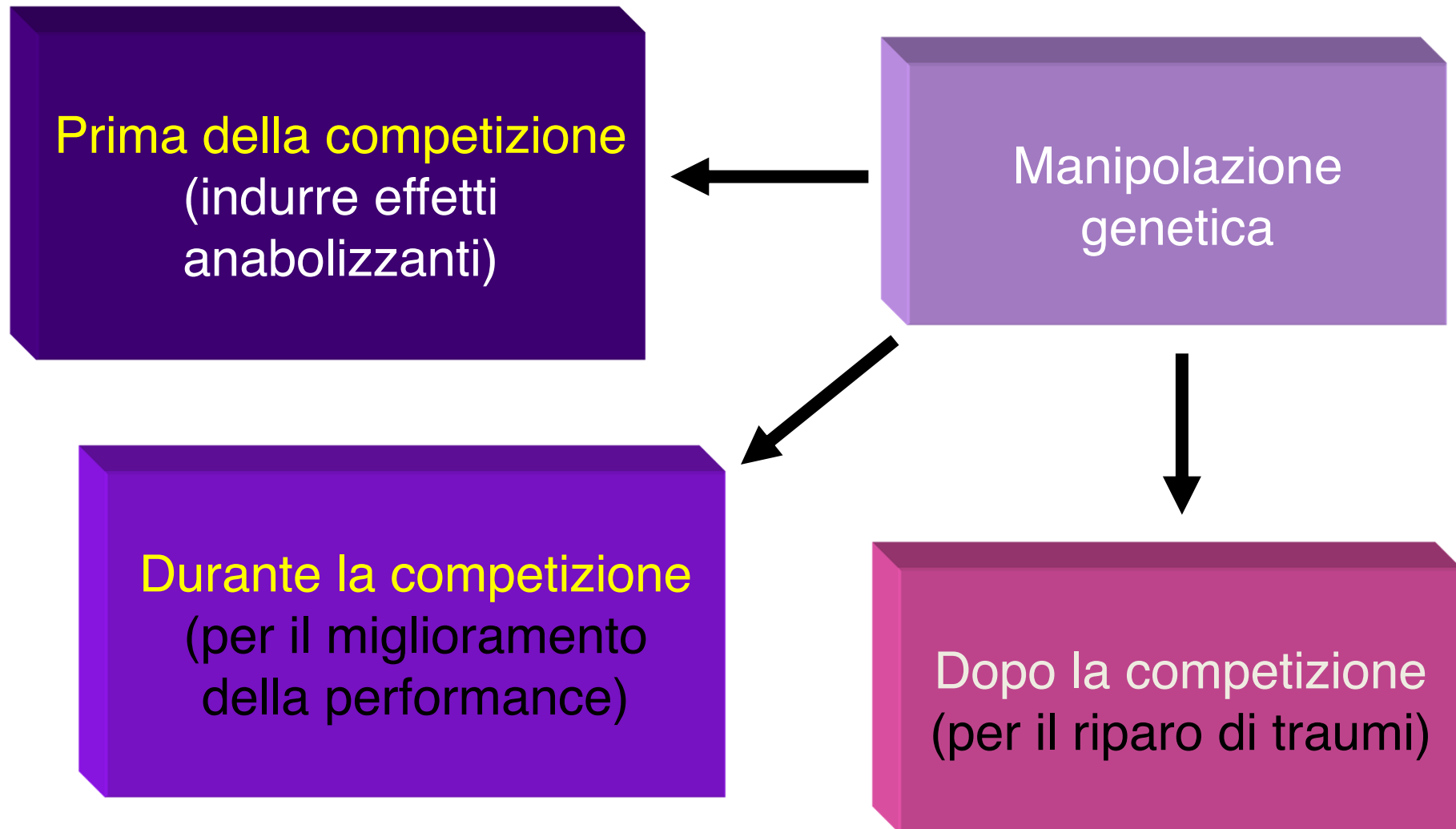


Terapia genica per trasferire un minigene CFTR utilizza :

1. Adenovirus ricombinante: stabilire prima la massima dose tollerabile
2. Liposomi: più sicuri, ma con efficienza inferiore.

# Doping Genetico e Sport

I tre possibili livelli del doping genetico nello sport



# Terapia genica: un po' di storia



Rogers et al  
papilloma virus  
3 pazienti affetti da arginemia:  
nessun risultato

Blase e Bordignon  
pazienti affetti da ADA-SCID:  
risultati parziali in termini di cura definitiva

Cavazzana-Calvo et al  
2 pazienti affetti da X-SCID:  
correzione completa difetto  
immunitario

1970

1980

1990-92

1999

2000

2002-3

Cline et al  
2 pazienti con  $\beta$ -tal Maj:  
presenza per 3-9 mesi  
del transgene nel s.p. e  
m.o.

Morte del paziente  
(Jesse G.) dopo  
trial clinico con  
AdV per deficit  
OTC



Aiuti et al  
2 pazienti con ADA-SCID:  
reversione completa  
fenotipo clinico fino a 1  
anno



Casi di leucemia cellule T  
dopo 3 anni da trial  
clinico con RV per X-  
SCID (2/15)

## Terapia genica: SCID (sindrome da immunodeficienza combinata grave)

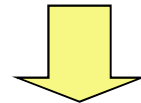
- È una malattia geneticamente determinata e si trasmette come un carattere autosomico recessivo



Assenza completa di cellule B e T

- Gli individui affetti non producono né anticorpi, né immunità cellulo-mediata
- Contraggono gravi e ricorrenti infezioni batteriche

In più del 15% dei casi la SCID è associata alla mancanza di un enzima: l' adenosina deaminasi (**ADA**)

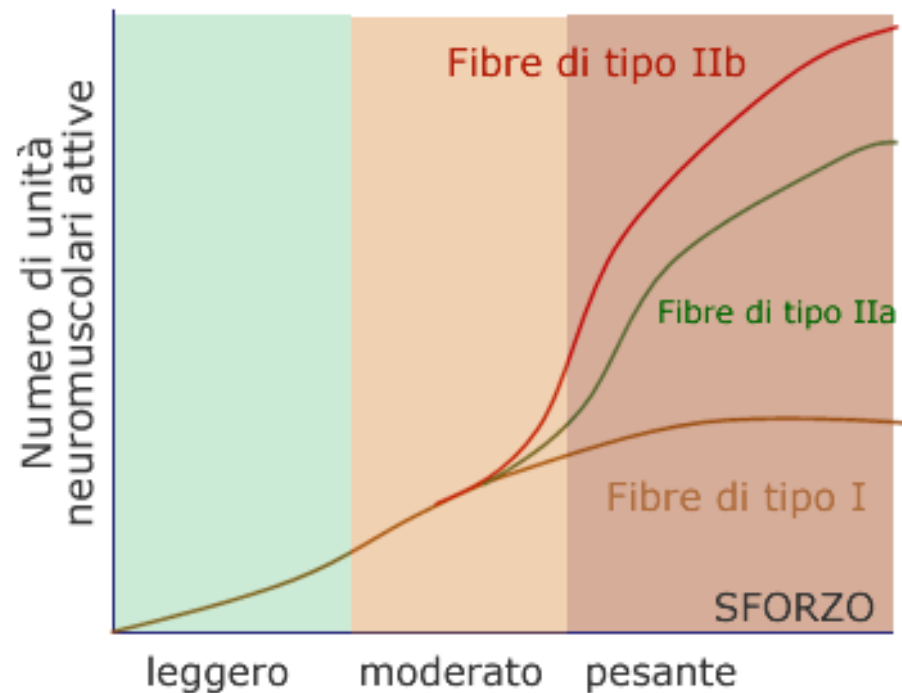


L'adenosina deaminasi è un enzima che interviene nel metabolismo delle purine; se entrambe le copie del gene ADA sono difettose, nelle cellule dell'individuo affetto si accumula deossiadenosina. Questa, a concentrazioni elevate, è tossica per le cellule del SISTEMA IMMUNITARIO: i linfociti B e T

# GENI CORRELATI ALLA RESISTENZA (ENDURANCE)

## 2. PPARD (*peroxisome proliferator-activated receptor delta*)

L'espressione di **PPARD** promuove il passaggio delle fibre muscolari da tipo **IIb** a contrazione rapida a quelle di tipo **IIa** e di tipo **I** lente che è quello che accade fisiologicamente in seguito ad esercizio fisico costante.



E' stato prodotto un composto sintetico (GW501516) in grado di legarsi al recettore del PPARD e di attivarlo e potrebbe quindi rappresentare un possibile agente dopante nell'uomo.

# Terapia genica EX VIVO

## **Trapianto di cellule geneticamente modificate:**

- Estrazione/preparazione delle cellule primarie o di linea del paziente
- Trasferimento del gene in vitro
- Reimpianto delle cellule nel paziente

## **Problemi:**

- Cellule autologhe ingegnerizzate: laboriosa, vita limitata
- Cellule eterologhe ingegnerizzate: reperibilità, compatibilità

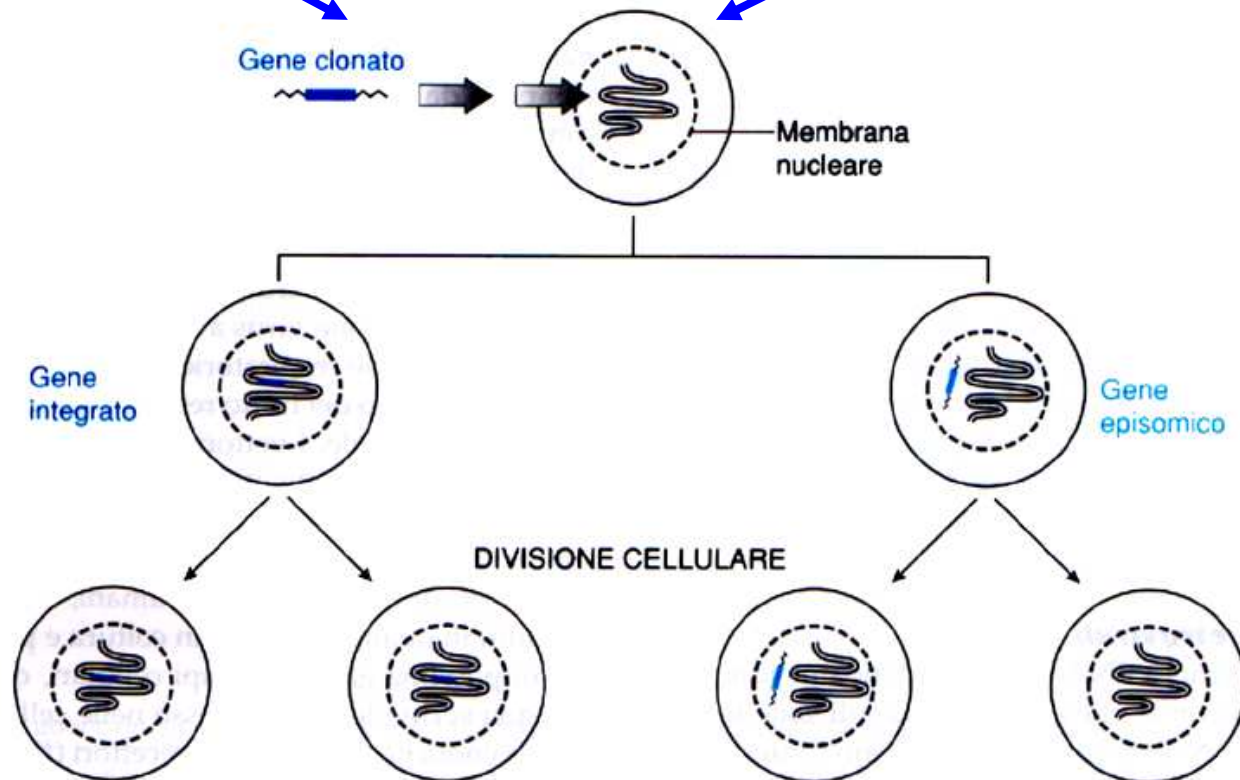
# Come faccio entrare il DNA nelle cellule, e cosa gli succede quando è entrato?

1. Vettori non virali

2. Vettori virali

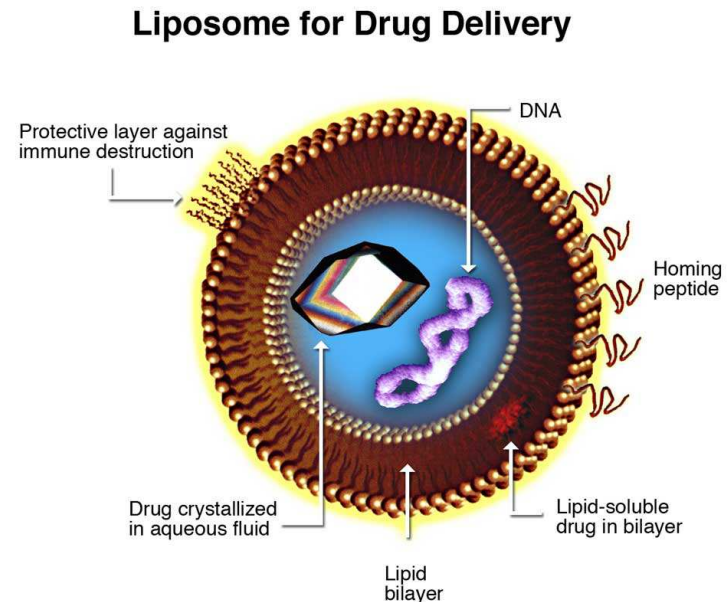
Integrazione casuale

Integrazione sito-specifica





## Vettori non virali: LIPOSOMI



**LIPOSOMI** -> minuscole sfere cave costituite da una membrana lipidica che riveste una soluzione acquosa contenenti geni. I liposomi, grazie alla loro struttura, aderiscono facilmente alla membrana cellulare permettendo ai geni, da essi trasportati, di penetrare nella cellula. I geni presenti nei plasmidi, dentro il liposoma, possono raggiungere il nucleo.

Rispetto ai virus, hanno il vantaggio di non presentare alcun rischio in termini di sicurezza, ma tendono ad avere un EFFICIENZA MINORE e ad essere POCO SELETTIVI. Inoltre, date le piccole dimensioni del liposoma, solo i plasmidi più compatti (e contenenti DNA non molto grande) possono venire incapsulati. Si sta cercando di migliorare l'efficienza dei LIPOSOMI con i LIPOPLESSI, liposomi con cariche positive in più nella parte idrofila dei lipidi che costituiscono la membrana di queste particelle

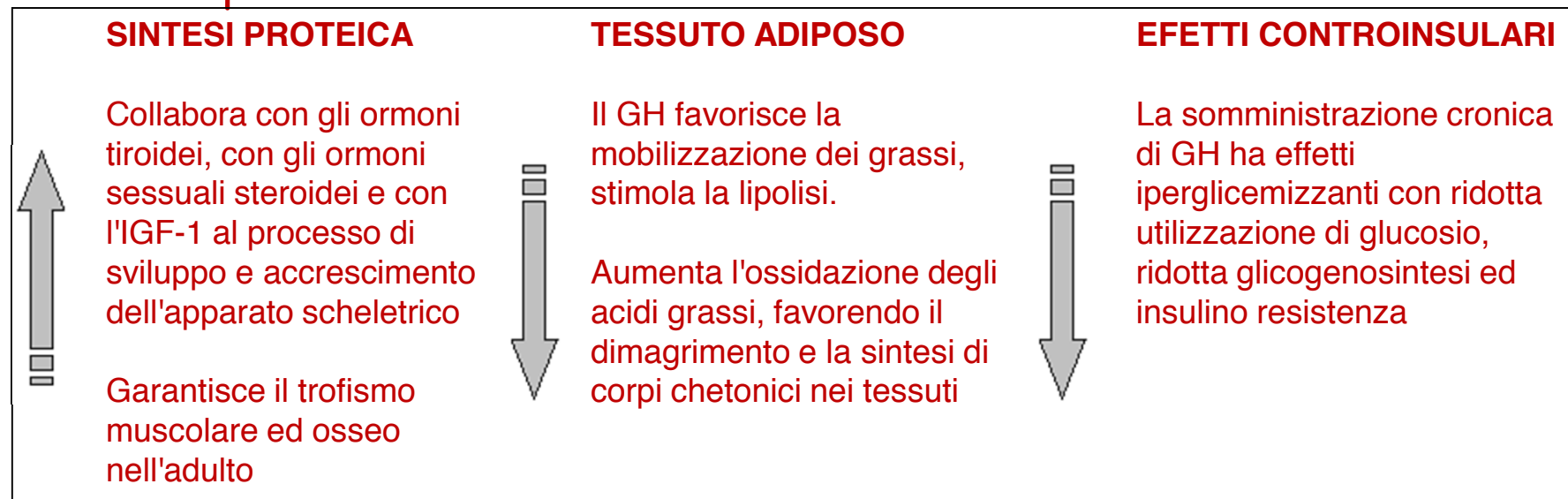
# GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA MUSCOLARE e ALLA RIGENERAZIONE

## 2. ORMONE DELLA CRESCITA (GH)

L'attività sportiva rappresenta un forte stimolo per la secrezione di GH

La secrezione di GH nel corso di attività fisica è influenzata in modo particolare da:

- Intensità dello sforzo
- Allenamento del soggetto
- Temperatura ambiente



## Vantaggi dei vettori non virali

- Impossibile la generazione di nuovi virus patogeni
- Riduzione del rischio di reazione immunitaria
- Possono trasferire molti tipi diversi di molecole, e permettono di trasdurre molecole di DNA anche molto grandi
- Possibilità di produzione in grandi quantità a basso costo

## Svantaggi dei vettori non virali

- Scarsa efficienza sia di trasduzione che di integrazione
- Se integrati possono a loro volta dare mutagenesi inserzionale

# GENI CORRELATI ALLA RESISTENZA (ENDURANCE)

## 3. GENI CORRELATI ALL'ANGIOGENESI

- fattore di crescita endoteliale vascolare (**VEGF**)
- fattore di crescita tissutale (**TGF**)
- fattore di crescita degli epatociti (**HGF**)

L' espressione di questi geni infatti è correlata all'aumento della formazione di nuovi vasi sanguigni e quindi ad un maggiore apporto di ossigeno ai tessuti con conseguente aumento della capacità di resistenza allo sforzo fisico.

# COME PUO' ESSERE UTILIZZATO IL "GENE DOPING"

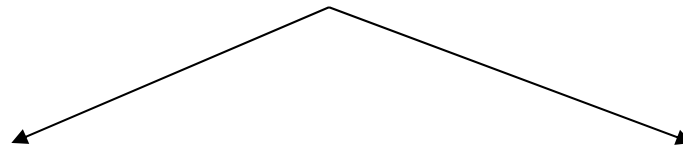
## Introducendo

### 1. ERITROPOIETINA (*EPO*)

1. Svensson E et al. Human Gene Therapy (1997): utilizzarono vettori adenovirali per il trasferimento del gene per l'EPO in topi e scimmie
  - Effetto: aumento dell'ematocrito dal 49 a 81% nel topo e dal 40 al 70% nelle scimmie dopo iniezione intramuscolo.
  - Durata: l'effetto perdurava più di un anno nel topo e circa 12 settimane nella scimmia.
2. Zhou S et al. Gene Therapy 1998: ottennero gli stessi risultati ripetendo esperimenti simili in altri primati.

**GENI CORRELATI ALL'AUMENTO  
DELLA MASSA MUSCOLARE e ALLA  
RIGENERAZIONE**

**CRESCITA E RIGENERAZIONE  
DEL TESSUTO MUSCOLARE**



**AUMENTANDO**

L'ESPRESSIONE DI GENI  
CHE HANNO UN'AZIONE  
STIMOLANTE COME:

**IGF1 e GH**

**INIBENDO**

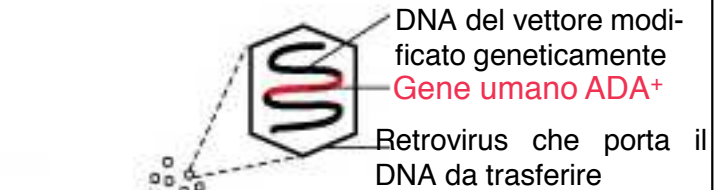
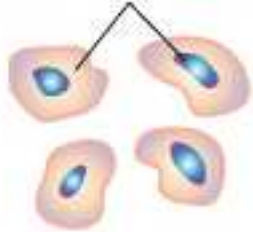
GENI CHE DI SOLITO  
AGISCONO COME  
REPRESSORI DEI  
PROCESSI DI CRESCITA  
COME:

**MIOSTATINA**

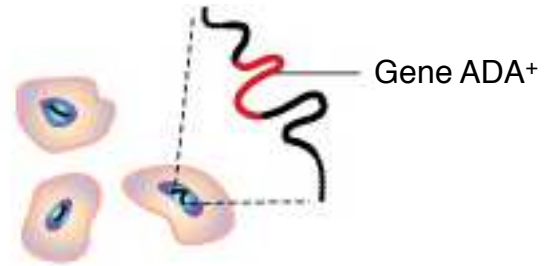
# TERAPIA GENICA *ex vivo* per la SCID

1  
Si isolano i linfociti dal bimbo malato

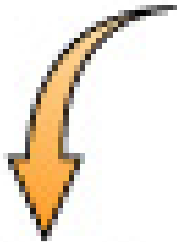
Linfociti tra cui le cellule T



2  
Infezione delle cellule T con il vettore retrovirale con il gene ADA<sup>+</sup>



Il DNA del retrovirus si integra nelle cellule T

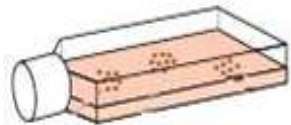


Bimbo con SCID dovuta a mancanza di ADA



La sintesi di ADA recupera le funzioni immunitarie relativamente al tempo in cui restano in circolo; è necessario ripetere i trattamenti

4  
Le cellule T che esprimono il transgene ADA<sup>+</sup> vengono iniettate nel sistema circolatorio del paziente



3  
Le cellule T sono messe in coltura e si verifica l'espressione del transgene ADA<sup>+</sup>

Le cellule T sono messe in coltura e si verifica l'espressione del transgene ADA<sup>+</sup>

## Caratteristiche del vettore ideale per la TERAPIA GENICA

- Efficiente (trasdurre un numero di cellule elevato).
- Dovrebbe garantire una prolungata produzione (espressione) della proteina terapeutica (a livelli adeguati).
- Capace di incorporare DNA di varie dimensioni.
- Dovrebbe garantire la regolazione (trascrizionale, traduzionale o post-traduzionale) dell'espressione del gene terapeutico
- Non dovrebbe essere patogeno.
- Somministrabile direttamente nel paziente.
- In grado di raggiungere specificamente le cellule bersaglio.
- Ben tollerato.
- Non dovrebbe avere componenti che inducono risposta immune.
- Facile da produrre in maniera riproducibile.



# Vettori non virali



## ***DNA nudo – Elettroporazione - Microiniezione***

### Vantaggi

- ✓ assenza di immunogenicità
- ✓ alta efficienza *ex-vivo*
- ✓ rilascio di grossi geni
- ✓ utile per le vaccinazioni a DNA

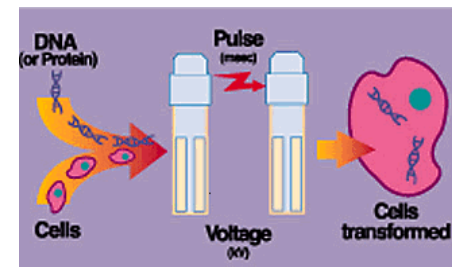
### Svantaggi

- ✓ inefficiente nel trasferimento genico
- ✓ instabilità nella maggior parte dei tessuti
- ✓ espressione transitoria
- ✓ *in vivo* solo per tessuti superficiali (cute), muscolo, cuore, fegato

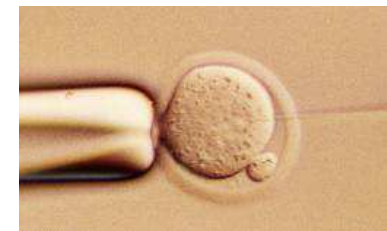
### Iniezione diretta



### Elettroporazione



### Microiniezione



# ***Terapia genica: come?***

*ex vivo*

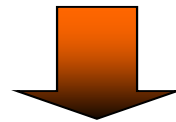
Le cellule bersaglio (es. SC) sono prelevate dal paziente, modificate geneticamente in laboratorio e reintrodotte nello stesso individuo



- ✓ no problemi immunologici
- ✓ efficienza delle metodiche di trasduzione in vitro
  - ✓ solo alcune malattie (immunologiche, ematologiche, metaboliche)

*in situ*

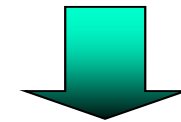
il transgene viene rilasciato localmente nel sito di azione mediante iniezione i.m. o intratumorale o per inalazione ecc...



- ✓ tumori localizzati; patol. dell'apparato respiratorio (es. FC); tessuto cutaneo ecc...

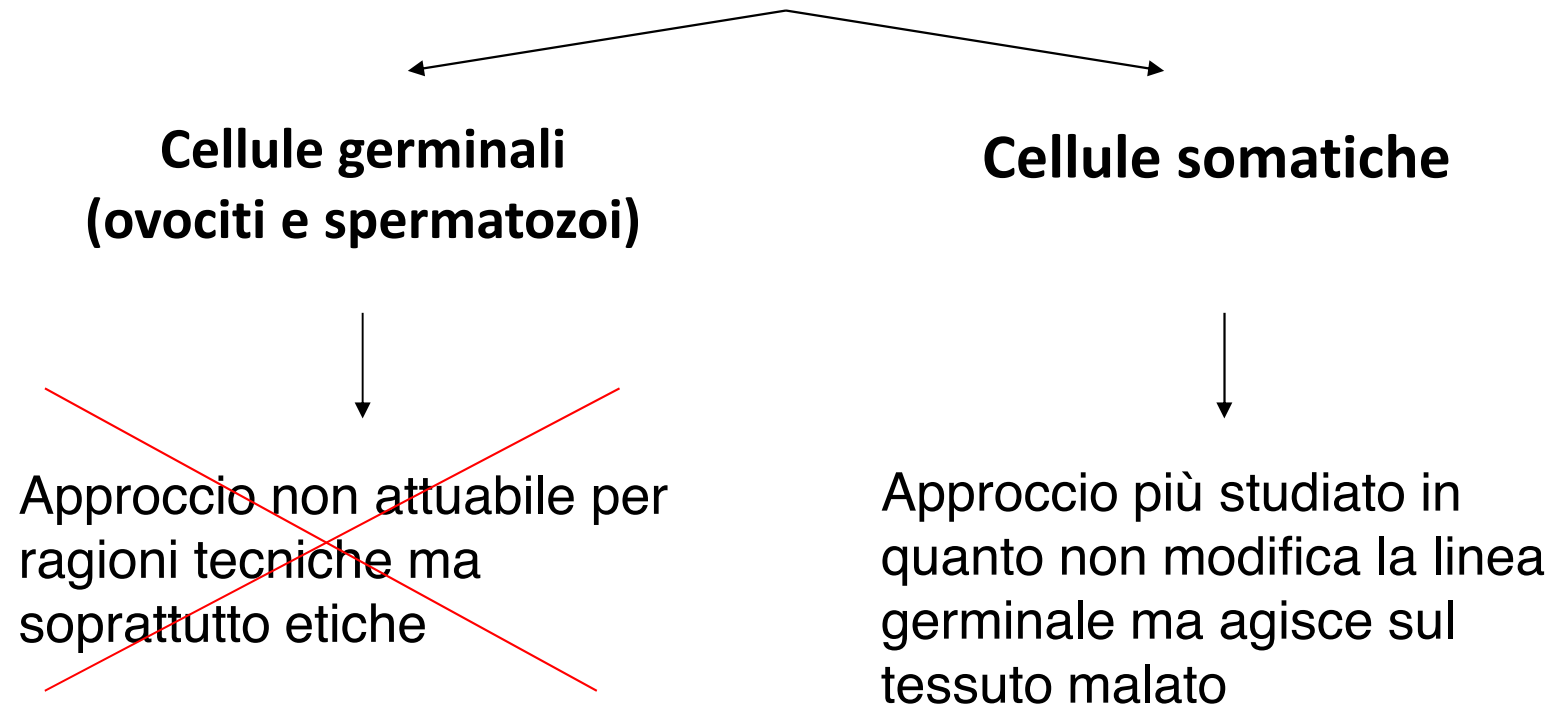
*in vivo*

il transgene viene somministrato per via sistemica e.v. nel corpo del paziente



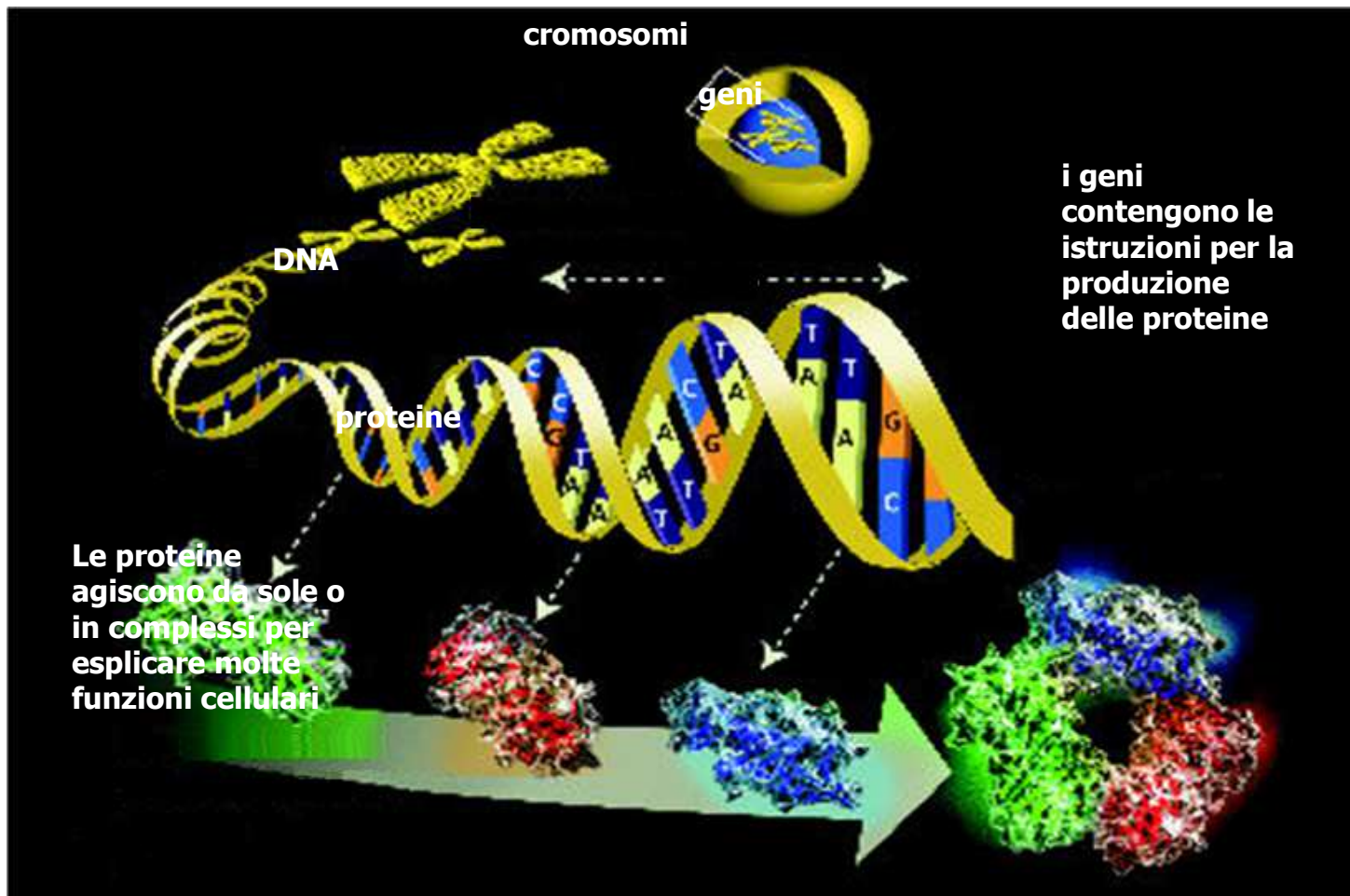
- ✓ cellule e tessuti poco accessibili
- ✓ scarsa efficienza di trasduzione, barriere

# TARGET DI TERAPIA GENICA



**Motivi etici lo impediscono**

# Doping Genetico e sport



IL VETTORE IDEALE NON ESISTE.

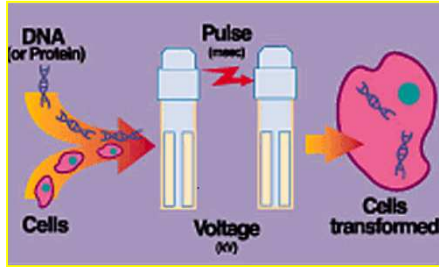
IL VETTORE PIU' UTILIZZATO  
OGGI E' IL VETTORE  
RETROVIRALE

# TERAPIA GENICA: come ?

DNA nudo



elettroporazione



pistola genica



microiniezione



liposomi

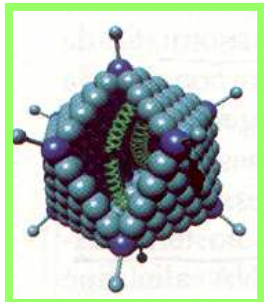


non-virali

**virali**



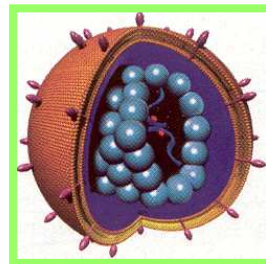
Vettore per rilasciare e proteggere il gene terapeutico



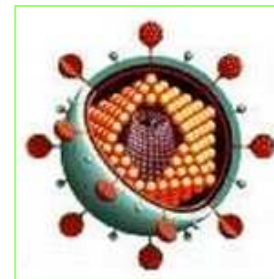
**adenovirus**



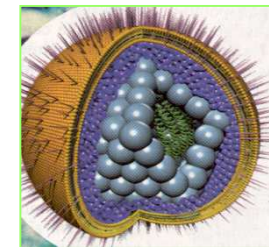
**adenoassociati**



**retrovirus**



**lentivirus**



**herpesvirus**

## “Genetic Doping” with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable

Françoise Lasne,<sup>1,\*</sup> Laurent Martin,<sup>1</sup> Jacques de Ceaurriz,<sup>1</sup> Thibaut Larcher,<sup>2</sup>  
Philippe Moullier,<sup>2,3,\*</sup> and Pierre Chenuaud<sup>2</sup>

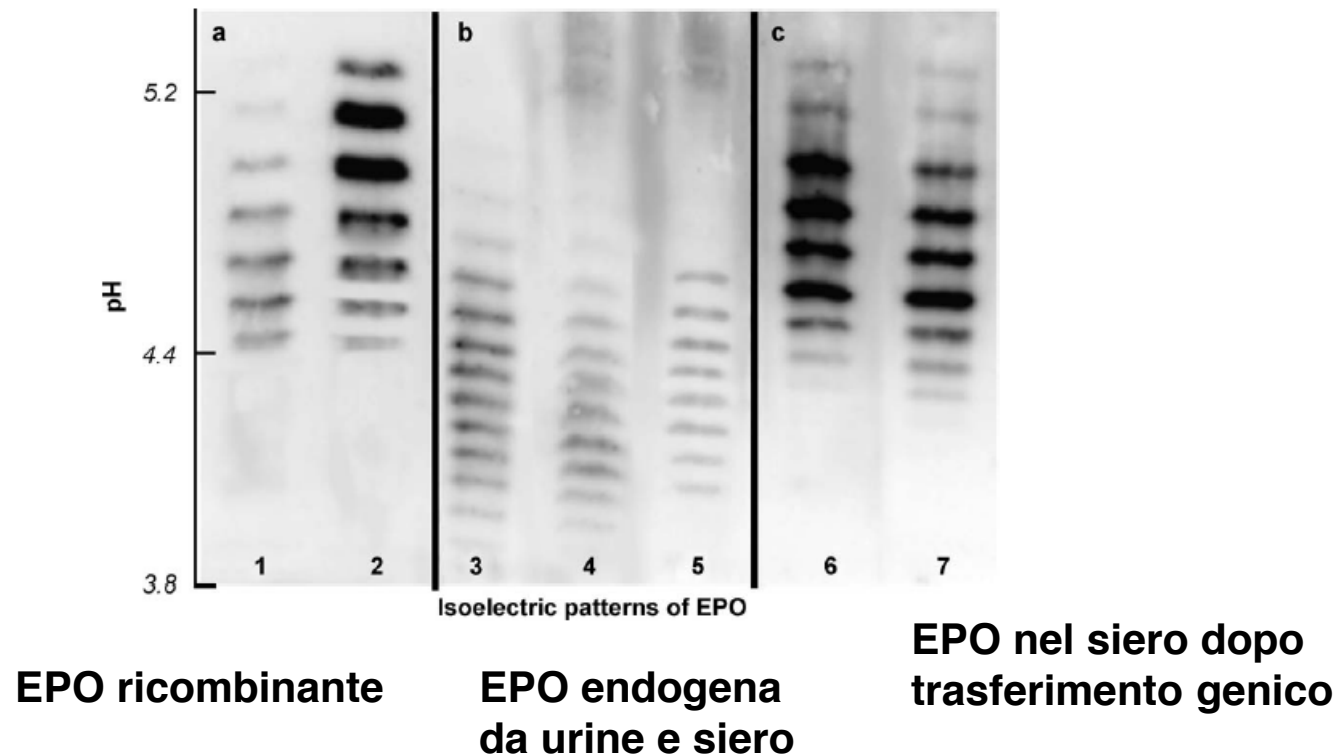
<sup>1</sup>National Anti-Doping Laboratory, 92290 Chatenay-Malabry, France

<sup>2</sup>INSERM U 649, CHU Hotel-Dieu, and

<sup>3</sup>EFS Pays de Loire, 44035 Nantes, France

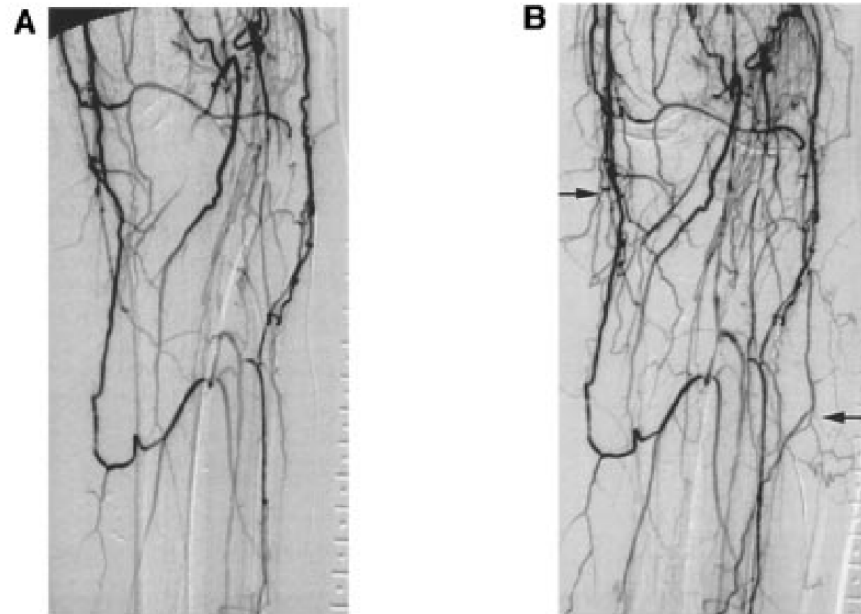
\*To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Laboratoire de Therapie Genique, Inserm U649, CHU Hotel-Dieu, Bat. J. Monet, 30 boulevard Jean Monnet, 44035 Nantes, Cedex 01, France

Available online 8 August 2004



# Terapia genetica su umani tramite VEGF (vascular endothelial growth factor)

Vasi sanguigni di un  
paziente che ha  
ricevuto l'inoculazione  
di un "vettore" in cui è  
stato inserito il gene  
VEGF



**PRIMA**

**DOPO**

Baumgartner et al. *Circulation* (1998) 97:1114-1123



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

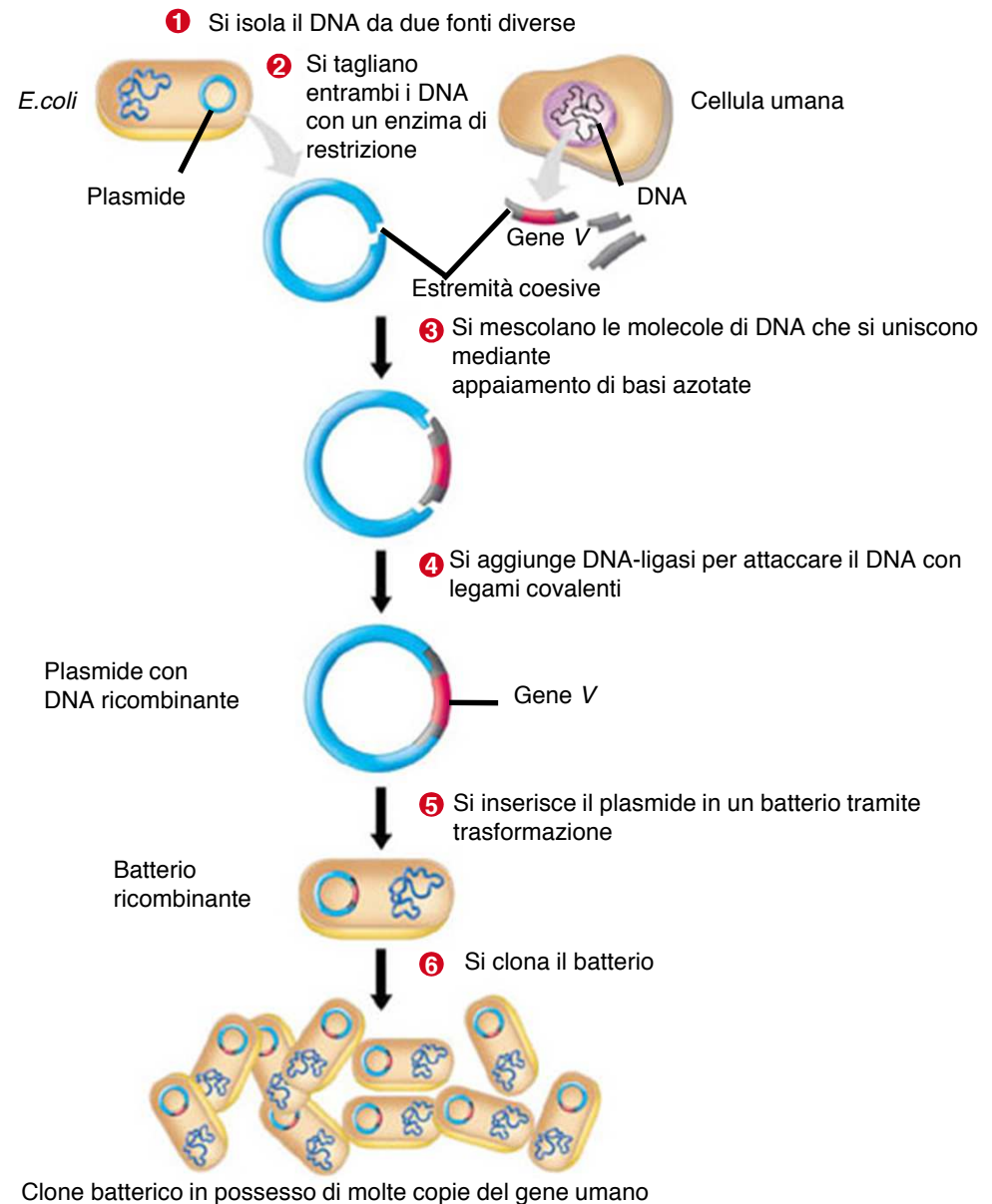
- ex vivo, tessuto emopoietico:  
modificare l'emopoiesi (recettore EPO, trasporto O<sub>2</sub>...)
- in vivo locale (es. muscolo):  
fattori di crescita, modificatori fibre muscolari  
cardio-modulatori, ecc.
- in vivo locale (es. articolazioni):  
sostanze antidolorifiche, inibitori dell'infiammazione,  
fattori di riparo, ecc.
- in vivo sistemico:  
anabolizzanti, fattori ormonali, killer del dolore, controllo  
vascolare, ecc.

# ***Vettore ideale***



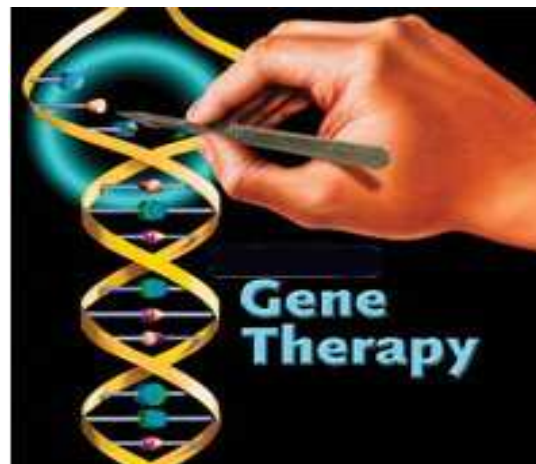
- ✓ di facile produzione e in elevate quantità
- ✓ esprimibile per un lungo periodo e regolabile
- ✓ sicuro, cioè inerte dal punto di vista immunologico
- ✓ selettivo per determinati tipi cellulari
- ✓ capace di trasportare geni piccoli e grandi
- ✓ capace di integrarsi in siti specifici del genoma
- ✓ capace di infettare sia cellule in divisione che quiescenti

# Clonazione di un gene in un plasmide batterico:



# Terapia genica

La terapia genica è un approccio terapeutico innovativo nella cura di pazienti con patologie acquisite o ereditarie, che prevede l'inserzione di geni nel genoma di cellule bersaglio del paziente ricevente.



## Malattie in studio con la TERAPIA GENICA

Le esigenze che devono essere soddisfatte da un esperimento di terapia genica somatica limitano il numero delle malattie suscettibili di tale terapia, anche perché molte malattie possono essere risolte da un trapianto d'organo (midollo osseo, fegato)

Elenco di malattie che possono essere prese in considerazione a diverso titolo per una terapia genica

MALATTIA	GENE IMPLICATO
Citrullinemia (accumulo di ammoniaca nel sangue)	Arginino-succinato sintetasi
<b>Deficienze immunitarie</b>	<b>Adenosina deaminasi (ADA)</b> <b>Purina nucleoside fosforilasi</b>
<b>Anemia falciforme</b>	<b>Beta-globina</b>
Emofilia A	Fattore VIII coagulazione
Emofilia B	Fattore IX coagulazione
Ipercolesterolemia	Recettore LDL
Fibrosi Cistica	CFTR
Duchenne	Distrofina
Fenilchetonuria	Fenilalanina idrossilasi

# GENI CORRELATI ALL'AUMENTO DELLA MASSA MUSCOLARE e ALLA RIGENERAZIONE

## 1. IGF-1 MUSCOLARE (*mIGF-1*)

Il gene IGF-1 ha il compito di riparare il muscolo, quando, durante l'esercizio, subisce microtraumi.

La fibra si ripara e cresce, ritrovandosi con più miofibrille rispetto a prima della lesione. Il segnale di stop alla crescita viene dato da un'altra proteina, la **miostatina**.

L'inserimento di un extra-gene IGF-1, permetterebbe di aggirare il meccanismo di equilibrio, inducendo l'ipertrofia del muscolo e la crescita incontrollata delle fibre.

## Vantaggi dei vettori virali

- Alta efficienza di trasduzione

## Svantaggi dei vettori virali

- Possibilità di generare nuovi virus patogeni per ricombinazione con eventuali virus presenti nell'ospite
- Mutagenesi inserzionale (per quelli che si integrano in maniera casuale nel genoma)
- Molecole di DNA di dimensioni limitate
- Reazioni immunitarie
- Costi elevati

# ***Terapia Genica: perché ?***

Molte patologie, dovute a proteine malfunzionanti, non sono trattabili con terapie tradizionali

Negli anni '70 nasce l'idea della **Terapia Genica**

(rilascio intracellulare di materiale genetico per generare un effetto terapeutico, con diverse strategie di intervento a seconda dello scopo prefissato)

