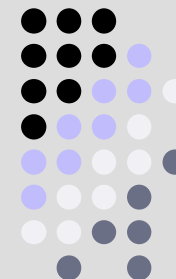


# ***La lotta al doping nel terzo millennio: problematiche biologiche e farmacologiche***



**Piero Sestili**

**Dipartimento di Scienze Biomolecolari  
Università degli Studi di Urbino Carlo Bo**



# Lista WADA



- Ultimo aggiornamento al gennaio 201

## **SUMMARY OF MAJOR MODIFICATIONS AND EXPLANATORY NOTES**

### **2018 PROHIBITED LIST**

Substances and methods prohibited at all times  
(In- and Out-of-Competition)

Prohibited Substances

## S1 ANABOLIC AGENTS

- Dihydrotestosterone was renamed to its International Non-proprietary Name (INN) [androstanolone].
- 1-androsterone [3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androst-1-ene-17-one] was added in S1.a as an example of exogenous anabolic steroid.
- LGD-4033 and RAD140 were added as further examples of SARMs.

## S2 PEPTIDE HORMONES, GROWTH FACTORS, RELATED SUBSTANCES AND MIMETICS

- For clarity and accuracy Section S2 was reorganized.
- ARA290 was removed as an example in this section because current literature suggests it does not meet inclusion criteria.
- Deslorelin, goserelin, nafarelin and triptorelin were added as examples of 2.1.
- Growth Hormone fragments were included in 2.3 with AOD-9604 and hGH 176-191 added as examples;
- CJC-1293 was added as example of GHRH and tabimorelin as a further example of GH secretagogue.
- GHRP-1, -3, -4, and -5 were added as examples of GHRP.
- Thymosin- $\beta$ 4 and its derivatives, e. g. TB-500, were added as example of prohibited growth factors.
- Cobalt: It is re-iterated that vitamin B12, which contains cobalt, is not prohibited.

## S3 BETA-2-AGONISTS

- Dosing parameters of salbutamol were revised to make it clear that divided doses of salbutamol may not exceed 800 micrograms over any 12 hours (see figure).



- Tulobuterol was added as an example.
- The statement on the urinary thresholds was improved.

## S4 HORMONE AND METABOLIC MODULATORS

- Clomifene is now stated by its INN.
- In the absence of an INN, the IUPAC name of GW1516, 2-[2-methyl-4-[(4-methyl-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thiazol-5-yl)methylthio]phenoxy] acetic acid as well as an alternative name [GW501516] were included.
- SR9009, a Rev-Erb- $\alpha$  agonist, was added as an example of Activators of the AMP-activated protein kinase (AMPK).

## S5 DIURETICS AND MASKING AGENTS

- In consideration of the information published in scientific articles since 2012 that particularly addresses the ability of glycerol to influence the athlete's plasma volume and parameters of the Athlete Biological Passport (ABP), the magnitude of glycerol-derived effects is regarded as minimal. Therefore, glycerol has been removed from the Prohibited List.

## Prohibited Methods

### M2 CHEMICAL AND PHYSICAL MANIPULATION

- M2.2: the permitted volume and timing of intravenous infusions were changed from infusions of no more than 50 mL per 6-hour period to no more than a total of 100 mL per 12-hour period in order to allow greater flexibility for the safe administration of non-prohibited therapeutic substances, for example, iron.
- To reflect medical practice, "hospital admissions" has been changed to "hospital treatments" and "clinical investigations" has been clarified as "clinical diagnostic investigations".

## S8 CANNABINOIDS

- The category Cannabimimetics, e.g. "Spice, JWH-018, JWH-073, HU210" was changed to "synthetic cannabinoids, e.g.  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) and other cannabimimetics". The synthetic cannabinoids are one of the main classes of novel psychoactive substances that have constantly emerging new drugs and changing availability. The previous list of examples continues to be prohibited, but are currently used less commonly. "Other cannabimimetics" replaced these examples.
- Cannabidiol is no longer prohibited. Synthetic cannabidiol is not a cannabimimetic; however, cannabidiol extracted from cannabis plants may also contain varying concentrations of THC, which remains a prohibited substance.

## S9 GLUCOCORTICOIDS

- Examples of commonly used glucocorticoids were added for greater clarity.

## Substances Prohibited in Particular Sports

### P1 ALCOHOL

- After careful consideration and extensive consultation, Alcohol was excluded from the Prohibited List. The intent of this change is not to compromise the integrity or safety of any sport where alcohol use is a concern, but rather to endorse a different means of enforcing bans on alcohol use in these sports. The four International Federations (IF) affected by this change have been alerted sufficiently in advance in order to amend their rules and to put in place protocols to test for alcohol use and appropriately sanction athletes who do not abide by the rules of their sport. Control of the process will allow IF more flexibility in applying rules or thresholds as they see fit. The National Anti-Doping Organizations are no longer obliged to conduct tests but may assist IF and National Federations where appropriate.

### P2 BETA BLOCKERS

- For logical consistency, the category known as P2, Beta Blockers was renamed P1, Beta Blockers.

## MONITORING PROGRAM

The following were added to evaluate misuse in sport:

- 2-ethylsulfany-1H-benzimidazole (bemitil) *in- and out-of-competition*
- Hydrocodone *in-competition*.

Mitragynine and telmisartan were removed from the Monitoring Program because the required information on prevalence was obtained.



**M3**

## **GENE DOPING**

- The definition has been revised to include current and emerging gene manipulating technologies.

**M3**

## **GENE DOPING**

- The definition has been revised to include current and emerging gene manipulating technologies.

## **Substances and Methods Prohibited In-Competition**

**S6**

## **STIMULANTS**

- 1,3-Dimethylbutylamine was added as an example. This substance can be found in some dietary supplements.

# Nuove sostanze, nuovi casi

- Il meldronato, o meldonium (Grindeks): proibito da quest'anno.
- In test animali, il farmaco si è dimostrato efficace nell'incrementare la mobilità muscolare, prolungare i tempi di resistenza allo sforzo prima che sia avvertita la fatica e proteggere contro alcuni effetti dello stress.

# Nuove sostanze, nuovi casi

- Secondo una revisione delle sue proprietà pubblicata nel 2015, diminuisce anche i livelli di acido lattico e urea nel sangue degli atleti, accorciando i tempi di recupero dopo un'intensa attività fisica.



# Nuove sostanze, nuovi casi

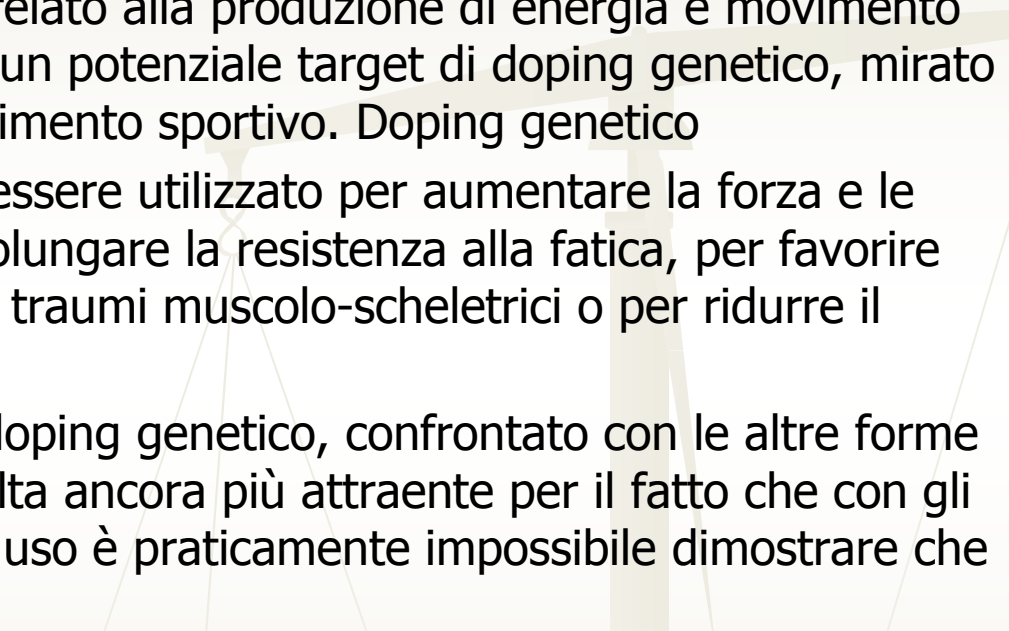
- Il meccanismo d'azione consisterebbe nell'inibizione competitiva dell'enzima gamma-butirrobetaina diossigenasi, importante nella sintesi della L-carnitina

# Già 124 casi nel 2016

Name	Country	Sport	Where	Consequences	source
Alexander Povetkin	Russia	Boxing	World Boxing Council Heavyweight Title match	Unknown	
Maria Sharapova	Russia	Tennis	2016 Australian Open	Provisionally suspended	[24][25]
Semion Elistratov	Russia	Short track speed skating		Provisionally suspended	
Pavel Kulizhnikov	Russia	Speed skating	2016 World Sprint Speed Skating Championships – Men	Provisionally suspended	
Alexander Markin	Russia	Volleyball		Unknown	
Eduard Vorganov	Russia	Cycling		Unknown	
Ekaterina Bobrova	Russia	Figure skating	2016 European Figure Skating Championships	Unknown	
Eduard Latypov	Russia	Biathlon		Provisionally suspended	[30]
Olga Abramova	Ukraine	Biathlon		Unknown	[31]
Artem Tyshchenko	Ukraine	Biathlon		Unknown	[32]
Davit Modzmanashvili	Georgia	Wrestling		Suspension temporarily lifted	
Yekaterina Konstantinova	Russia	Short track speed skating		Unknown	
Abeba Aregawi	Sweden	Athletics		Unknown	[28]
Endeshaw Negesse	Ethiopia	Athletics		Unknown	[29]
Alexey Mikhaltsov	Russia	Rugby sevens		Unknown	
Alena Mikhaltsova	Russia	Rugby sevens		Unknown	
Nataliia Lupu	Ukraine	Athletics		Unknown	
Yuliya Yefimova	Russia	Swimming	Two out of competition tests— 15 & 24 February	Unknown	[36]
Nadezhda Sergeeva	Russia	Bobsleigh		Suspension temporarily lifted	



Doping genetico?

- 
- Ogni processo fisiologico correlato alla produzione di energia e movimento potrebbe essere considerato un potenziale target di doping genetico, mirato ad ottenere un maggior rendimento sportivo. Doping genetico
  - Il doping genetico potrebbe essere utilizzato per aumentare la forza e le dimensioni muscolari, per prolungare la resistenza alla fatica, per favorire una guarigione più veloce da traumi muscolo-scheletrici o per ridurre il dolore associato allo sforzo.
  - Inoltre, la prospettiva di un doping genetico, confrontato con le altre forme di doping farmacologico, risulta ancora più attraente per il fatto che con gli attuali controlli antidoping in uso è praticamente impossibile dimostrare che vi sia stato doping genetico.

# Geni correlati alla resistenza allo sforzo

- Eritropoietina: La performance negli sport di resistenza può essere implementata aumentando il trasporto di ossigeno ai tessuti, accrescendo il numero di globuli rossi
- L'eritropoietina, aumenta il numero di eritrociti interagendo con uno specifico recettore (EPOR) presente a livello delle cellule precorritrici dei globuli rossi nel midollo osseo.
- Nel 1964, lo sciatore della Finlandia Settentrionale Eero Mäntyranta rese inutili gli sforzi degli avversari vincendo due ori olimpici ai Giochi di Innsbruck, in Austria.
- Mäntyranta era portatore di una rara mutazione nel gene per EPOR che lo rendeva stabilmente attivo anche in presenza di livelli bassi di EPO, aumentando dunque la produzione di globuli rossi con conseguente aumento della capacità di trasporto dell'ossigeno del 25-50%.

# Geni correlati alla resistenza allo sforzo

- Il potenziale terapeutico dell'EPO e di tutti i fattori stimolanti la produzione di EPO è correlato al trattamento delle gravi anemie;
- la possibilità di utilizzare tecniche di terapia genica al posto della somministrazione del peptide ricombinante, inducendo in questo modo la sintesi spontanea di EPO nell'organismo è oggetto di studio.
- Un primo trial clinico ha utilizzato la terapia genica per l'EPO in pazienti con anemia da insufficienza renale cronica, con un approccio *ex vivo* che non ha al momento fornito i risultati sperati.

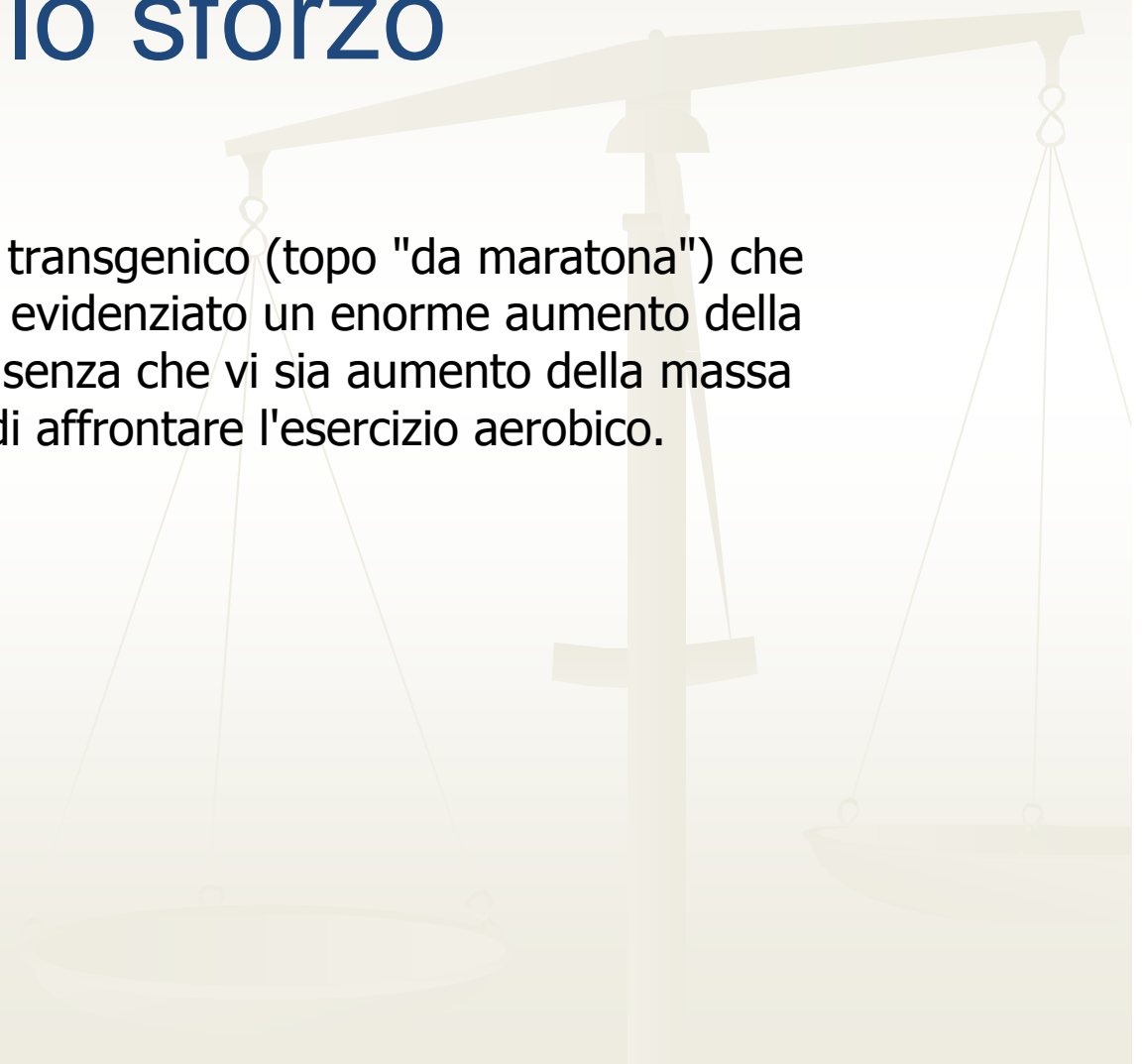


# Geni correlati alla resistenza allo sforzo

- PPARD (peroxisome proliferator-activated receptor delta): studi su modelli animali hanno mostrato l'esistenza di un'altra famiglia di geni in grado di aumentare significativamente la performance atletica, il PPARD (peroxisome proliferator-activated receptor delta) e i co-attivatori alfa e beta (PPARGC1A e PPARGC1B). L'espressione di PPARD in particolare è in grado di promuovere il passaggio delle fibre muscolari da tipo IIb a contrazione rapida (dette anche bianche, "fast twitch") a quelle di tipo IIa (intermedie) e di tipo I lente (dette anche rosse, "slow twitch"), che è quello che accade fisiologicamente in seguito ad esercizio fisico costante

# Geni correlati alla resistenza allo sforzo

- Studi su un modello murino transgenico (topo "da maratona") che sovraesprime PPARG hanno evidenziato un enorme aumento della resistenza allo sforzo fisico, senza che vi sia aumento della massa muscolare e della capacità di affrontare l'esercizio aerobico.

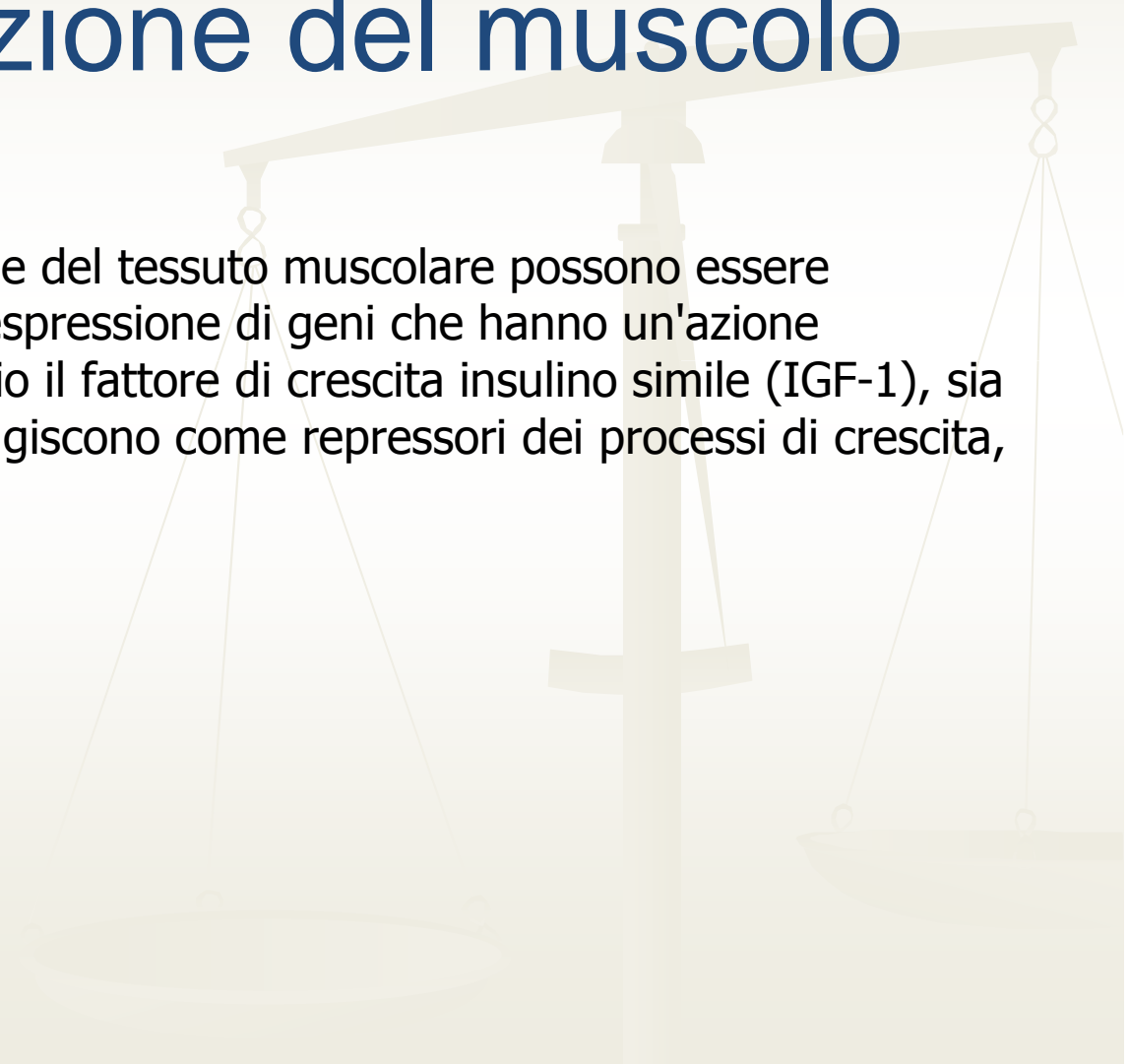


# Geni correlati alla resistenza allo sforzo

- Geni correlati all'angiogenesi: Target potenziali di doping genetico sono anche i geni appartenenti alle famiglie del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), del fattore di crescita tessutale (TGF) e del fattore di crescita degli epatociti (HGF); l'espressione di questi geni è infatti correlata all'aumento dell'angiogenesi (formazione di nuovi vasi sanguigni).
- La formazione di nuovi vasi fa sì che vi sia un maggiore apporto di sangue, quindi di ossigeno, al cuore, ai muscoli, al fegato e al cervello, con conseguente aumento della capacità di resistenza allo sforzo fisico.

# Geni correlati all'accrescimento e rigenerazione del muscolo

- La crescita e la rigenerazione del tessuto muscolare possono essere ottenute sia aumentando l'espressione di geni che hanno un'azione stimolante, come ad esempio il fattore di crescita insulino simile (IGF-1), sia inibendo geni che di solito agiscono come repressori dei processi di crescita, ad esempio la miostatina.



# Geni correlati all'accrescimento e rigenerazione del muscolo

- Ormone della crescita (somatotropina - GH): Il GH o ormone somatotropo è una proteina (un peptide lineare composto da 191 aminoacidi) prodotta dalle cellule somatotrope dell'ipofisi anteriore. Ha secrezione pulsatile, con picchi più frequenti e più ampi nelle prime ore di sonno.

# Geni correlati all'accrescimento e rigenerazione del muscolo

- L'isoforma muscolare specifica del fattore di crescita insulino simile (mIGF-1) gioca un ruolo molto importante nella rigenerazione muscolare. Il gene IGF-1 ha il compito di riparare il muscolo, quando, durante l'esercizio, subisce microscopici traumi. La proteina IGF-1, prodotta dal gene, provoca la crescita del muscolo. Il segnale di stop alla crescita viene dato da un'altra proteina, la miostatina. L'inserimento di un gene IGF-1 sovrannumerario permetterebbe di aggirare il meccanismo di equilibrio, inducendo l'ipertrofia del muscolo. Topi transgenici per mIGF-1 mostrano un'ipertrofia selettiva della muscolatura del tronco e degli arti (23,3 % di massa muscolare in più) e un aumento della forza muscolare (14,4 % in più)..

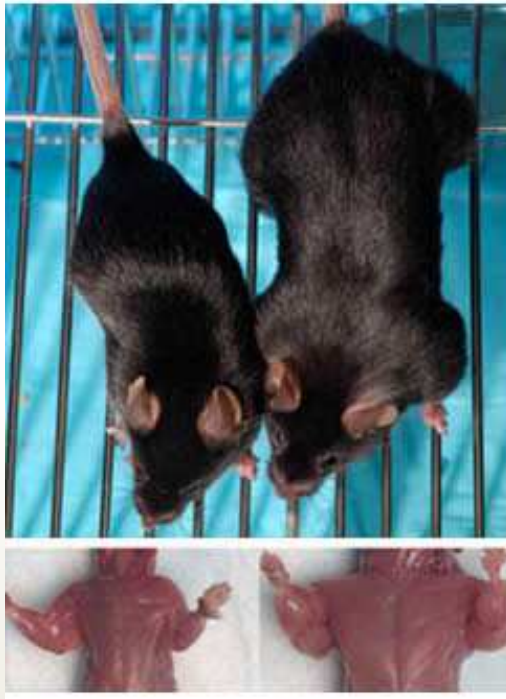


# Geni correlati all'accrescimento e rigenerazione del muscolo

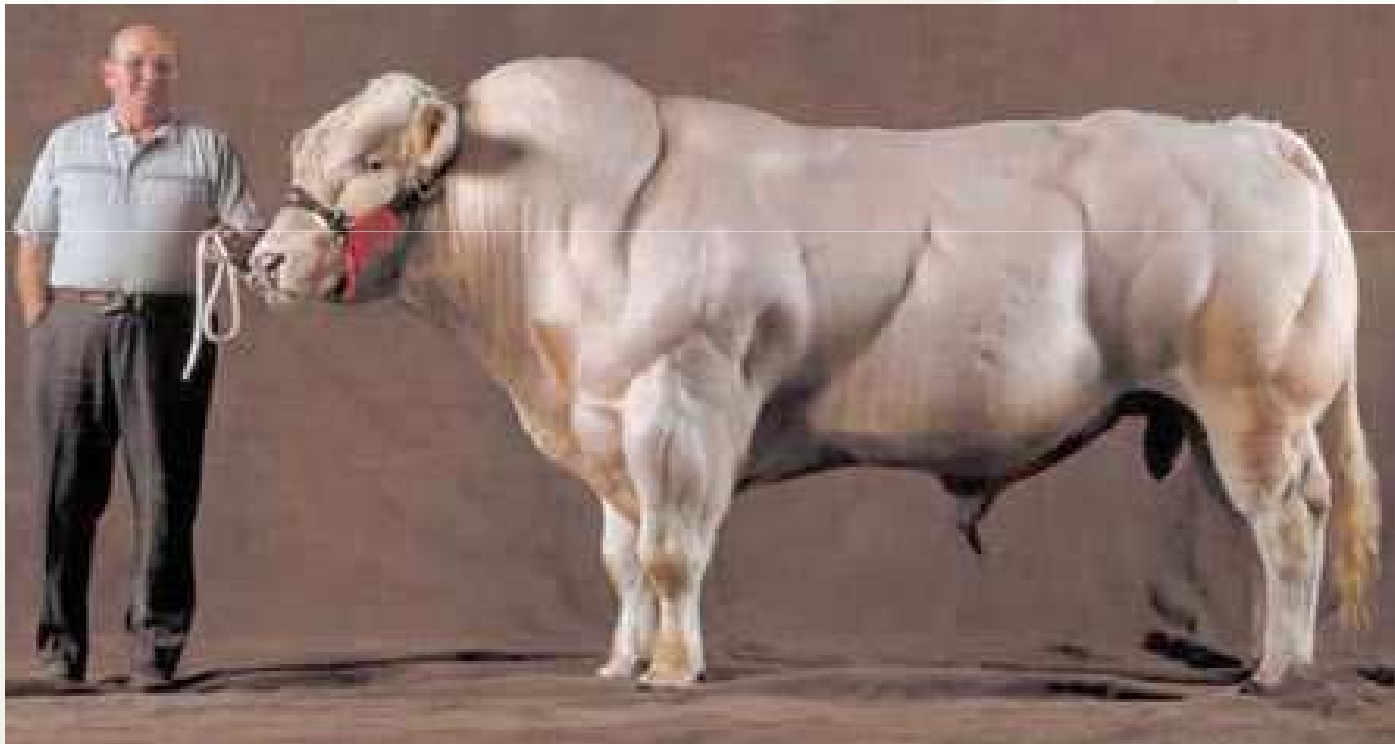


- Miostatina: La miostatina è una proteina scoperta nel 1997 durante studi sulla differenziazione e proliferazione cellulare. Per capire quale fosse la sua reale funzione, furono fatti accoppiare dei topi in cui era stato inibito il gene che codifica per la miostatina.
- Nel 2004, studiando un bambino 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. L'influenza sull'espressione fenotipica era identica a quella osservata nei topi da laboratorio e nelle razze bovine studiate, tanto che la forza muscolare del bambino era simile a quella di un adulto. Aspetto molto interessante è che la madre del bambino, dalla quale ha ereditato uno dei due alleli mutati, era una sprinter professionista e che alcuni dei suoi antenati sono ricordati proprio per la loro forza straordinaria.

# Geni correlati all'accrescimento e rigenerazione del muscolo



# Geni correlati all'accrescimento e rigenerazione del muscolo



# Doping genetico



- Attualmente, la terapia genica viene effettuata in ambienti ben controllati e i vettori utilizzati per il trasferimento genico sono prodotti in laboratori certificati dove vengono ampiamente testati. Se la terapia genica fosse usata per migliorare le prestazioni atletiche, è molto probabile questa costosa filiera di qualità non esisterebbe, cosicché i rischi aumenterebbero considerevolmente.
- Rischi del doping genetico I rischi generali per la salute derivanti dalla terapia genica sono di diverso tipo e dipendono anche dal vettore utilizzato (DNA, sostanze chimiche, virus ecc.) e dal transgene codificato.

# Strategie per la rilevazione del doping genetico



- L'inserimento del doping genetico da parte dell' Agenzia Mondiale Antidoping (AMA) nella lista delle sostanze e dei metodi proibiti è stato seguito dalla difficoltà di sviluppare dei metodi per la rilevazione dello stesso, in quanto sia il transgene che la proteina espressa sarebbero stati con tutta probabilità indistinguibili dai loro omologhi endogeni.
- Il campione ideale per la rilevazione di doping genetico dovrebbe essere facilmente accessibile con prelievi che non utilizzano un approccio invasivo;
- la rilevazione dovrebbe riflettere non solo la situazione *hic et nunc*, ma anche quella di un periodo di tempo precedente lo stesso. I liquidi corporei (sangue, urina e saliva) soddisfano il primo punto. I metodi di rilevazione dovrebbero essere specifici, sensibili, abbastanza veloci, potenzialmente convenienti e dovrebbero permettere un'analisi su larga scala.

# Strategie per la rilevazione del doping genetico



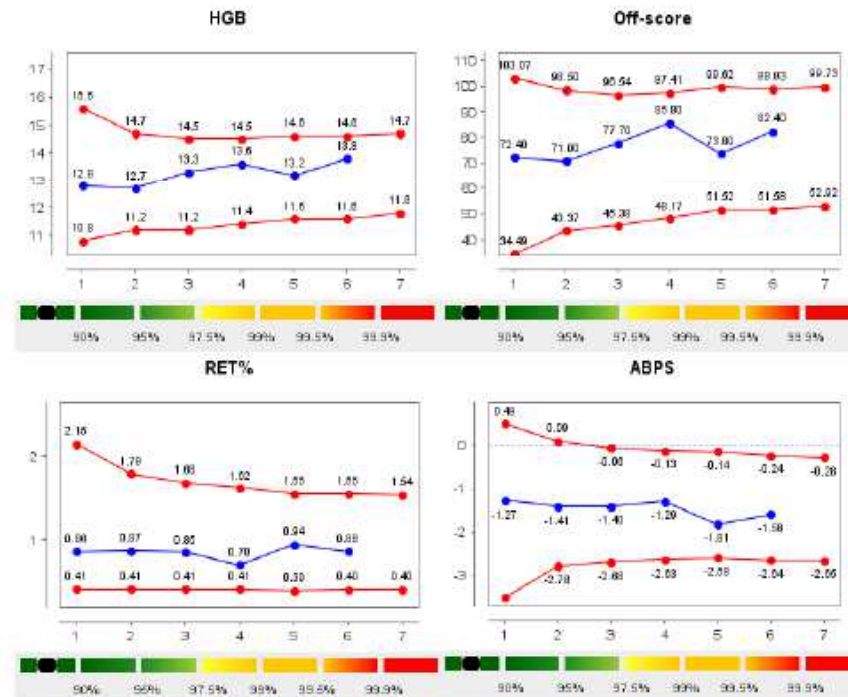
- Le implicazioni legali connesse all'uso di qualsiasi metodo che permetta il monitoraggio del doping sugli atleti sono tali per cui, dove possibile, un metodo diretto che identifica inequivocabilmente l'agente dopante si preferirà sempre a un metodo indiretto, che misura il cambiamento avvenuto nelle cellule, nei tessuti o nell'intero organismo a causa del doping.
- Riguardo al doping genetico, la rilevazione del transgene, della proteina transgenica o del vettore stesso costituirebbe un approccio diretto, ma l'opportunità di utilizzare tale tipo di approccio è minima.
- L'approccio indiretto (**passaporto biologico**) fornisce invece una certa affidabilità nel risultato dei test, basato su un modello statistico, quindi maggiormente aperto ad un controllo legale.



# Il passaporto biologico

## Hematological passport

- Automatic passport calculation
- Automatic sample validity
- APMU and Expert users
- APMU and Expert reports
- One passport one athlete
- Passport sharing
- Automatic notification of Atypical Passport Finding
- Automatic reporting to WADA



# Il passaporto biologico



- Il passaporto biologico è un documento elettronico individuale, promosso dall'UCI e dalla WADA, in cui sono raccolti tutti i risultati dei test antidoping svolti sull'atleta.
- In particolare, il passaporto biologico riporta per ogni atleta sia i risultati dei test delle urine, sia i valori degli esami del sangue. Attraverso la comparazione dei test delle urine viene formato un profilo steroideo, mentre i dati ricavati dagli esami del sangue permettono di tracciare un profilo ematico dell'atleta.
- A queste modalità di controllo diretta a verificare una eventuale violazione del Codice WADA si prevede nel tempo di affiancare un ulteriore metodo di accertamento, non ancora operativo, finalizzato a verificare l'uso dell'ormone della crescita.

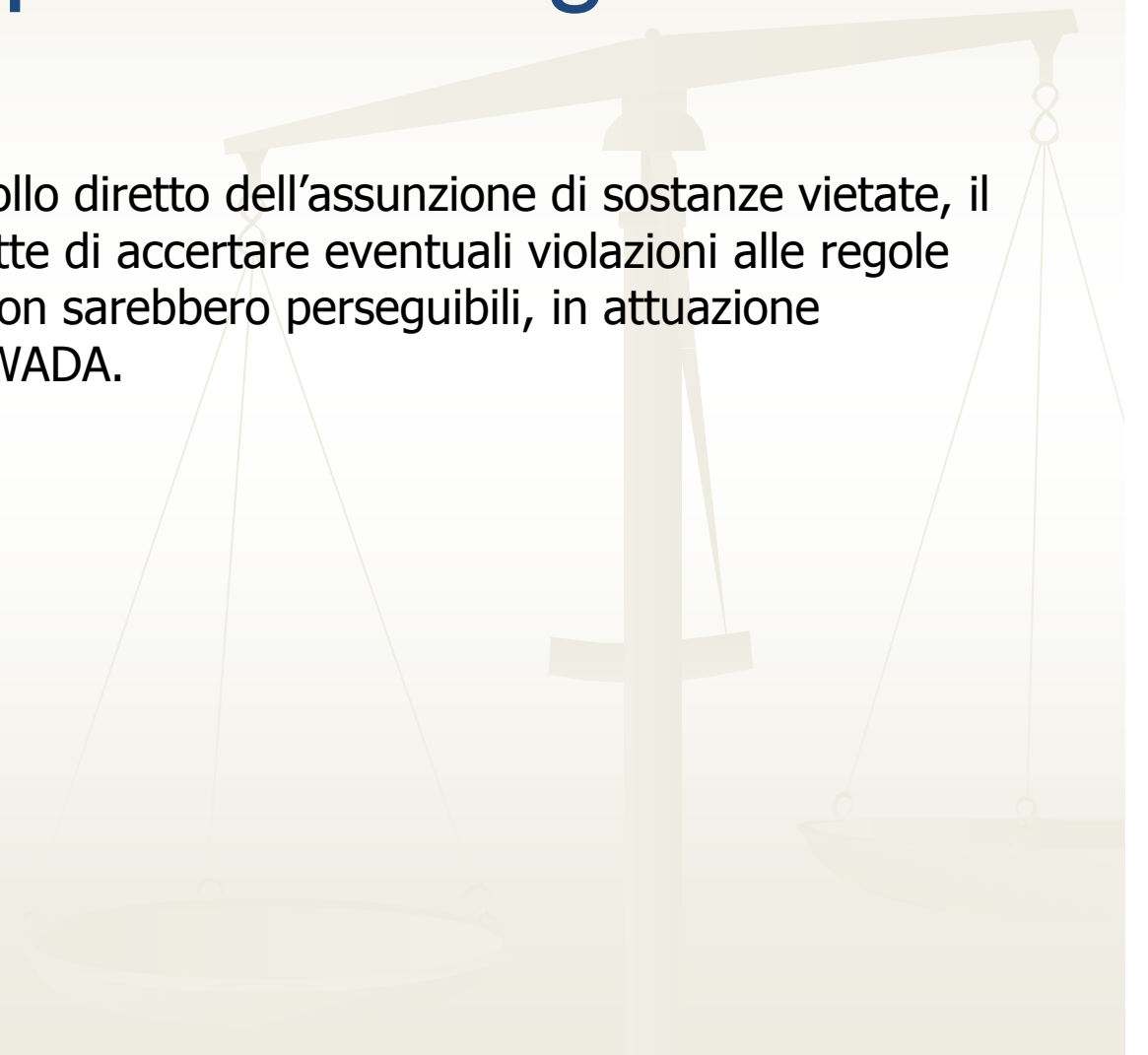
# Il passaporto biologico



- L'obiettivo perseguito con l'istituzione del passaporto biologico è quello di individuare anomalie rispetto ai valori ordinari nei dati che riguardano il singolo atleta, così da desumere, per via indiretta, l'assunzione di sostanze dopanti di difficile rilevamento mediante i mezzi ordinari di accertamento. In altre parole, la funzione fondamentale del passaporto biologico è monitorare le variabili selezionate (i cosiddetti biomarcatori di doping) che nel corso del tempo, indirettamente, rivelano gli effetti del doping: la metodologia del rilevamento obbedisce qui ad una logica diversa rispetto a quella fatta propria dal tradizionale accertamento dell'assunzione di una sostanza vietata attraverso controlli antidoping analitici.

# Il passaporto biologico

- Infatti, rispetto ad un controllo diretto dell'assunzione di sostanze vietate, il passaporto biologico permette di accertare eventuali violazioni alle regole anti-doping che altrimenti non sarebbero perseguibili, in attuazione dell'articolo 2.2 del Codice WADA.



# Il passaporto biologico



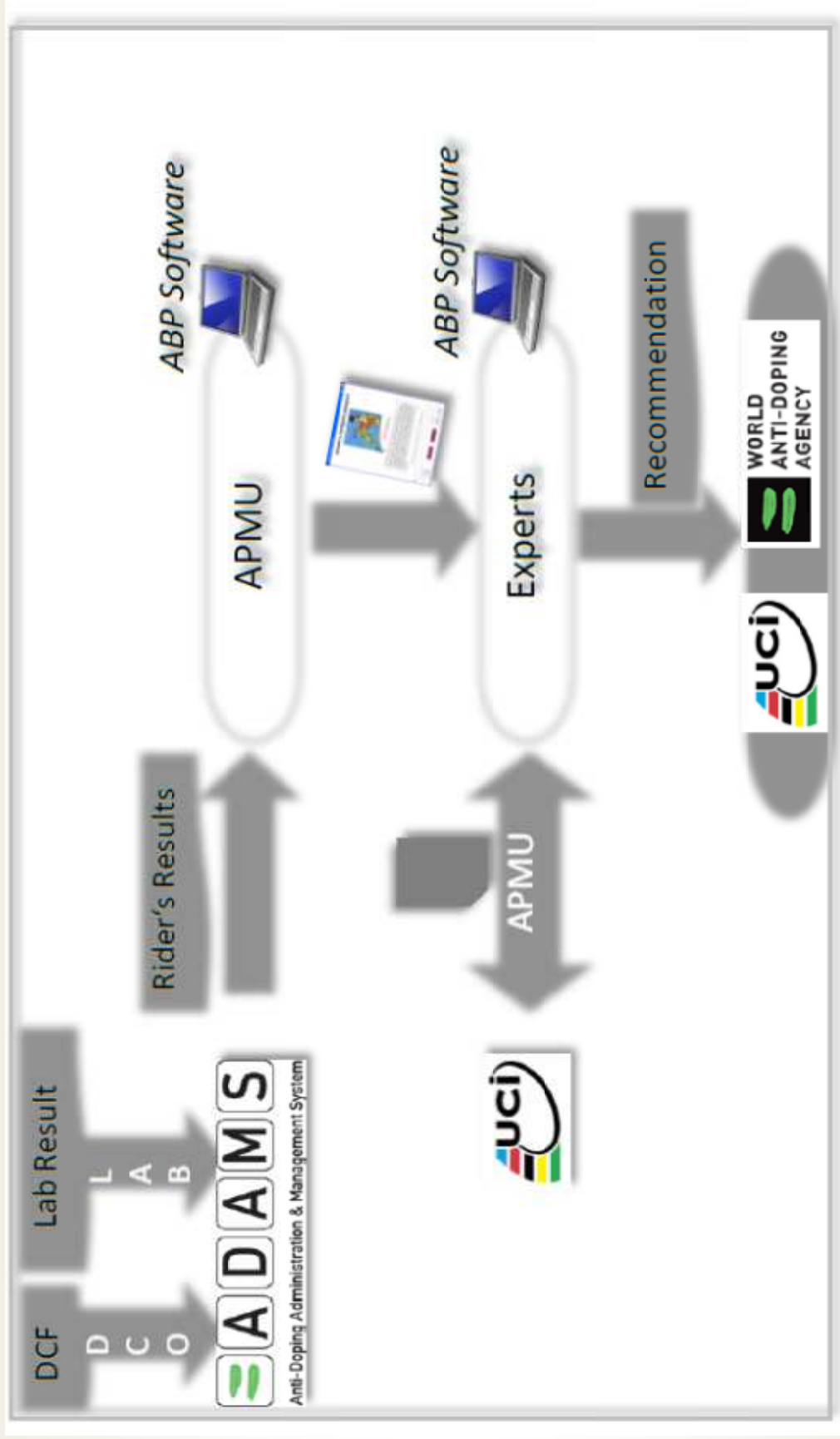
- Occorre tuttavia chiarire che il passaporto biologico non sostituisce i controlli anti-doping tradizionali, ma si combina alle strategie ordinarie, rendendo quindi la lotta contro il doping più efficace.
- Invero, l'approccio tipico del controllo antidoping, basato sul rilevamento di una sostanza vietata in un campione biologico di un atleta, pur mantenendo la sua efficacia, presenta comunque dei limiti nelle ipotesi di utilizzazione di sostanze in modo intermittente o in basse dosi.
- Tanto più che alcuni nuovi composti dopanti o nuove metodiche di doping (v. doping genetico) possono essere difficili da individuare con i mezzi analitici convenzionali

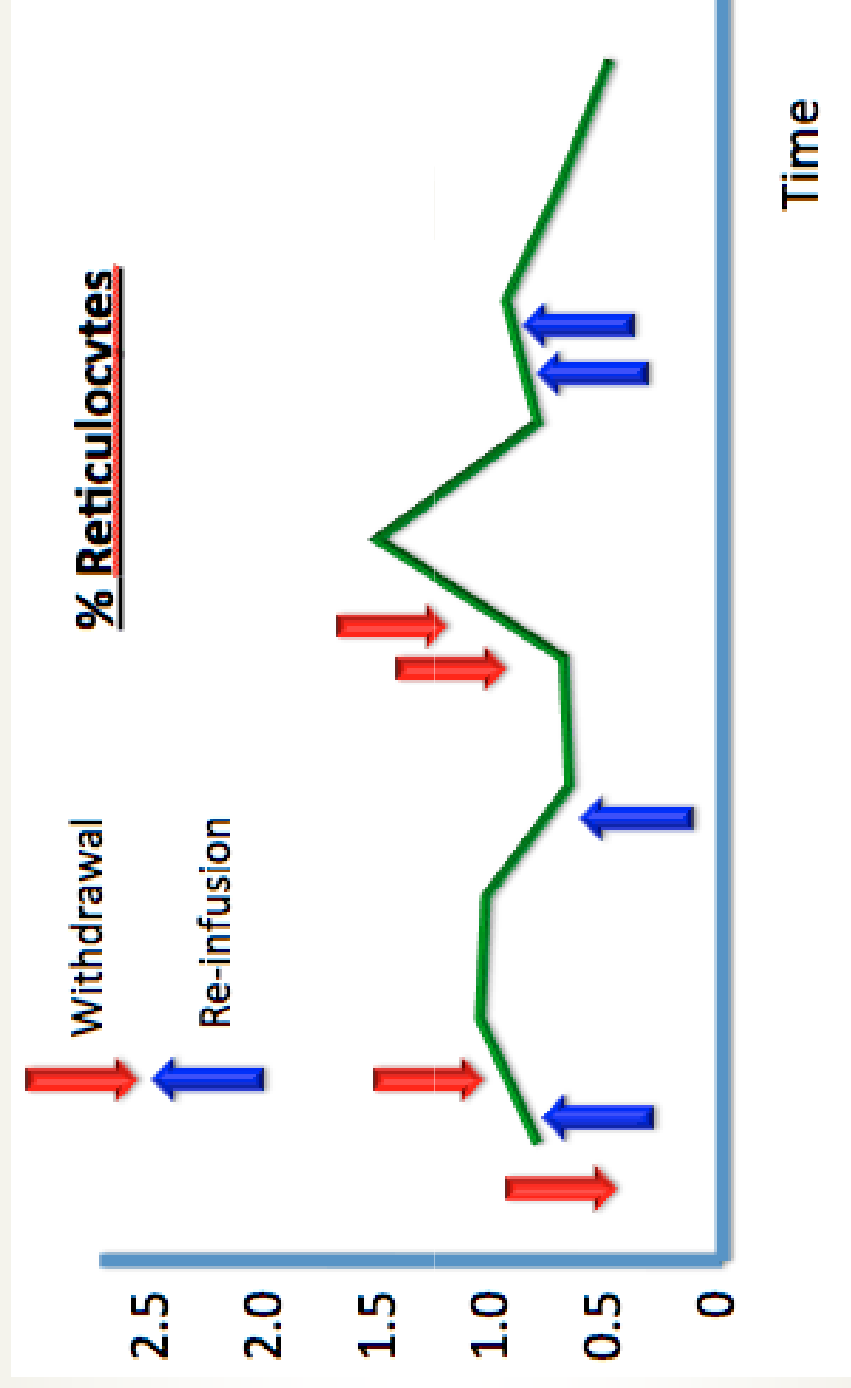


Il passaporto biologico: una  
procedura molto complessa..

*(...sarebbe bello poter organizzare  
delle belle nozze coi fichi secchi....)*

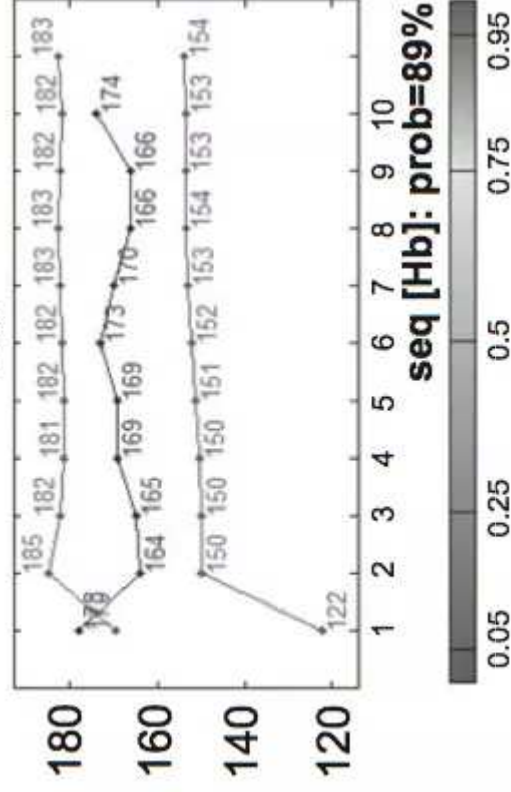




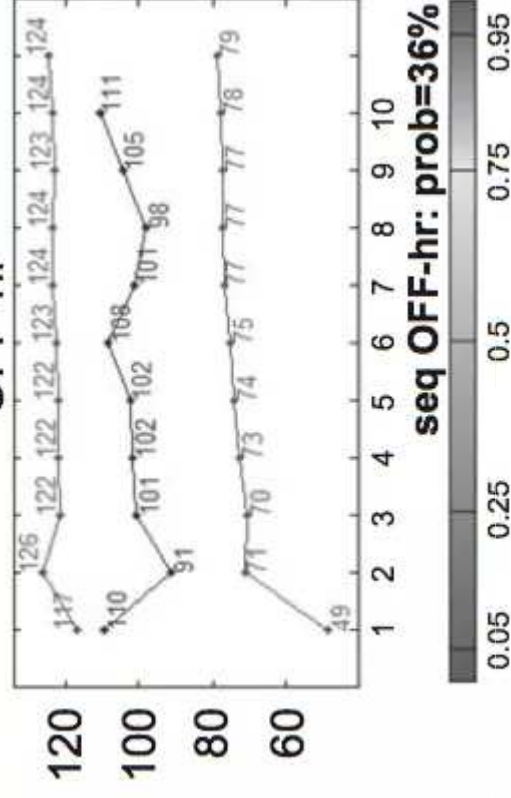


# C (Subject 16)

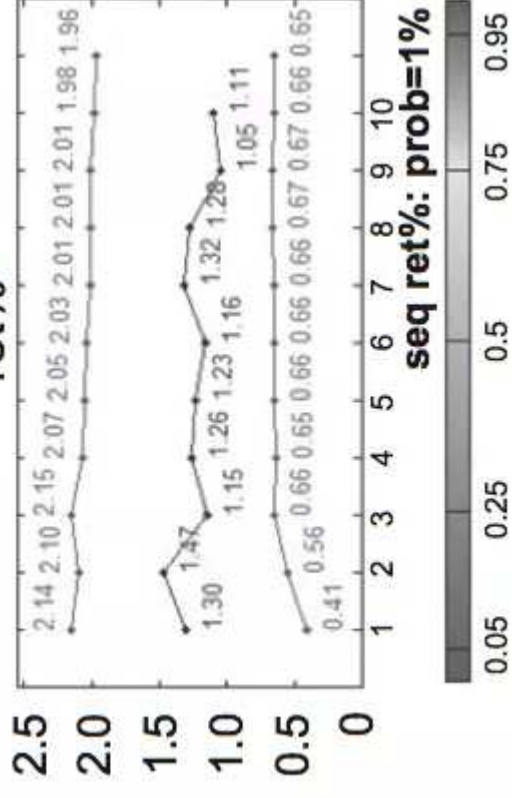
Hb



OFF-hr

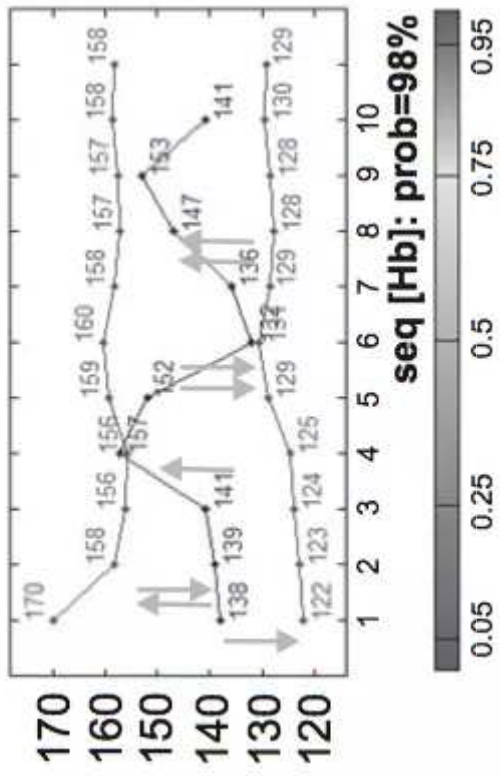


ret%

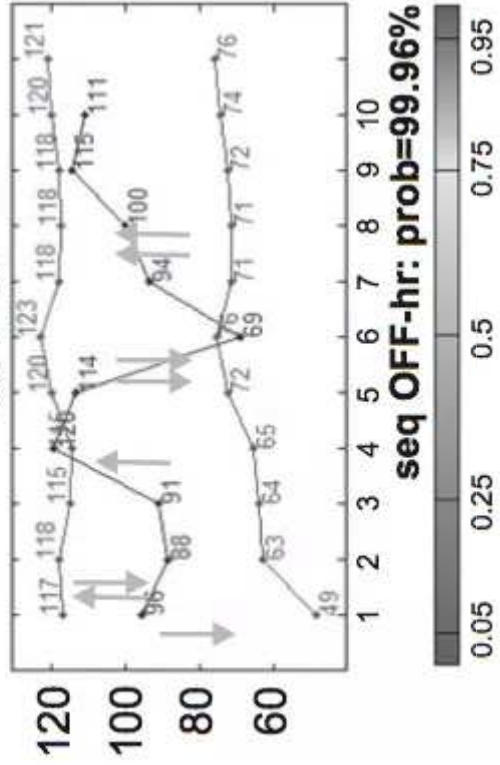


# B (Subject 19)

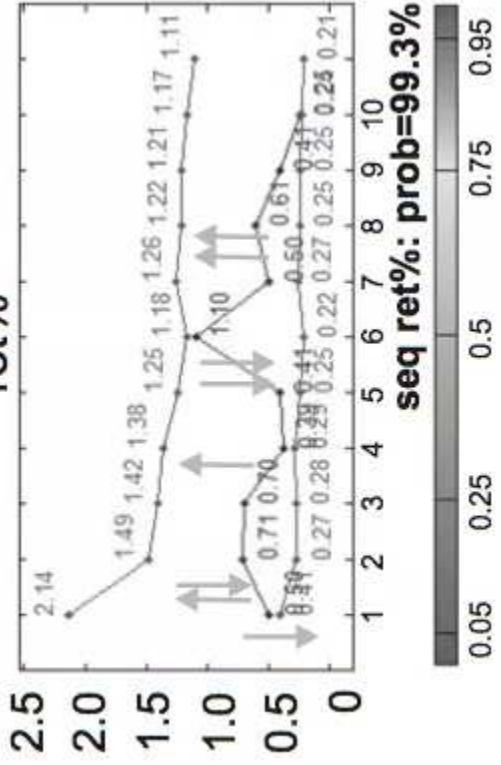
Hb



OFF-hr

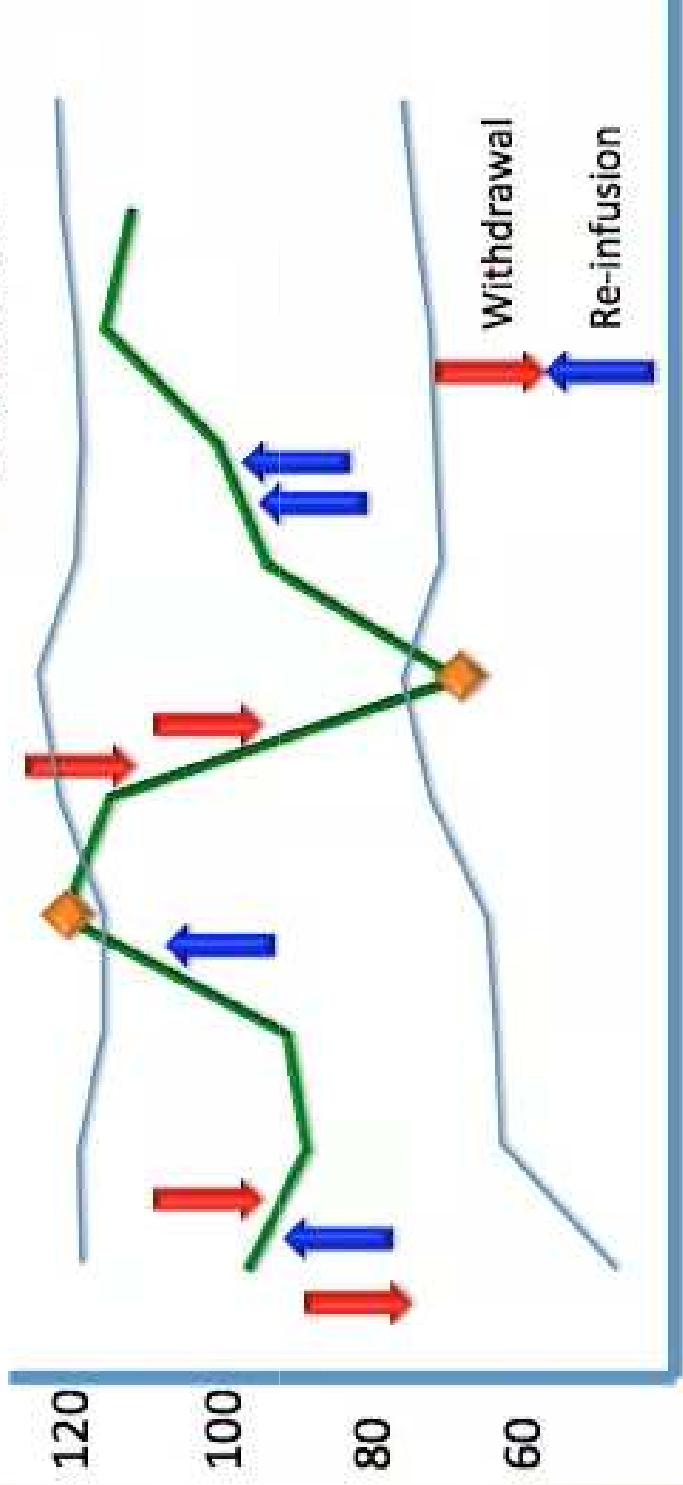


ret%



**Off-score**

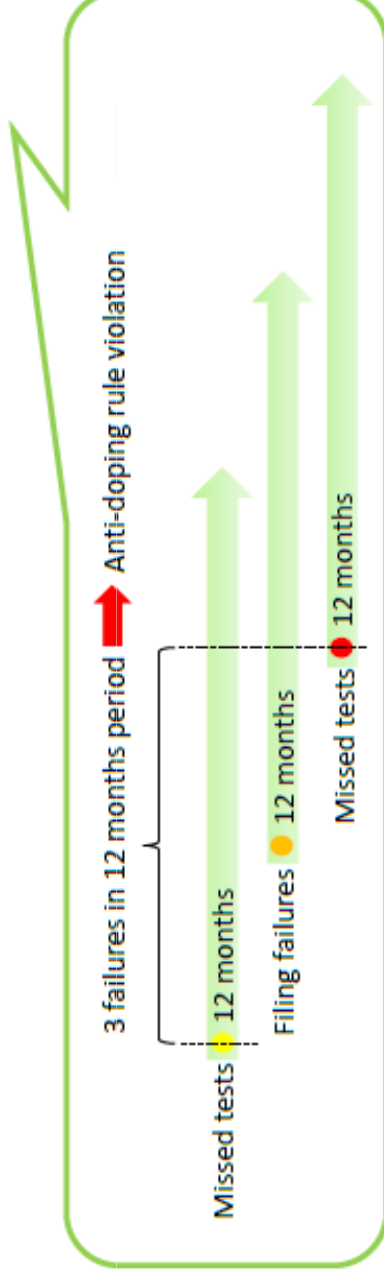
◆ "Strikes" – values outside  
99% prob. level



**Time**

# Whereabouts Failures

- The time period for Whereabouts violations will be reduced from 18 months to **12 months**



Missed test is a case that DCO could not find the player.

Filing failure is a case that a player doesn't submit a whereabouts information.