

Linee guida per l'identificazione del doping con eritropoietina umana ricombinante

Giuseppe Lippi

Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Verona

INTRODUZIONE

In condizioni normali la quasi totalità dell'ossigeno trasportato dal sangue è legata all'emoglobina; solo una piccola parte, generalmente non superiore al 3%, circola in forma solubile nella fase acquosa del plasma. L'apporto d'ossigeno ai vari tessuti rappresenta il maggiore fattore limitante il metabolismo cellulare; il corretto equilibrio tra domanda e disponibilità d'ossigeno consente l'ottimale svolgimento delle principali funzioni cellulari. L'apporto d'ossigeno ai tessuti è finalizzato alla produzione ed alla conservazione d'energia, principalmente sotto forma di composti chimici fosforilati, quali adenosina trifosfato (ATP) e fosfocreatina. In condizioni di sufficiente ossigenazione, ciò avviene elettivamente mediante il ciclo di Krebs accoppiato alla fosforilazione ossidativa, processi metabolici aerobici. La domanda d'ossigeno non è costante nell'organismo, poiché differisce considerevolmente tra i vari tipi di organi e/o tessuti ed è influenzata dall'entità del metabolismo. Deficit relativo d'ossigenazione tissutale si può verificare per insufficiente ossigenazione ematica (carezza d'ossigeno atmosferico, patologie emoglobiniche congenite o acquisite, patologie delle vie aeree e dei polmoni), per interruzioni del flusso ematico ai tessuti periferici (scompenso cardiaco, shock o collasso cardiocircolatorio, trombosi, compressione vascolare), o per aumentata richiesta basale (iperpiressia, attività fisica intensa e prolungata). In tali condizioni il metabolismo cellulare è sovente costretto ad intraprendere una via alternativa, tipicamente anaerobia, e contraddistinta dalla conversione terminale di acido piruvico, proveniente dalla glicolisi, ad acido lattico.

Malgrado la massima parte di acido lattico generato durante esercizi fisici intensi o prolungati possa essere metabolizzata ed eliminata, una quota prossima al 20% evade i normali processi di clearance e si accumula nel plasma e nei tessuti di produzione, causando la caratteristica sensazione di dolore, fatica e spossatezza. La quantità d'ossigeno disponibile al muscolo durante l'attività fisica è quindi un fattore fortemente limitante le prestazioni atletiche, sia in termini d'intensità, sia di resistenza. L'osservazione che un incremento del numero di globuli rossi determina un più efficiente trasporto d'ossigeno ai muscoli ha promosso nel tempo la ricerca di sostanze e metodi per accrescere la massa eritrocitaria negli atleti d'alcune discipline sportive di resistenza. Da evidenze scientifiche consolidate ed aneddoti, è oggi noto che tale obiettivo può essere raggiunto con tecniche diverse (Tabella 1) che, introdotte originariamente per la terapia delle anemie in corso di gravi patologie sistemiche (tumori, infezioni, insufficienza renale, traumi), si sono rapidamente riflesse alla medicina sportiva.

A seguito della clonazione del gene dell'eritropoietina umana (epo) nel 1985 (1), la molecola ricombinante (rHuEpo) è divenuta commercialmente disponibile per fini terapeutici, tra i quali il trattamento delle forme di anemia in corso di insufficienza renale, neoplasie, chemioterapia, sindromi paraneoplastiche, infezioni sistemiche, prematurità ed alcune anomalie emoglobiniche (2). Sfortunatamente, la ben nota efficacia nell'incrementare la massa eritrocitaria ha favorito contestualmente la diffusione dell'ormone ricombinante tra medici sportivi, preparatori atletici ed atleti di varie discipline sportive. Nel 1990, per la prima volta, l'*American Medical Association* allarmò la Comunità Scientifica sul possibile impiego di rHuEpo da parte d'atleti (3). In parte a causa della colpevole ignoranza e sottovalutazione del fenomeno da parte di Strutture ed Istituzioni

Tabella 1

Metodi più diffusi per ottimizzare il trasporto d'ossigeno

- Aumento della massa eritrocitaria
- 1) Emotrasfusione (auto o eterotrasfusione)
 - 2) Stimolazione del midollo eritropoietico
 - a) Soggiorno in altura
 - b) Somministrazione di sostanze stimolanti l'eritropoiesi
 - Eritropoietina umana ricombinante (rHuEpo)
 - Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (NESP)
 - 3) Emosostituti
 - a) Emoglobine sintetiche (umane ricombinanti o animali)
 - b) Derivati dei perfluorocarbonati
- Aumento della cessione d'ossigeno in periferia
- 1) Modulatore allosterici emoglobinici
 - a) Naturali (2,3-difosfoglicerato)
 - b) Di sintesi (RSR13, inositolo esafosfato)
- Tecniche ausiliarie
- 1) Terapia marziale parenterale
 - 2) Terapia con acido folico e vitamina B12
 - 3) Infusione di *plasma expanders* (Dextrano, HES)

deputate al controllo del doping nello sport, l'impiego di rHuEpo dilagò fino alla metà degli anni '90, coinvolgendo tutte le discipline sportive di resistenza e sfociando, nel corso del Tour de France del 1998, nel ben noto "scandalo Festina", che portò finalmente il problema all'attenzione del mondo scientifico.

BREVI CENNI DI FISIOPATOLOGIA

L'epo è una glicoproteina acida sintetizzata elettivamente nel parenchima renale, composta da 165 aminoacidi, con peso molecolare di 34 e contenuto carboidratico prossimo al 40%. L'ormone esplica una potente azione stimolante sul sistema emopoietico, regolata da specifici recettori cellulari, altamente selettiva nei confronti dei progenitori dei globuli rossi. Malgrado completa omologia in sequenza ed analoga efficacia biologica, la forma ricombinante dell'ormone è caratterizzata da un contenuto carboidratico quantitativamente e qualitativamente diverso (4).

La concentrazione plasmatica dell'ormone è regolata da un preciso bilancio tra domanda ed apporto d'ossigeno; l'ipossia è il principale fattore stimolante l'increzione (2). Entro 24 ore dalla prima somministrazione di epo si osserva un aumento significativo del numero di reticolociti; tale incremento raggiunge l'apice generalmente entro 10 giorni e, senza ulteriori somministrazioni, la normalizzazione dei conteggi avviene entro 12 giorni. La somministrazione di rHuEpo in atleti può incrementare la concentrazione emoglobinica fino a quasi 2.0 g/dL, il tasso di ematocrito fino a quasi 4 punti, incrementando contestualmente la disponibilità periferica di ossigeno (5). Le suddette variazioni, ancora significative ad un mese dall'ultima somministrazione di epo, si riflettono in un importante incremento delle prestazioni atletiche aerobiche (6).

LINEE GUIDA PER L'ACCERTAMENTO DI DOPING CON EMOGLOBINA UMANA RICOMBINANTE

Lo screening di laboratorio per l'identificazione del doping con rHuEpo è una delle sfide più complesse per il laboratorio clinico. La sostanziale omologia strutturale tra la molecola naturale e quella ricombinante non agevola, infatti, il riconoscimento diretto mediante comuni tecniche analitiche (immunometria classica). Per questa ragione, dal 1990 sono state suggerite numerose tecniche indirette; dal fatidico, contestato, ed oggi inaccettabile limite di 50% di ematocrito, al promettente test diretto sulle urine (7).

A seguito di molti equivoci ed incertezze, il 7 novembre 2001 la Commissione Medica

del Comitato Olimpico Internazionale, dopo aver consultato una rappresentanza d'esperti in materia, ha finalmente emanato linee guida comprendenti i criteri definitivi per l'identificazione di forme ricombinanti o artificiali di epo. In sintesi, l'algoritmo diagnostico prescelto, definisce che:

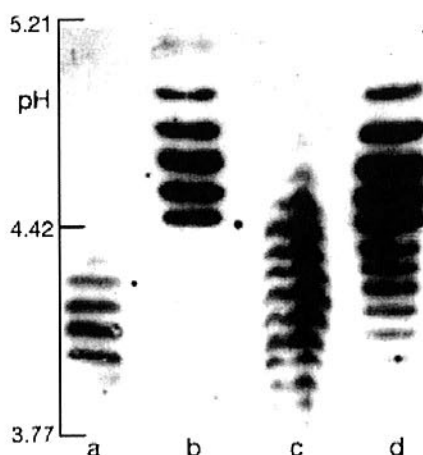
- I metodi di scelta per l'identificazione di epo devono essere considerati il test diretto su urine ed il test indiretto su sangue.
- I due test (su sangue ed urine) devono essere accoppiati (incrociati) ed entrambi devono dare il medesimo esito (entrambi positivi o negativi).

IL TEST URINARIO

Malgrado un'elevata omologia strutturale, la molecola ricombinante di epo possiede una differente glicosilazione che altera alcune proprietà chimico-fisiche della glicoproteina. Proprio su questo fondamentale concetto si basa il test ideato in Francia da Lasne e de Ceaurriz nel corso del 2000. Il test è oggi comunemente noto con la denominazione "Châtenay-Malabry", sede del laboratorio nel quale è stato ideato e sviluppato (8).

Il principio del test risiede nella differente mobilità elettroforetica della molecola ricombinante rispetto alla controparte naturale. Il campione delle urine del paziente è fatto migrare su una lastra per isoelettrofocalizzazione, in condizioni di pH rigorosamente stabilizzato e generalmente compreso tra 3.7 e 5.2. A migrazione terminata si procede ad immunoblotting con uno specifico anticorpo coniugato, cui è fatta seguire rilevazione in chemiluminescenza. A causa della microeterogeneità strutturale, l'epo è risolta in molteplici bande di migrazione, circa dieci, corrispondenti ad altrettante isoforme. Le isoforme dell'epo naturale manifestano generalmente un punto isoelettrico (pI) compreso tra 3.92 e 4.42; le isoforme di rHuEpo, per differente glicosilazione, manifestano invece un pI compreso tra 4.42 e 5.11 (Figura 1) (8). In pratica, la discriminazione tra epo endogena ed esogena è definita dalla proporzione di bande basiche (quelle riconducibili ad rHuEpo), espressa in termini percentuali. La percentuale di bande basiche in una persona che non abbia fatto uso di rHuEpo è in media del 28.2%. In conformità a questo riscontro, la Commissione Scientifica del CIO ha definito come livello soglia per identificare soggetti che abbiano assunto rHuEpo la presenza di bande basiche superiore all'80% del totale. Utilizzando questo limite, il numero di falsi positivi è prossimo ad 1 su 3 000. L'innalzamento del limite consentirebbe un ulteriore miglioramento della specificità (83% = 1 su 10 000 falsi positivi, 86% = 1 : 30 000 falsi positivi), a scapito tuttavia della sensibilità del metodo. Per quanto riguarda l'Unione Ciclistica Internazionale (UCI), la Federazione maggiormente coinvolta dal problema epo, nel corso del 2001 il test è stato eseguito su 271 ciclisti professionisti, 11 dei quali sono stati riscontrati positivi. Negli otto soggetti in cui è stato condotto anche un test crociato su sangue, entrambi i test hanno dato esito analogo. A causa della rapida clearance della molecola, il limite per l'identificazione di rHuEpo con il metodo urinario "Châtenay-Malabry" è generalmente compreso da 3 a 6 giorni dall'ultima somministrazione dell'ormone ricombinante.

Figura 1
Test "Châtenay-Malabry" (separazione mediante isoelettrofocalizzazione e rilevamento con immunoblotting in chemiluminescenza) condotto per l'identificazione di eritropoietina ricombinante nelle urine. (a) eritropoietina umana naturale (Sigma); (b) eritropoietina umana ricombinante (Eprex); (c) urine di un soggetto normale; (d) urine di un soggetto che ha assunto recentemente eritropoietina ricombinante



IL TEST EMATICO

Non esiste ad oggi un test ematico in grado di discriminare con assoluta certezza ed affidabilità epo sintetica o ricombinante da quella naturale (7). Nel corso degli anni sono stati proposti molti protocolli integrati, per lo più basati su misurazioni indirette, cioè sul riconoscimento presuntivo d'effetti biologici riconducibili alla somministrazione d'epo esogena. Fino a non molto tempo fa, il test discriminante era ancora rappresentato

dalla misurazione dell'ematocrito, un criterio che ha portato all'esclusione dalle competizioni ed anche all'incriminazione atleti per i quali non sussisteva alcuna prova concreta di reato. Il limite del 50% è stato più volte criticato tra le pagine di questa stessa rivista (9). Quando finalmente si prese coscienza che non era più possibile applicare criteri arbitrari, privi di presupposti scientifici, il Comitato Olimpico Nazionale Italiano (CONI) varò la ben nota campagna "Io non rischio la salute", alla cui stesura parteciparono alcuni membri rappresentativi della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC). I fondamenti della Campagna, così come il protocollo in essa contenuto, rappresentarono un sostanziale progresso rispetto alla mera interpretazione del tasso di ematocrito (10). Ciononostante, la Campagna ebbe il grave limite di non essere mai riconosciuta ufficialmente e convertita in procedura antidoping da parte delle Autorità competenti, poiché le sue finalità erano dirette alla tutela della salute degli atleti piuttosto che all'individuazione degli illeciti sportivi. Nel frattempo, il numero dei parametri suggeriti crebbe, abbracciando misurazione di ematocrito (Ht), emoglobina, reticolociti e parametri derivati (indici di maturazione, contenuto emoglobinico, ematocrito reticolocitario), eritropoietina plasmatica, ferritina, transferrina, recettore solubile della transferrina (sTrf), rapporto tra ferritina e sTrf ed altri ancora (7). Un'attendibile soluzione all'enigma comparse l'anno seguente, quando Parisotto e Colleghi pubblicarono un protocollo d'identificazione presuntiva d'assunzione di rHuEpo, basato dell'integrazione delle alterazioni molto suggestive di alcuni parametri ematologici. I parametri compresi nel protocollo, noto anche come "Protocollo Australiano", sono schematizzati in Tabella 2 e comprendono Ht, ematocrito reticolocitario (RetHt), percentuale dei globuli rossi macrocitici (%Macro), epo plasmatica ed sTrf (5). I due algoritmi diagnostici sviluppati sull'integrazione dei risultati del dosaggio dei suddetti parametri, definiti dagli stessi Autori "ON-model score" (identificazione d'uso corrente di rHuEpo) e "OFF-model score" (identificazione d'uso di rHuEpo nelle due settimane precedenti il prelievo), hanno rivelato specificità e sensibilità molto prossime al 100%. A differenza del test urinario, i protocolli ematici consentono un limite di riconoscimento maggiore, presuntivamente estensibile fino a 4 settimane dall'ultima assunzione di rHuEpo.

Tabella 2
Parametri ematici predittivi d'assunzione di eritropoietina umana ricombinante

- Ematocrito (Ht)
- Ematocrito reticolocitario (RetHt)
- Percentuale dei globuli rossi di dimensioni aumentate (%Macro)
- Eritropoietina plasmatica (epo)
- Recettore solubile della transferrina (sTrf)

$$\text{ON-model Score} = 3.721\text{Ht} + 30.45\text{RetHt} + 0.1871\log(\text{epo}) + 0.1267\log(\text{sTrf}) + 0.115\log(\% \text{Macro} + 0.1)$$

- Risultato atteso: < 2.66 (uomini) e < 2.34 (donne)

$$\text{OFF-model Score} = 6.149\text{Ht} - 92.87\text{RetHt} - 0.1463\log(\text{epo})$$

- Risultato atteso: < 2.47 (uomini) e < 2.10 (donne)

BIBLIOGRAFIA

1. Lin FK, Suggs S, Lin CH, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:7580-4.
2. Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. Haematologica 1998; 83: 724-32.
3. Scott WC. The abuse of erythropoietin to enhance athletic performance. JAMA 1990; 264:1660.
4. Choi D, Kim M, Park J. Erythropoietin: physico- and bio-chemical analysis. J Chromatog B Biomed Appl 1996; 687:189-99.
5. Parisotto R, Wu M, Ashenden MJ, et al. Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. Haematologica 2001;86:128-37.
6. Birkeland KI, Stray-Gundersen J, Hemmersbach P, et al. Effect of rhEPO administration on serum levels of sTfR and cycling performance. Med Sci Sports Exerc 2000;32:1238-43.
7. Lippi G, Guidi G. Laboratory screening for erythropoietin abuse in sport: an emerging challenge. Clin Chem Lab Med 2000; 38: 13-9.
8. Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. Nature 2000; 405: 635.
9. Lippi G. Medicina di Laboratorio e Doping. Biochim Clin 1999;23:131-41.
10. Lippi G, Guidi G. Aggiornamenti in tema di Medicina di Laboratorio e Doping. La nuova Campagna del CONI "Io non rischio la salute!". Biochim Clin 2000;24:87-95.