

Biochimica clinica

Appunti

Cos'è la biochimica clinica?

Studio di marcatori biochimici elaborati dall'organismo (enzimi, metaboliti, cellule, ecc.) allo scopo di determinare lo stato di salute, attraverso test (esami) diagnostici.

- utilizzare test per valutare gli effetti dell'attività motoria
- saper interpretare dati clinici per valutare gli effetti dell'attività motoria
- conoscere i test anti-doping

PERCHÉ vengono effettuati esami diagnostici sugli atleti?

Esami di routine

- Controllo dello stato di salute generale: anche gli atleti si ammalano, obiettivo meno infortuni.
- Ottimizzare lo stato di forma.
- Migliorare le prestazioni.
- Ricerca.

Esami anti-doping

- Smascherare gli illeciti sportivi.

QUANDO vengono effettuati?

- Durante gli allenamenti (es. dosaggio lattato)
- Durante il riposo (es. esame del sangue)
- Durante le competizioni (es. test anti-doping)

Gli esami a riposo si fanno solitamente la mattina perché il nostro corpo lavora con cicli circadiani perché è più facile trovare tutti gli ormoni. Non sempre è così, soprattutto per gli atleti.

DOVE? POCT: point of care testing

Vantaggi

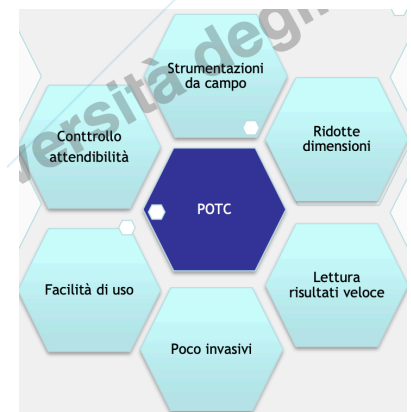
- Possibilità di effettuare i test sul campo
- Immediatezza dei risultati

Problematiche

- Saper effettuare il test nel modo più corretto
- Valutare i risultati

Un test diagnostico consta di tre fasi:

- **Fase pre-clinica:** raccolta dei campioni, conservazione e trasporto. Bisogna fare attenzione all'**emoconcentrazione** per la disidratazione a seguito per esempio di sudorazione a causa dell'allenamento, alle **interferenze** che **possono alterare i dati** (come il digiuno, presenza di molti grassi nel sangue ed eventuali terapie), ai **ritmi cronobiologici** che fanno variare i livelli ormonali;
- **Fase analitica:** dosaggio dei parametri. Ovviamente è **importante scegliere i test analitici adatti** e la strumentazione adeguata. Vi sono alcuni fattori discriminanti del test (precisione, accuratezza, specificità e sensibilità analitica) che presi nel loro insieme determinano la variabilità analitica che viene restituita in **CV (coefficiente di variabilità)** che è la percentuale di errore che può esserci in uno strumento. Es: un CV del 3% indica che il risultato può essere del 3% più alto o più basso rispetto al valore dato dallo strumento. Solitamente è considerato **affidabile** un POTC che ha un **CV inferiore del 10%**;
- **Fase post-analitica:** **interpretazione dei risultati** dei test, sia diagnostici sia antidoping, implica l'utilizzo dei cosiddetti intervalli di riferimento.



Precisione: concordanza fra risultati di una serie di diverse misure ottenute con lo stesso metodo su uno stesso campione. Le diverse misure divergeranno fra loro per errori definiti "casuali". L'errore casuale è inevitabile e generalmente è di piccola entità e imputabile all'analista ed alle condizioni operative.

Accuratezza: è il grado di concordanza fra il valore medio trovato e il valore "vero". Il controllo dell'accuratezza delle misure sperimentali mette in evidenza gli errori sistematici di un'analisi. L'errore

sistematico si ripete tutte le volte che si effettua un'analisi con lo stesso metodo. La causa dell'errore sistematico è imputabile alla poca sensibilità o all'aspecificità di un metodo di analisi.

Specificità: proprietà del metodo di analisi di dosare solo ed interamente la sostanza studiata senza subire interferenze positive o negative da parte di altre sostanze presenti nel campione.

Sensibilità: attitudine del metodo a dosare piccole quantità del componente studiato

interpretare i risultati di un test:

L'interpretazione dei risultati dei test, siano diagnostici o antidoping, implica l'utilizzo dei cosiddetti

INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Il risultato di laboratorio deve essere confrontato con i cosiddetti **valori normali** o **valori di riferimento**. Essi sono i valori più frequentemente riscontrati negli individui sani e dipendono da:

- **Fattori genetici**
- **Alimentazione, attività fisica, altitudine e clima;**
- **Postura al prelievo:** la postura al prelievo cambia la pressione e tale posizione può far variare la quantità/qualità delle molecole nel sangue;
- **Fumo e farmaci;**
- **Età e sesso.**

ESAME EMOCROCIOMETRICO			
Eritrociti	5.13	10 ¹² /l	4.00-5.20
Emoglobina	146	g/l	135-170
Ematocrito	42.9	%	41.0-53.0
MCV	83.6	fl	79.0-97.0
MCH	28.5	pg	27.0-32.0
MCHC	340	g/l	300-360
RDW	13.5	%	11.0-15.0
Leucociti	7.5	10 ⁹ /l	3.9-10.6
Neutrofili	61.5	%	50.0-70.0
Eosinofili	3.7	%	1.0-6.0
Basofili	0.8	%	0.0-1.5
Linfociti	25.8	%	20.0-45.0
Monociti	8.2	%	2.0-10.0
Piastrine	275	10 ⁹ /l	150-400

Gli intervalli di riferimento comunemente usati **per la popolazione sedentaria non sono idonei per gli atleti** perché essi possono allenarsi in altura, hanno un metabolismo accelerato, praticano molta attività fisica e hanno differenti stili di vita (dieta, sonno, ecc...). Per esempio l'**ematocrito (rapporto plasma e globuli rossi)** negli atleti di endurance tende ad essere più basso rispetto a quello dei sedentari (perché producono meno globuli rossi a causa di probabili carenze di ferro e poiché nell'atleta di endurance la vita dei globuli rossi è più corta. Però nell'atleta di endurance gli eritrociti solitamente sono più grandi rispetto a quello dei sedentari), mentre la creatinina risulta essere più alta nei rugbisti rispetto ai sedentari.

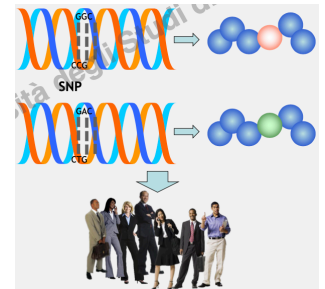
TEST MOLECOLARI

Con essi viene analizzato il DNA dell'atleta per scoprire varianti genetiche e polimorfismi legati all'attività fisica. Vengono svolti con i tamponi e con essi si strofina l'interno della guancia per raccogliere le cellule epiteliali così da analizzare il DNA.

Il **polimorfismo** più comune è il SNP (letto "snip"), ovvero il single nucleotide polymorphism, cioè nella tripletta del codice genetico cambia un solo nucleotide.

La bravura di un atleta dipende da:

- **Predisposizione genetica:** il suo contributo può arrivare anche al 50-60%
- **Allenamento;**
- **Dieta.**



I test molecolari possono essere utilizzati per conoscere:

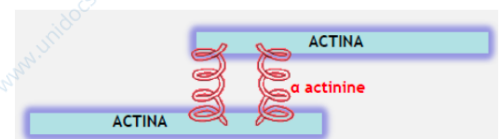
- **Predisposizione ad infortuni:** alcune varianti genetiche sono maggiormente correlate alla **predisposizione agli infortuni:** per esempio possono esserci polimorfismi che causano nel fenotipo una debolezza dei legamenti;
- **Attitudine ad attività di forza/potenza;**
- **Attitudine a determinati esercizi;**
- **Possibilità di modulazione dell'allenamento.**

L'ambiente e il genotipo fa molto, lo stile di vita fa molto, quindi non sempre se sei predisposto geneticamente diventi un campione.

GENE ACTN3

È un gene che è stato battezzato come "gene della velocità" ed è stato scoperto nei primi anni del 2000.

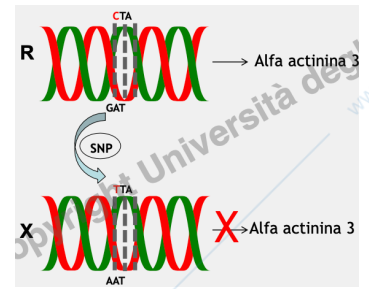
Alcune varianti di questo gene si sono rivelate molto presenti nella popolazione giamaicana. Il gene ACTN3 codifica per una proteina che ha un grosso ruolo nel muscolo scheletrico. Tale proteina è



l'alfa actinina 3 e fa da ponte tra due proteine di actina.

La famiglia delle **alfa actinine** sono **proteine che stabiliscono un contatto fra i filamenti di actina**. L'alfa actinina 2 si trova nelle **fibre lente**, mentre l'alfa actinina 3 è solo nelle **fibre veloci**.

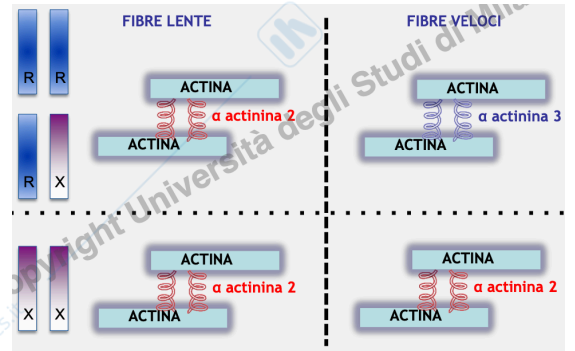
Il polimorfismo scoperto è uno SNP con la differenza di una citosina (**gene attivo**, variante denominata **R**) o di una timina (**gene disattivo**, variante denominata **X**) all'inizio di una tripletta e la timina codifica per un codone di stop. Quindi chi possiede lo SNP con la timina non avrà la sintesi di alfa actina 3.



La variante **R** è dominante rispetto alla **X**, quindi una persona che ha un gene ACTN3 con variante R e uno con variante X riuscirà a produrre l'alfa actinina 3 (così come ovviamente le persone che hanno ereditato da entrambi i genitori la variante R). Però le persone che hanno ereditato da entrambi i genitori i geni con la variante X allora non produrranno l'alfa actinina 3.

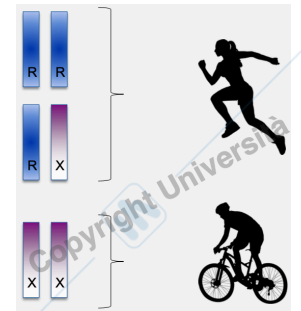
In genere il 25% della popolazione ha la variante RR, il 50% è RX e il 25% è XX, quindi statisticamente una persona su quattro non produce l'alfa actinina 3.

Gli individui XX invece di avere l'alfa actinina 3 nelle fibre veloci presentano anche in esse l'alfa actinina 2.



Gli individui RR/RX sono più predisposti ad attività di scatto/potenza, mentre gli XX sono più predisposti per l'endurance.

Il gene ACTN3 è stato correlato anche agli infortuni. Si è visto che la variante **XX** vanno incontro più frequentemente a **infortuni muscolari e infortuni dei legamenti**, però gli XX presentano un **recupero più veloce** dopo un'attività di endurance.



TEST MOLECOLARE DI SARS-COV-2

Utilizza la metodica della Real Time PCR (RT-PCR) per amplificare l'eventuale RNA virale (o geni virali sono envelope E, nucleocapside N e spike S) e la RNA polimerasi (RdRB). Il prelevamento del tampone viene effettuato tramite tampone che va a "raccolgere" materiale dalle prime vie respiratorie (naso e faringe).

Normalmente si riscontra il virus tre giorni prima che compaiano i sintomi, poi la carica virale è massima durante i sintomi e poi vi è un decremento. Allo stato attuale della ricerca non si conosce se i soggetti con bassa carica virale siano o meno contagiosi.

Altri tipi di test sono:

- **Test rapido:** viene effettuato il tampone nasofaringeo e il test è fatto per ricercare gli antigeni virali e non l'RNA vero e proprio del Sars-Cov-2. Il risultato è in 30 minuti, però vi possono essere falsi positivi dovuti ad infezioni da altri coronavirus. La sensibilità è più bassa rispetto al test molecolare;
- **Test sierologici:** va a ricercare la presenza di anticorpi contro le proteine virali. Gli anticorpi IgM compaiono precocemente, mentre le IgG sono più tardive. Gli anticorpi contro il coronavirus compaiono solitamente dopo una settimana dall'infezione. Vi sono comunque possibilità di falsi positivi per via della risposta immune verso altri coronavirus. Gli anticorpi contro Sars-Cov-2 non sono permanenti, ma vengono persi dopo un certo tempo.

TEST BIOCIMICI

I liquidi biologici più comunemente utilizzati per eseguire i test diagnostici negli atleti sono:

- **Urine;**
- **Sangue;**
- **Liquido sinoviale:** utilizzato prevalentemente per problemi/patologie inerenti alle articolazioni.

URINE

Negli atleti viene utilizzato sia per stabilire lo stato di forma sia per la ricerca di droghe e sostanze dopanti. L'esame delle urine si compone di tre passaggi:

1. **Esame visuale:** colore, aspetto e volume. Nelle analisi antidoping è fondamentale perché è possibile alterare l'esame delle urine per diluizione o assumendo diuretici. Il probenecid è un diuretico che evita

il rilascio dei cataboliti degli steroidi. Ovviamente la WADA ha inserito i diuretici tra le sostanze proibite poiché sono mascheranti/coprenti di sostanze dopanti;

2. Esame chimico:

- il **pH** delle urine varia molto per via della dieta (per esempio mangiando più carne tenderà all'acido, mentre mangiando prevalentemente verdura tenderà al basico);
- il **glucosio** e la **bilirubina** e **sangue** non si riscontrano in soggetti sani; i **nitriti** se presenti indicano un'infezione delle vie urinarie;
- **Urobilinogeno**: forma di escrezione della bilirubina. Solitamente è molto basso;
- le **proteine** si riscontrano maggiormente nelle urine (proteinuria) a seguito di sforzi molto intensi, mentre nella popolazione sedentaria indicano problemi renali. Per distinguere le due cose negli atleti si fa un altro esame dopo alcuni giorni a seguito dello sforzo intenso. Lo sforzo intenso altera la filtrazione glomerulare;
- Normalmente i **chetoni** non sono presenti nelle urine. Nell'atleta vi possono essere a conseguenza di digiuno o per un consumo molto elevato di zuccheri o in una dieta molto povera di carboidrati (come ad esempio diete iperproteiche);
- **Leucociti**: (globuli bianchi) si ritrovano nelle urine solo se è in atto un'infezione;
- **Creatinina**: deriva dal catabolismo della creatina;
- **Peso specifico**: se è molto basso significa che l'urina è molto diluita e potrebbe indicare la presenza o meno di diuretici;
- **Cataboliti** dovuti a **droghe e sostanze dopanti**, in particolare modo cataboliti degli steroidi;

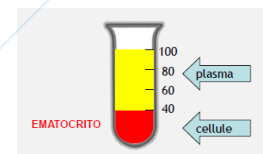
3. Esame microscopico:

- **WBC** = white blood cells, sono i globuli bianchi e non si riscontrano se non a seguito di un'infezione;
- **Batteri** = se vi sono infezioni il più classico batterio riscontrato è Escherichia coli, ma normalmente non si ritrovano;
- **Cristalli** = solitamente non danno problemi, ma possono indicare malessere renale;
- **RBC** = red blood cells, non presenti se non per patologie.

SANGUE

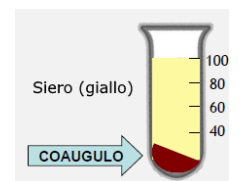
È formato da una sospensione di cellule in un liquido (**plasma**). Normalmente il 55% del sangue è costituito da plasma. Vi sono due possibilità di trattamento del sangue prelevato:

- Il sangue viene **trattato con anti-coagulanti** (eparina e EDTA) = normalmente già presenti in provetta al momento del prelievo. Poi vi è centrifugazione e la componente cellulare andrà a depositarsi sul fondo



Ematocrito: volume percentuale di **tutte** le cellule presenti **nel** sangue **sul** sangue

- Il sangue **non viene trattato con anti-coagulanti**. Il sangue coagula in circa 20 minuti. Poi si avrà quindi una componente di **siero** che si ottiene dopo la centrifugazione del sangue coagulato. Il siero non contiene fibrinogeno e per questo non viene più definito plasma (il **plasma ha le proteine della coagulazione** come il **fibrinogeno**, mentre il **siero non le ha**).



In genere se si vuole ricercare qualcosa delle cellule del sangue allora si utilizzano gli anti-coagulanti, mentre se si vuole analizzare qualcosa nella parte liquida del sangue allora si può scegliere se utilizzare o no gli anti-coagulanti.

EMOCROMO: L'ESAME DELLE CELLULE DEL SANGUE

L'**emocromo** è l'esame delle cellule del sangue e determina:

- Il numero di tutte le cellule del sangue. Con il termine di **formula leucoitaria** si intende la percentuale dei diversi tipi di globuli bianchi. In condizioni normali i neutrofili sono quelli più presenti;
- La concentrazione dell'emoglobina;
- L'ematocrito viene spesso definito come il volume dei globuli rossi, ma in realtà è tutta la componente cellulare del sangue (leucociti, eritrociti e piastrine), ma viene spesso detto solo globuli rossi poiché sono la componente predominante della parte cellulare del sangue.
- L'analisi delle caratteristiche fisiche (forma e dimensioni) dei globuli rossi e delle piastrine.



L'**MCV** indica la grandezza degli eritrociti.

Parametri	Unità	Maschi	Femmine
GR o RBC	X 10 ⁶ /μl	4.30-5.90	4.00-5.10
Hb	g/dl	13.0-17.0	12.0-16.0
Hct	%	40.0-52.0	32.0-47.0
MCV	fl	80.0-96.0	81.0-98.0
MCH	pg	32.0-36.0	32.0-36.0
MCHC	g/dl	32.0-36.0	32.0-36.0
WBC	X 10 ³ /μl	4.0-10.0	
GR Neutrofili	X 10 ³ /μl	2.2-6.6 (40-74%)	
GR Eosinofili	X 10 ³ /μl	0.0-0.8 (0-7%)	
GR Basofili	X 10 ³ /μl	0.0-0.4 (0-0.2%)	
Linfociti	X 10 ³ /μl	1.0-3.2 (19-48%)	
Monociti	X 10 ³ /μl	0.2-1.0 (3.4-11%)	
Piastrine	X 10 ³ /μl	150-450	
MPV	fl	7.2-13.0	
MPCT	%	0.14-0.38	

L'emocromo serve per:

- Valutare lo stato di **salute generale**;
- Determinare la **presenza di alcune malattie**, soprattutto anemie e infezioni. Viene prescritto a soggetti sani come esame di routine, a individui che manifestano sintomi tipici dell'anemia (stanchezza e affaticamento) e in coloro che sono affetti da infezioni ricorrenti, infiammazioni, ecc...
- **Ricerca di sostanze dopanti**.

L'emocromo va eseguito negli atleti di élite con regolarità, negli atleti amatoriali almeno a inizio della stagione agonistica. Più che i valori assoluti, è importante considerare le modifiche.

Es: se un atleta ha un ematocrito medio di 42, una brusca discesa a 39 causerà un calo nella performance.

In genere, **gli atleti di resistenza hanno globuli rossi più grandi** rispetto alla norma perché così a parità di numero, riescono a trasportare più ossigeno. Valori di MCV: elevati

Alcuni atleti di élite di resistenza possono arrivare a 110 fl. Il valore di MCV può essere utile per capire quanto un atleta di resistenza è allenato: dopo uno stop per infortunio, è interessante monitorare quando l'MCV torna ai valori ottimali per l'atleta.

Alterazioni rilevanti per gli atleti:

• **Globuli rossi:**

- **Aumento:** produzione in eccesso, perdite di liquidi (diarrea, ustioni, disidratazione) e utilizzo di sostanze dopanti;
- **Diminuzione:** anemia, emorragie, malattie renali, malnutrizione, carenza di ferro e di vitamine B6, B9 e B12;

• **Leucociti:**

- **Aumento:** infezioni, infiammazione, leucemie, traumi e stress (inizialmente un aumento, ma sul lungo termine causa una diminuzione);
- **Diminuzione:** malattie autoimmuni, infezioni gravi, malattie del midollo osseo e assunzione di alcuni farmaci;

• **Piastrine:**

- **Aumento:** alcune malattie ereditarie, malattie autoimmuni, assunzione di alcuni farmaci, radioterapia, tumori del midollo osseo, ulcere, gastrite, emorragie e pillola anticoncezionale;
- **Diminuzione:** alcuni tipi di leucemie e malattie che causano una crescita alterata delle cellule del sangue e assunzione di alcol.

Metabolismo del ferro

• **Ferro, Ferritina, Transferrina, Recettore solubile della transferrina (sTRF), Eritropoietina**

Marcatori di danno miocardico/muscolare

• **Creatina Chinasi (CK), Creatina Chinasi isoenzima MB (CK-MB), Mioglobina, Troponina I, Proteina C reattiva, Lattato deidrogenasi**

Parametri biochimici addizionali

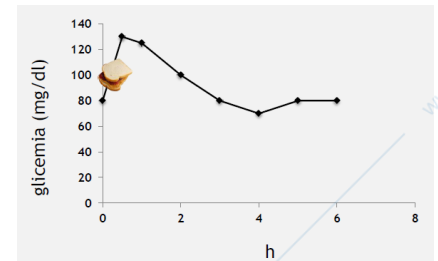
• **Glicemia, Azotemia, Creatinina, lattato, Calcio, Fosforo, Sodio, Potassio, Cloro, Bilirubina totale, Transaminasi**

Indicatori di rischio cardiovascolare

• **Colesterolo totale, LDL-C, HDL-C, Trigliceridi, Omocisteina, Fibrinogeno**

GLICEMIA

È la **concentrazione di glucosio nel sangue**. Essa varia nel corso della giornata, ma deve obbligatoriamente essere mantenuta entro un range ottimale. I valori glicemici a digiuno si attestano normalmente intorno a **60-100 mg/dl**, mentre nella fase postprandiale questi valori salgono a **130-150 mg/dl**.



- **Ipoglicemia:** diminuzione della glicemia.

Può verificarsi in caso di eccessivo consumo come durante le attività muscolari intense e protratte, oppure quando non c'è un regolare approvvigionamento (digiuno, vomito persistente)

- **Iperglicemia:** diabete mellito tipo I e II

Diabete mellito: glicemia a digiuno > 126 mg/dl

Quando la **glicemia supera il valore soglia (180 mg/dl)** il glucosio viene eliminato dai reni e compare nelle urine. Nel diabete, il glucosio si accumula nel sangue perché le cellule non sono più in grado di assorbirlo e di utilizzarlo; esse devono obbligatoriamente ricavare energia dagli acidi grassi.

Diabete di tipo I

- Conosciuto anche come **insulino-dipendente**, giovanile o ad esordio precoce
- Deficit di insulina
- Trattamento con insulina
- Si sviluppa **prima dei 25 anni** di età



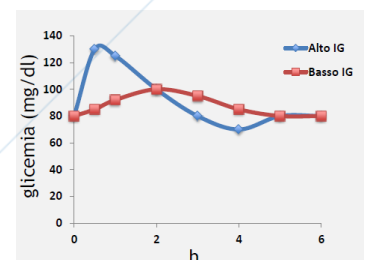
Diabete di tipo II

- **Insulino-resistenza** nei tessuti periferici
- Alterata secrezione di insulina
- Insorgenza in età adulta
- **Correlato ad obesità e inattività fisica**



Quando si assume un alimento ricco di carboidrati, la glicemia si alza. La velocità con cui questo accade dipende da molti fattori, tra i quali la presenza di fibre, il tipo di zucchero ingerito, l'eventuale presenza di grassi e proteine.

L'indice glicemico (IG) misura la velocità con cui sale la glicemia in seguito all'assunzione di carboidrati.



Gli alimenti ad **alto indice glicemico** sono gli **zuccheri semplici**: pane bianco, patatine fritte, caramelle, ecc... **Elevano velocemente la glicemia** perché vengono immediatamente assorbiti e rilasciati nel circolo sanguigno. Quindi vi è un rapido incremento della glicemia, ma l'organismo per far fronte a tale incremento produce e rilascia grosse quantità di insulina, quindi vi sarà un netto calo della glicemia.

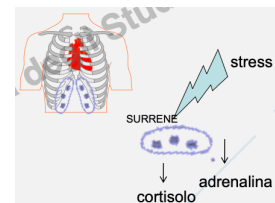
Gli alimenti con **basso indice glicemico** sono fruttosio, pasta, mela, ecc... Essi vengono **assorbiti lentamente perché l'organismo deve "lavorare"** per un lungo tempo per poter rilasciare glucosio nel sangue (come avviene con l'amido della pasta) e quindi vi sarà un picco molto basso e più dilazionato nel tempo della glicemia. Il fruttosio assunto ad alte dosi è però pericoloso perché entra nella glicolisi senza un controllo (vengono saltate le prime tappe) e quindi, se non vi sono grandi richieste energetiche, viene convertito in trigliceridi e quindi ad alte dosi il fruttosio favorisce l'aumento di peso.

Durante la competizione l'atleta dovrebbe cercare di mantenere costante la sua glicemia:

- **PASTO PRE-GARA:** pasto **ricco di carboidrati**. Andrebbe data priorità ad **alimenti a basso indice glicemico**. Andrebbe fatto dalle 2 alle 4 ore prima della competizione;
- **DURANTE LA GARA:** introdurre liquidi, Sali minerali e carboidrati. Se l'attività dura almeno mezz'ora. Solitamente liquidi, sali e carboidrati vengono assunti insieme. Non è importante se l'IG dei carboidrati è alto o basso (spesso si usano le maltodestrine che hanno un IG medio);
- **DOPO LA GARA:** assumere **carboidrati ad alto IG per ricostruire le scorte di glicogeno**. Dato che sono ad alto IG fanno aumentare molto l'insulina e quindi molto più glucosio entrerà nelle cellule e verranno ripristinate più velocemente le scorte di glicogeno muscolare ed epatiche.

La glicemia a livello ormonale è controllata principalmente da:

- **Cortisolo e adrenalina:** aumento della glicemia per via della demolizione del glicogeno. Vengono prodotti dalla ghiandola surrenale;
- **Glucagone:** aumento della glicemia;
- **Insulina:** è l'unico ormone che diminuisce la glicemia.



Durante l'esercizio vi è una diminuzione della sintesi di insulina e un aumento della sintesi di glucagone, adrenalina e cortisolo. **L'insulina agisce "portando" il trasportatore GLUT4 sulla membrana plasmatica ed esso permetterà l'ingresso del glucosio nella cellulare.**

Anche la **contrazione muscolare aumenta la presenza di GLUT4** sulla membrana plasmatica. **L'allenamento aerobico produce effetti importanti sul metabolismo glucidico** e molte evidenze sperimentali dimostrano l'efficacia dell'attività fisica, in aggiunta alla dieta, nella prevenzione e nel trattamento del diabete di tipo II.



AZOTEMIA

Misura la concentrazione di azoto non proteico nel sangue, cioè la **concentrazione di urea nel sangue**. L'urea è un composto di scarto che deriva dalla degradazione delle proteine. Esse è prodotta dal fegato e rilasciata nel sangue, per poi essere filtrata dai reni ed eliminata con le urine. **L'azotemia indica la funzionalità dei reni.**



I fattori che aumentano l'azotemia sono:

- **Dieta iperproteica:** non tutte le proteine/amminoacidi vengono utilizzati nella sintesi proteica, quindi se vi sono troppe proteine ingerite allora verranno catabolizzate andando ad affaticare senza motivo i reni;
- **Disidratazione;**
- **Digiuno;**
- **Attività fisica prolungata:** sia per un motivo energetico sia per danni muscolari conseguenti all'esercizio fisico. Il valore di riferimento è di 19-44 mg/dl e addirittura dopo una gara di ciclismo da una decina di km non è raro trovare anche un 80 mg/dl subito dopo la gara.

Calciatori				
	LUGLIO	OTT/NOV	FEB/MAR	APR/MAG
Urea (19-44 mg/dl)	35	36	36	37

Ciclisti		
	pre-gara	post-gara (9.5 km)
Urea (19-44 mg/dl)	36.6	81.08

Overtraining: la sindrome da overtraining (o sovra-allenamento) si verifica quando l'attività fisica praticata è troppo intensa e l'organismo non riesce, nei tempi di recupero, a eliminare la fatica accumulata. Questo stato oltre a danneggiare la salute dell'atleta, provoca un continuo stato di stress psicofisico, che culmina nel rifiuto di allenarsi e pertanto compromette le prestazioni atletiche. **L'aumento di azotemia è un indice precoce di overtraining.**

Bilancio dell'azoto = azoto ingerito - azoto eliminato.

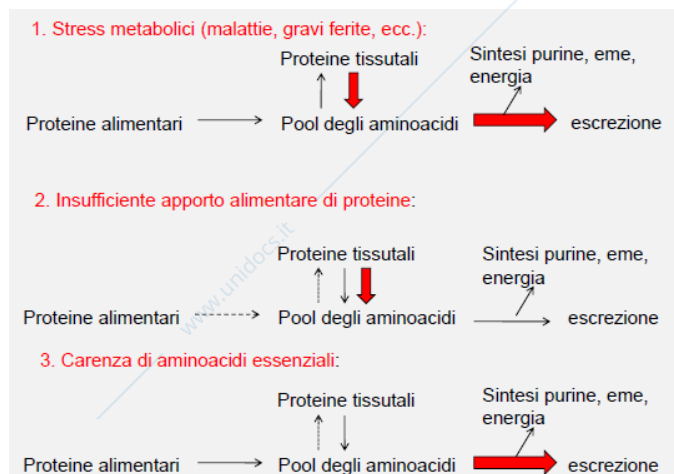
In condizioni normali, un individuo adulto è in condizioni di parità in quanto l'organismo riesce a regolare l'eliminazione di azoto in funzione dell'introduzione.

L'azoto ingerito deriva dagli alimenti (soprattutto proteine)

L'azoto eliminato proviene da proteine e acidi nucleici e viene eliminato attraverso urea, ammoniaca, creatinina nelle urine, desquamazione cutanea e feci.

Si può avere un bilancio azotato negativo in caso di:

- **Stress metabolici:** malattie, gravi ferite, ecc...;
- **Insufficiente apporto alimentare di proteine;**
- **Carenza di aminoacidi essenziali.**



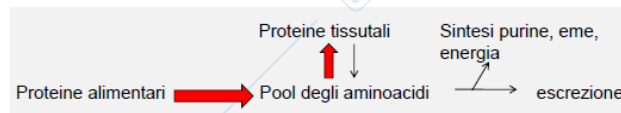
Gli **aminoacidi essenziali** sono **isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, tronina, triptofano e valina**. Mentre **arginina e istidina** sono **essenziali solo durante la crescita**.

Il valore biologico delle proteine dipende dal loro contenuto in aminoacidi essenziali. (in tabella il valore biologico di alcuni alimenti).

Uovo intero	94
Latte mucca	90
Caseina	80
Pesce	76
Carne rossa	74
Carne bianca	74
Piselli	65
Soia	64
Fagioli	59
Lenticchie	45

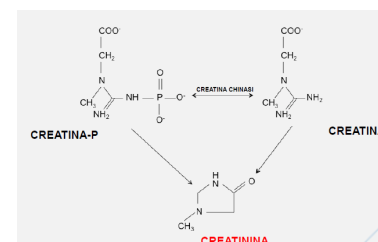
La caseina è una proteina del latte e a volte viene utilizzata singolarmente come integratore alimentare.

Il **bilancio azotato positivo** si ha in alcune condizioni come **nell'accrescimento, gravidanza, allattamento, convalescenza, somministrazione di anabolizzanti**. Alcuni ormoni come il GH favoriscono il guadagno di massa muscolare e rendono positivo il bilancio azotato. Altri, conosciuti come ormoni dello stress (es: cortisolo) tendono invece a renderlo negativo favorendo il catabolismo proteico.



CREATININA

L'esame misura la concentrazione della creatinina nel sangue. La creatinina è un prodotto di scarto che deriva dal muscolo e viene riversato nel sangue. La conversione da creatina a creatinina è irreversibile. Essa viene filtrata dai reni ed è poi eliminata dal corpo attraverso le urine. Per questo la creatinina è usata come **indice della funzione renale**. Può essere dosata nel **sangue (creatinina sierica)** e nelle **urine (creatinina escreta)**.



I **valori normali** di creatinina sono:

- Bambini sotto i due anni: 0,3-0,6 mg/dl;
- Uomini: 0,7-1,2 mg/dl;
- Donne: 0,6-1,2 mg/dl.

Esiste una **diretta proporzionalità tra la creatina presente nell'organismo e la produzione di creatinina**, tanto che l'escrezione di creatinina urinaria può essere utilizzata per stimare la massa muscolare del soggetto.

Alcuni ricercatori hanno proposto una relazione costante tra l'escrezione di creatinina e la massa muscolare:

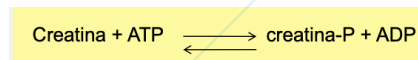
1 g di creatinina escreta in 24 ore corrisponde circa a 17,9 kg di massa muscolare. Esistono quindi delle equazioni dalle quali è possibile risalire ai valori di massa muscolare partendo dall'escrezione di creatinina.

Marcatori di danno muscolare: condizioni patologiche e non (esercizio fisico intenso) che comportano lesioni della membrana plasmatica della cellula muscolare causano la fuoriuscita di enzimi muscolari nel plasma.

Uno di questi è la **creatina chinasi (CK)**. In soggetti non allenati sottoposti a sforzi fisici intensi si può avere aumento di CK anche notevole, anche di 10-20 volte. A seguito dello sforzo si trova CK dopo 2-3 ore e può rimanere per anche 24 ore in cui ci può essere il picco e quindi è riscontrabile anche dopo 48 ore. In atleti in allenamento regolare gli incrementi sono più contenuti, ma in condizioni di riposo è possibile riscontrare livelli più alti di CK nel sangue

La CK è presente anche nel miocardio e nel cervello, ma vi sono diverse subunità:

- CK-MM: muscolo scheletrico;
- CK-MB: miocardio, è un marker dell'infarto cardiaco;
- CK-BB: cervello.



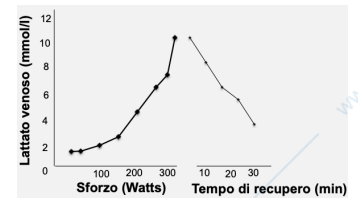
La CK può essere anche misurata durante la stagione e può servire per conoscere il periodo di maggior carico/stress su un atleta/squadra.

Per esempio in tabella il maggior carico è stato a gennaio e un aumento così tanto di CK nel sangue vuol dire che c'è anche un calo di performance.

	Inizio	Gennaio	Fine stagione	Fine riposo
CK U/l	166.3 ± 96.5	406.6 ± 202.4	286.5 ± 141.7	187.6 ± 130

LATTATO

I livelli normali di lattato nel sangue venoso sono compresi fra 1 e 1,7 mmol/l e possono subire incrementi superiori a quelli di qualsiasi altro analita: 16-17 mmol/l nei sedentari, 25 mmol/l negli atleti e **fino a 32 mmol/l** negli esercizi intermittenti di elevata intensità.

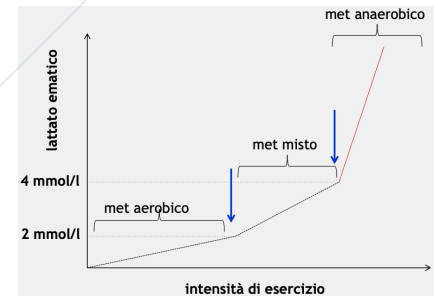


Nel lavoro massimale la concentrazione ematica di lattato aumenta progressivamente raggiungendo un **picco entro 5-8 minuti**. La lattacidemia diminuisce esponenzialmente col tempo e presenta un **tempo di dimezzamento di circa 15 minuti**. Se il recupero è attivo (cioè viene eseguito un esercizio a bassa intensità) la diminuzione della lattacidemia è più veloce.

Lo smaltimento del lattato è fatto principalmente dal muscolo, cuore e fegato (tramite il ciclo di Cori).

SOGLIA ANEROBICA

La soglia anaerobica è il livello massimo di sforzo che l'organismo può sostenere senza accumulare lattato nel sangue (nel grafico è il punto di passaggio da metabolismo misto a quello prevalentemente anaerobico). Al di sotto di questa soglia il metabolismo dell'atleta è sostenuto esclusivamente o quasi da meccanismi aerobici e lo sforzo può essere sostenuto per periodi lunghi. Sopra la soglia, invece, si attivano meccanismi anaerobici. Un atleta può sostenere uno sforzo oltre la soglia solo per periodi molto brevi, di pochi minuti al massimo, dopodiché deve fermarsi o almeno ridurre l'intensità dello sforzo.



Nel 1976 Mader dimostrò che il lavoro muscolare corrispondente ad una produzione di lattato tale da non comportare accumulo, risultava equivalente ad una **concentrazione ematica di lattato pari a 4 ± 1 mmol/l**. La conoscenza della soglia anaerobica di un atleta è fondamentale per la programmazione dell'allenamento e l'impostazione della gara. La soglia anaerobica è modificabile con l'allenamento ad intensità appena minore della soglia stessa. Questo permette una maggior efficienza del metabolismo ossidativo.

METODOLOGIE PER IL DOSAGGIO DEL LATTATO

Si utilizza sangue capillare arterializzato proveniente dal polpastrello o dal lobo dell'orecchio. Il lattato va misurato nel sangue periferico entro 8 minuti dalla fine dello sforzo. Esistono test anche da campo come il test Conconi.

- Test a carico incrementale:** il soggetto inizia a pedalare o a correre a bassa intensità. Ad intervalli regolari (3-5 minuti) viene aumentato il carico. Si fanno almeno 5 step. Al termine d'ogni intervallo di carico, si effettua un piccolo prelievo di sangue dal lobo dell'orecchio o dal polpastrello del dito. Riportando i valori rilevati dal test, mmol/l, velocità o potenza, su un grafico si ottiene la curva della lattacidemia.
- Test a potenza stazionaria:** la potenza che il soggetto deve applicare rimane sempre costante. La durata del test ha tempi abbastanza prolungati (almeno 30 minuti). Ad intervalli di tempo (3-5 minuti) si effettuano i prelievi di sangue per stabilire la lattacidemia.

FERRO

Nell'organismo di un uomo adulto sono presenti **da 3 a 5 grammi di ferro**. Esso è inserito nella molecola dell'eme (in Fe^{2+} , se fosse ossidato a Fe^{3+} nell'emoglobina non legherebbe più l'ossigeno. L'eme serve a "proteggere" il ferro e a non farlo ossidare) ed è indispensabile per la costituzione e la produzione di emoglobina.

- Ferro eminico:

FerroHb: 70-75%

FerroMb: 3-5%

Ferro citocromi: 0,2 %

- Ferro non eminico:

Ferro di riserva: 20 - 25%

Ferro di trasporto: 0,1 %.

Alimenti di provenienza animale		Alimenti di provenienza vegetale	
	mg/100g		mg/100g
Cavallo	3.2	Pane bianco	1.0
Pollo	2.0	Pane integrale	2.5
Bovino	2.2	Fagioli secchi	6.5
Suino	1.5	Cicoria	1.5
Fegato	16.0	Spinaci	2.9
Molluschi	5.5	Radicchio	8.0
Pesce azzurro	1.5	Mandorle	4.5
Ovo	2.5	Cacao	14.2

In tabella gli alimenti a maggior contenuto di ferro.

In una dieta è raccomandato **assumere 12mg per un uomo e 15mg per una donna** (maggiore necessità a causa del ciclo mestruale). Il ferro provenienti dalle fonti vegetali è poco assorbito, ma i legumi contengono molto ferro e quindi sono una valida alternativa alla carne per i soggetti vegetariani.

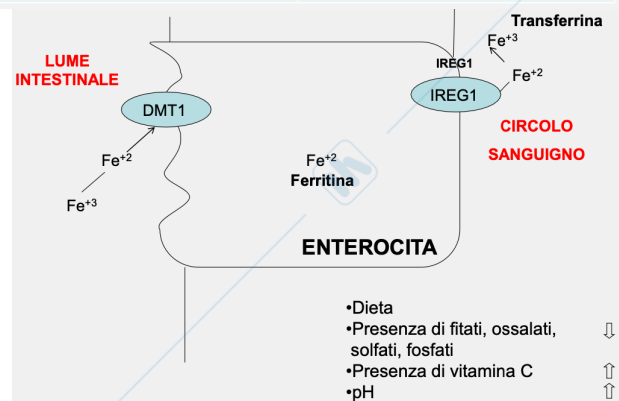
L'assorbimento intestinale del ferro è piuttosto ridotto, varia dal 3 al 18% e viene assorbito nel duodeno e dipende da due fattori:

- Quantità contenuta negli alimenti;
- Forma in cui si trova: il ferro eminico è assorbito come tale, mentre il ferro non eminico deve essere liberato dai composti in cui si trova.

Il ferro che proviene dalla carne è sempre ferro eminico e quindi l'enterocita può assorbirlo così com'è legato al gruppo eme, mentre il ferro proveniente dai vegetali deve essere ridotto da Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Il ferro Fe^{2+} non eminico viene portato all'interno dell'enterocita dal trasportatore DMT1, mentre il passaggio dall'interno dell'enterocita al circolo sanguigno viene trasportato legato alla transferrina in forma Fe^{3+} . **Quindi c'è un continuo ciclo tra Fe^{2+} e Fe^{3+} .**

Fattori che aumentano l'assorbimento di ferro	effetto
Funzionalità gastrica	Ambiente acido \Rightarrow riduzione Fe^{3+}
Cottura	Distacco ligandi
Agenti riducenti (vit C)	Riduzione Fe^{3+}
Assenza di calcio nel lume intestinale	Assenza di competizione nell'assorbimento
Caffeina e fibre	Riducono assorbimento



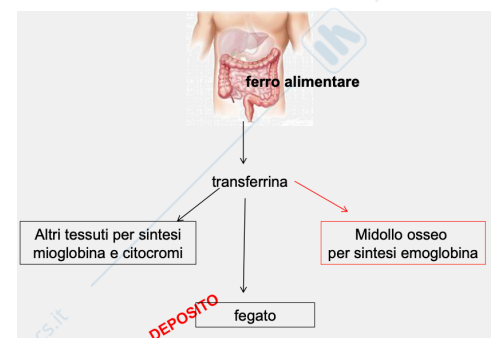
Trasporto: il ferro viene trasportato attraverso il sangue legato alla **transferrina**. Ogni molecola di transferrina lega 2 atomi di ferro e generalmente solo un terzo della quantità totale di transferrina è occupata da atomi di ferro.

Riserva: le maggiori riserve sono nel fegato e il ferro viene immagazzinato legato alla **ferritina**. Essa è costituita da 24 subunità che legano fino a 4500 atomi di ferro. La sintesi della ferritina è indotta dalla concentrazione intracellulare di ferro. Una piccola quantità di ferro legato alla ferritina è presente anche nel muscolo.

Riassumendo: il ferro alimentare viene trasportato in circolo legato alla transferrina e portato:

- Al midollo osseo per la **sintesi dell'emoglobina**;
- Al fegato come forma di **deposito** legato alla ferritina;
- Altri tessuti per la **sintesi di mioglobina e citocromi**.

Nel maschio le perdite sono relativamente poche in quanto anche il ferro perso con la lisi dei globuli rossi viene recuperato quasi completamente. Pertanto se si esclude la quota non assorbita con gli alimenti, che passa nelle feci, le perdite attraverso l'urina o la bile sono veramente minime.



ANEMIA DA SPORT

Rispetto alla popolazione sedentaria vi è una maggior suscettibilità degli atleti dilettanti e professionisti a sviluppare una riduzione dei depositi di ferro, fino ad avere difficoltà a mantenere una correzione eritropoiesi e quindi **anemia**. Si definisce anemia una diminuzione degli eritrociti **sotto ai 14 g/dl negli uomini e sotto i 12 g/dl nelle donne** e oltre ad essere di meno, gli eritrociti sono microcitici, ovvero presentano dimensioni minori rispetto al normale.

Le carenze di ferro comportano **riduzioni della concentrazione di emoglobina** nel sangue e di conseguenza delle **capacità prestative dell'atleta**. Tali deficit si manifestano inizialmente con generiche **riduzioni della forza** e continuano con **riduzioni progressive della potenza e della resistenza aerobica**.

L'anemia dello sportivo colpisce spesso gli atleti di endurance. Negli sport di squadra si stima:

- **Basket professionisti:** 22% degli atleti presenta carenze di ferro (maschi 15%, femmine 35%);
- **Calcio femminile professioniste:** 57% carenza di ferro e anemia da carenza nel 29% delle calciatrici.

Cause:

1. Emolisi

Nell'atleta si ha un turnover accelerato dei globuli rossi.

La prima causa di questo processo è l'emolisi periferica, particolarmente accentuata nei podisti (footstrike haemolysis).

Anche in altri sport si ha emolisi: si presuppongono modifiche indotte dall'esercizio sulla membrana eritrocitaria

2. Alimentazione

Questo perché il metabolismo del ferro ne è strettamente correlato. Difetti di introduzione di ferro sono molto frequenti nelle atlete, in special modo ballerine e ginnaste e in molti altri sport estetici come anche danza e pattinaggio. Esiste la triade delle atlete che è una sindrome in cui vi è una carenza calorica, amenorrea (=blocco del ciclo mestruale) e osteoporosi.

3. Perdita sudore e urine

La sudorazione in genere comporta perdite molto ridotte di ferro. La quota di ferro che viene perduta mediante il sudore è trascurabile, ma aumenta però la desquamazione cutanea e quindi vi è la perdita contenuta nelle cellule epiteliali. La perdita di ferro con le urine è maggiore nei podisti.

4. Perdite gastrointestinali

Durante gli sforzi intensi e di durata vi sono perdite di sangue dal tubo gastroenterico. Perdita di 4.9-6.6 mg di ferro durante l'allenamento intenso in podisti.

Cause micro-sanguinamento intestinale:

- trauma prodotto dall'impatto ripetuto delle pareti intestinali
- ridotto flusso ematico che viene dirottato ai muscoli
- assunzione di analgesici

DIAGNOSI ANEMIA DA SPORT

Negli stati di carenza di ferro sono riconoscibili tre stadi:

1. **Riduzione del compartimento di deposito** (ferro+ferritina). Qui non si avvertono sintomi;
2. **Carenza del compartimento funzionale** (ferro+transferrina). In genere è anche questo asintomatico nel sedentario, mentre nello sportivo è più probabile che ci siano sintomi;
3. **Anemia**: impossibilità di sintetizzare emoglobina. Sintomi palesi, con anche iperventilazione. Con l'anemia si perde l'idoneità agonistica.

Biochimica clinica del ferro

La **SIDEREMIA** è la concentrazione del ferro nel siero e indica la quantità di Fe³⁺ legato alla transferrina. Nel maschio i valori di riferimento sono 65-170 ug/dl e nella femmina 50-170 ug/dl. Tuttavia, **non è il parametro che meglio descrive il metabolismo del ferro** poiché presenta un'elevata variabilità biologica e il ritmo circadiano.

La **FERRITINA** rappresenta l'entità delle riserve di ferro ed infatti **diminuisce in carenza di ferro**. È un **marcatore precoce dell'anemia da sport**. È da considerare che l'esercizio fisico induce un aumento di ferritina sierica. È dovuto alla fuoriuscita della ferritina dal muscolo. Va dosata nell'atleta solo dopo almeno 3 giorni di riposo. I valori di riferimento sono 20-250 ng/ml negli uomini e 10-150 ng/ml nelle donne. La ferritina sta nel fegato poiché ad essa vi è il ferro di deposito, però non tutta la ferritina rimane nel fegato poiché in parte ne viene rilasciata nel sangue e la quantità rilasciata è in relazione alla quantità che ce né nel fegato.

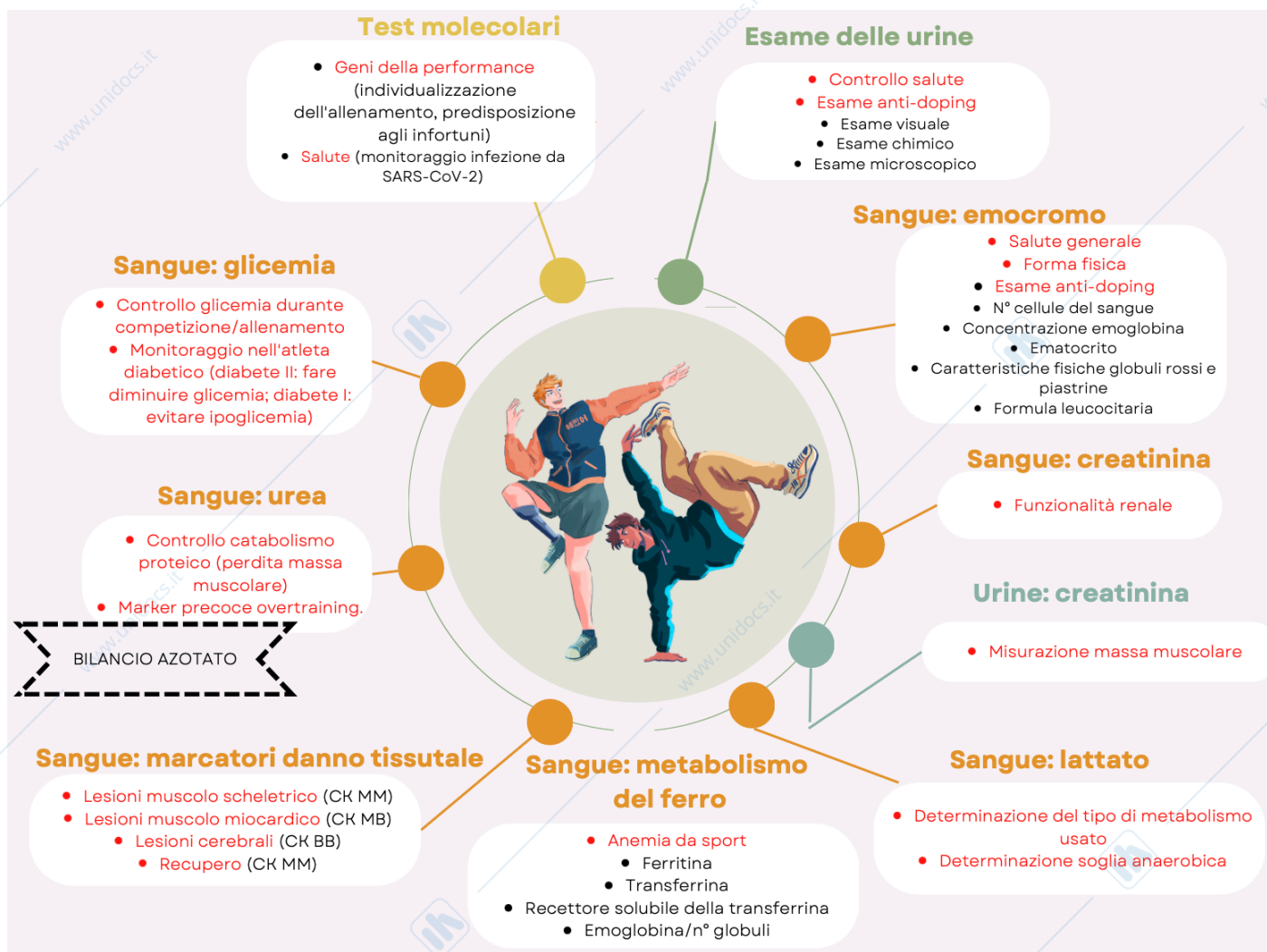
La **TRANSFERRINA** aumenta in carenza di ferro e i suoi valori di riferimento sono **220-400 mg/dl**. Il recettore della transferrina è presente a livello della membrana plasmatica e può essere lisato da una proteasi, originando una proteina solubile nel torrente circolatorio. La sua concentrazione è alta in caso di carenza di ferro. In carenza di ferro viene prodotta più transferrina perché è come se la cellula cercasse più ferro.

Stadio	emoglobina	sideremia	ferritina	transferrina
Carenza latente precoce	normale	normale	diminuita	normale
Carenza latente	normale	diminuita	diminuita	aumentata
Anemia	diminuita	diminuita	diminuita	aumentata

Il calo dei valori di emoglobina (135-170 g/l) e di eritrociti (4-5,2 x 10¹² /l) è segno di anemia.

Vi sono delle proteine che dicono se vi è in atto un processo emolitico. Le **APTOGLOBINE** legano l'emoglobina libera, cioè legano l'emoglobina fuoriuscita dai globuli rossi lisati. Mentre la catena proteica dell'emoglobina viene demolita, il ferro viene recuperato. Se l'emolisi è alta, allora le aptoglobine diminuiscono perché è come se si "consumassero". Il valore di riferimento è di 30-185 mg/dl.

In caso di carenza di ferro si dà supplementazione con ferro ferroso e aggiunta di vitamina C e acido folico. La supplementazione deve essere fatta per lunghi periodi di tempo.



DOPING

La prima definizione ufficiale di doping adottata dal CIO è del Congresso di Strasburgo del 1963 che recitava: corso del Congresso di Strasburgo del 1963 recitava testualmente: **"Il doping è la somministrazione ad un soggetto sano o l'utilizzazione fatta dal soggetto stesso, con qualsiasi altro mezzo, di una sostanza estranea al suo organismo. E questo con il solo scopo di aumentare artificialmente ed in maniera sleale la prestazione del soggetto in occasione della sua partecipazione ad una competizione."**

1928	IAAF bandisce il doping
1966	IAAF, FIFA, UCI introducono il test delle urine
1967	IOC istituisce una commissione medica e stila una prima lista delle sostanze proibite
1968	Test anti-doping vengono introdotti ai giochi olimpici
1970	Molte squalifiche per uso anabolizzanti steroidi
1986	Le trasfusioni sono bandite dalla IOC
1990	EPO introdotta nella lista sostanze proibite
1990	Introduzione dei test sul sangue
1999	Nasce la WADA
2004	Il codice anti-doping mondiale è adottato da tutto il mondo
2008	L'UCI introduce il passaporto biologico

Attualmente non si assumono più "sostanze estranee", ma si utilizzano molecole prodotte dal corpo umano e si utilizzano le **micro-dosi** che mimano la normale quantità prodotta da un organismo. Il problema è distinguere una dose fisiologica di una sostanza e quando una sostanza è assunta dall'esterno.

Il doping può essere distinto in tre categorie:

- **Steroidi e ormoni anabolizzanti:** Utilizzato soprattutto da atleti di potenza e velocità;
- **Stimolanti:** migliorano la concentrazione e alleviano la sensazione di fatica;

- Sostanze che aumentano il trasporto di ossigeno ai tessuti periferici e ai muscoli, incrementando la performance aerobica. Prende nome di **emodoping**.

EMODOPING

Le situazioni limitanti la produzione di energia da parte del muscolo sono:

- Disponibilità di substrati energetici intracellulari come il glicogeno muscolare;
- Efficiente trasporto per via ematica di substrati energetici;
- Sufficiente ossigenazione.

Pratiche mediche che aumentano la concentrazione di emoglobina o rendono più efficiente il meccanismo di trasporto dell'ossigeno migliorano la produzione di energia da parte del muscolo e pertanto rendono il muscolo più resistente alla fatica.

VO₂Max: dipende dal trasporto di ossigeno.

Stimolazione dell'eritropoiesi tramite allenamento in altura:

- Accelerazione dell'eritropoiesi;
- Iperventilazione;
- Aumento di 2,3 difosfoglicerato;
- Incremento FC a riposo;
- Incremento dei valori pressori durante i primi giorni;
- Incremento cortisolo e catecolammine.

Il soggiorno a elevate altitudini rappresenta un metodo fisiologico e legale per incrementare l'ossigenazione dei tessuti. **L'allenamento in altura aumenta le potenzialità aerobiche**. Si ritiene utile un'altitudine di 2000- 2500m e un soggiorno di almeno 2-3 settimane.

La **tenda ipossica** crea un ambiente a basso contenuto di ossigeno al suo interno, pompando aria con poco ossigeno. Le pratiche di **altitudine simulata sono attualmente ritenute un mezzo illegale per migliorare la performance atletica (in Italia, mentre in altre Nazioni sono legali)**. Anoressia, insonnia, iperventilazione ed emicrania caratterizzano le prime fasi del trattamento

Le **trasfusioni** sono state frequentemente utilizzate come emodoping. Nel 1984 la pratica è stata ufficialmente abolita. Le trasfusioni possono essere:

- **Autologhe:** donatore e ricevente sono la stessa persona. Con esse si rischia iperviscosità del sangue, flebiti, embolia ed aumento della concentrazione del ferro;
- **Eterologhe:** il sangue donato viene trasfuso ad una persona diversa. I rischi sono di tipo infettivo (HIV, HBV, HCV).

prelievo di sangue per trasfusione prevede il riempimento di una sacca da 450ml (una unità) contenente anticoagulanti. Il sangue da utilizzare per la trasfusione presenta una concentrazione alta di globuli rossi (ematocrito pari al 75%). La trasfusione di 1,35 litri di sangue porta ad un aumento di emoglobina del 14%. La **procedura tradizionale** di trasfusione autologa prevede il prelievo di 1-4 unità di sangue alcune settimane (circa un mese) prima della competizione.

I globuli rossi vengono isolati e conservati ad una temperatura di 4°C e vengono reinfusi **1-7 giorni prima dell'evento sportivo**.

L'autoemotrasfusione causa un aumento pressoché immediato della massa eritrocitaria. Entro 48 ore dalla trasfusione si assiste ad un incremento medio dell'emoglobina plasmatica dall'8 al 15%. Dopo la trasfusione, l'atleta riesce così ad incrementare la propria prestazione dal 5 al 10%. In seguito alla trasfusione si verifica un **repentino miglioramento della capacità aerobica** e della prestazione nelle prove di resistenza. La trasfusione non apporta benefici significativi agli atleti impegnati in discipline anaerobiche.

Rischi legati alle trasfusioni

- I rischi legati alle trasfusioni eterologhe sono di tipo infettivo (HIV, HBV, HCV)
- I rischi legati alle trasfusioni autologhe sono: iperviscosità del sangue, flebiti, embolia, aumento concentrazione ferro

Per quanto riguarda la **rilevazione delle trasfusioni**:

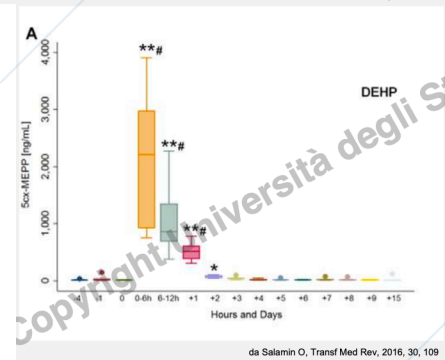
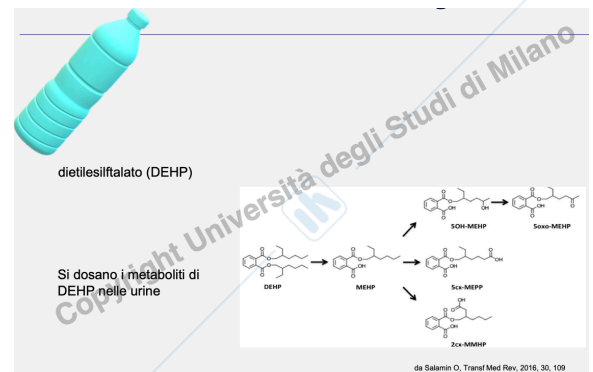
- **Eterologhe:** sistema dei gruppi sanguigni minori per rilevare trasfusioni di sangue da altri individui. Le trasfusioni di sangue dallo stesso individuo non possono essere rilevate in questo modo. I gruppi sanguigni minori sono MNS, Lewis, Duffy, ecc...;

- Le trasfusioni **autologhe** possono essere solo sospettate quando aumenta l'ematocrito e aumenta la concentrazione di emoglobina.

Allo studio:

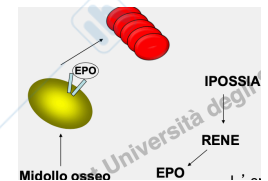
- 1: Alterazione dell'espressione genica dei globuli bianchi dopo trasfusione (RNA)
- 2: Aumento di epcidina
- 3: Rilascio delle sostanze di conservazione

Si era pensato di rilevare le trasfusioni autologhe **tramite il rilevamento degli ftalati** che sono delle molecole che derivano dalla plastica. Si era pensato che il riscontro degli ftalati nel sangue avrebbe significato che il sangue era stato contenuto in una sacca di plastica e così si sarebbe potuto rilevare una trasfusione autologa. In effetti gli ftalati rimangono alti per due giorni dopo la trasfusione. Il problema è che la contaminazioni da ftalati sono molto comuni in qualsiasi soggetto anche senza l'uso di doping e il controllo dovrebbe avvenire solo entro due giorni dalla trasfusione.



Il gene per l'**eritropoietina (EPO)** è stato "clonato" negli anni '80. Negli anni '90 è diventato il farmaco di elezione per migliorare la performance negli sport di resistenza. L'EPO è un fattore di crescita ed è in grado di modulare la velocità di produzione degli eritrociti inducendo la proliferazione dei precursori. L'EPO è utilizzata per scopi clinici per l'anemia derivata da patologie renali e per la chemioterapia. L'EPO è composta per il circa 40% da glucidi.

L'EPO è prodotta principalmente dal rene e per il 10% circa dal fegato. Il rene produce EPO in risposta alla diminuzione di ossigeno nel sangue, quindi la produzione endogena non è costante nel tempo, ma varia.



L'EPO ricombinante umana viene prodotta inserendo il gene umano dell'eritropoietina in linee cellulari di criceto. A livello proteico l'EPO ricombinante è identica a quella umana, ma varia leggermente nel contenuto glucidico. Questa EPO fatta cellule di criceto viene denominata eritropoietina alfa e beta. Se un atleta volesse andare "sul sicuro" nei controlli antidoping, dovrebbe utilizzare l'epo delta che è prodotta da cellule umane, ma costa maggiormente rispetto alle alfa e beta perché le cellule di criceto rilasciano l'EPO naturalmente, mentre per "prendere" l'EPO prodotta dalle cellule umane bisogna lisare le cellule.

In caso di utilizzo di EPO ricombinante è possibile riscontrare nel sangue anche i **reticolociti** (precursori degli eritrociti) che in condizioni fisiologiche non sono presenti nel torrente ematico.

In genere l'EPO viene **iniettata ogni 2-3 giorni per 3-4 settimane** associate a integratori contenenti ferro. Si inietta sottopelle. In circolo non dura molto l'EPO. Questo consente:

- Incremento della massima potenza aerobica;
- Aumento del trasporto dell'ossigeno ai tessuti ed in particolare ai muscoli scheletrici.

Il valore più precoce ad aumentare è il numero di reticolociti, poi successivamente aumentano sia l'ematocrito che l'emoglobina dopo una ventina di giorni.

L'uso prolungato di EPO a scopo dopante:

- Determina l'inibizione dell'attività del midollo osseo (aplasia)
- Iperviscosità;

- Ipertensione-vasocostrizione;
- Attivazione della coagulazione (trombosi);
- Sovraccarico di ferro.

Forse potrebbe avere anche effetti a livello cardiaco, ma non si sa ancora con certezza.

Vi sono dei problemi di rilevazione dell'EPO:

- L'EPO prodotta dall'organismo e quella esogena introdotta come farmaco sono molto simili;
- L'EPO si ritrova in circolo per brevissimo tempo visto che presenta un'emivita di 8 ore e mezza.

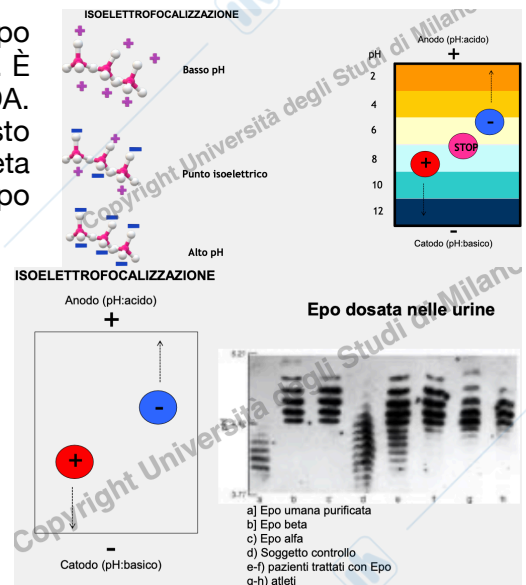
Per questa ragione si ricercano i segnali indiretti dell'assunzione di epo, ovvero aumento di ematocrito, emoglobina e reticolociti.

METODI DIRETTI

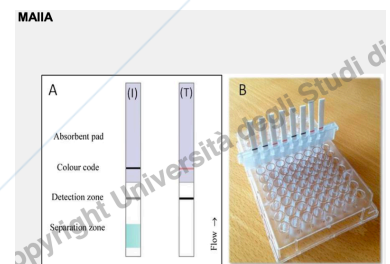
Rilevano direttamente in sangue o urine la presenza di epo ricombinante. Il metodo più utilizzato è l'**isoelettrofocalizzazione**. È utilizzato come test di secondo livello ed è approvato dalla WADA. Un atleta che ha un ematocrito alterato viene sottoposto a questo test (per quello è indicato come test di secondo livello). Se un atleta è positivo a questo test significa che sicuramente ha assunto l'epo ricombinante.

Se l'epo è messa in pH basico allora si caricherà positivamente, mentre a pH acido si caricherà negativamente. Esiste comunque il punto isoelettrico in cui le cariche si equivalgono. Questo test è svolto **sulle urine**.

Tramite la carica elettrica dell'epo si può scoprire l'assunzione o meno di eritropoietina alfa e beta (quelle prodotte da cellule di criceto), mentre in caso di epo delta non è possibile distinguere quella ricombinante da quella fisiologica. Un altro limite di questo test è che per essere efficace deve essere svolto meno di un giorno dopo rispetto all'assunzione dell'epo ricombinante.



Un altro metodo si chiama **Maiia** che si fa sul sangue o le urine. In ogni pozzetto viene inserito il campione da testare e tramite la risalita del campione si può discernere tra l'epo ricombinante alpha e beta e delta/umana. È un test molto rapido, ma presenta gli stessi problemi dell'isoelettrofocalizzazione.



Quello con maggiore sensibilità è la **cromatografia liquida-spettrometria di massa** e si hanno due apparecchiature: l'HPLC (cromatografia liquida) e si utilizza sia con sangue che con urina. L'HPLC separa tutte le molecole presenti nel campione e vengono identificate. L'operatore alla fine vede sia la concentrazione che la tipologia di molecole inserite. È un test utilizzato anche per i test antidroga. Il problema è sempre lo stesso: per riscontrare l'epo è necessario fare il test poco tempo dopo l'assunzione.

Metodi diretti: limiti

- Breve vita dell'Epo nell'organismo
- Incertezza sul fatto che tutte le Epo commerciali siano effettivamente così diverse

METODI INDIRETTI

No start: Vengono fissati dei livelli soglia per alcuni parametri al di sopra dei quali non si può competere:

- **Ematocrito:** è stato il primo parametro utilizzato dall'Unione Ciclistica Internazionale. È stato scelto un limite pari al 50% di Ht per gli uomini e pari al 47% per le donne. Questo valore serve anche per salvaguardare la salute e non solo e soltanto per motivi di antidoping. L'ematocrito varia in modo circadiano con una riduzione notturna del 2,5% circa. È comunque possibile una riduzione dell'8% per infusione (iniezione) di un litro di soluzione fisiologica, quindi con mezzo litro di fisiologica si abbassa del 4%;
- **Emoglobina:** la federazione internazionale dello sci ha stabilito come limiti per competere 17,5 g/dl di Hb per i maschi e 15,5 g/dl di Hb per le femmine. Questi valori corrispondono circa ad un ematocrito superiore al 50%.

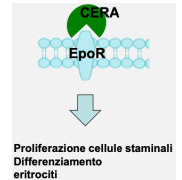
Successivamente si fanno esami di secondo livello (metodi indiretti). Un altro parametro di secondo livello è la conta dei reticolociti poiché è il parametro più precoce che segnala stimolazione del midollo osseo. Il limite è fissato a 2,4%. Il problema è che nella conta dei reticolociti vi è una variazione del 20% nel corso delle 24 ore a causa dell'elevata variabilità circadiana di questo valore.

VARIAZIONI DELL'EMATOCRITO

- Ritmo circadiano: riduzione notturna del 2.5 %
- Riduzione dell'8 % per infusione di un litro di soluzione fisiologica
- Variabilità presente negli atleti
- Allenamento in altura

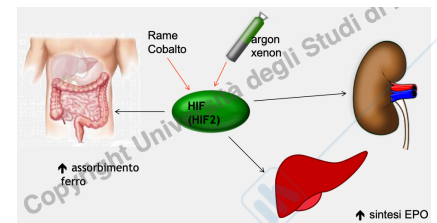
ALTERNATIVE ALL'EPO RICOMBINANTE

Una di esse è darbepoetina (Aranesp) che è una molecola più attiva dell'epo e quindi sono necessarie meno somministrazioni. Essa ha un'emivita di 24-26 ore ed è ritrovabile nelle urine fino a 7 giorni (l'epo ha un'emivita di 6-8 ore ed è ritrovabile nelle urine fino a 18-24 ore). La darbepoetina differisce dall'epo per la parte glucidica che può essere distinta dall'epo endogena.



I **CERA** sono attivatori continui del recettore dell'eritropoietina (epo di terza generazione), il nome commerciale è "mircera". Sono costituiti oltre che da una parte proteica (identica all'epo) e da una grossa catena polimerica (PEG) con un peso molecolare circa doppio rispetto all'epo. I CERA hanno un'emivita molto lunga (circa 7 giorni) e quindi sono necessarie meno iniezioni.

Gli attivatori/stabilizzatori di HIF agiscono prima di arrivare all'eritropoietina. L'organismo "rileva" l'ipossia tramite la produzione di HIF (hipoxic factor) dalle cellule in condizioni di mancanza di ossigeno. HIF stimola la produzione di epo da parte di reni e fegato, inoltre aumenta l'assorbimento di ferro a livello intestinale. Il doping su HIF agisce stimolandone la produzione. In questo modo l'epo in circolo aumenta, ma è totalmente endogena. Vi sono sostanze che vengono utilizzate per stimolare la produzione di HIF: rame e cobalto (sono tossici e vengono usati solo per il doping su cavalli), mentre per l'uomo vengono utilizzati argon e xenon che sono gas nobili che vengono ispirati per qualche secondo. Sono gas che non lasciano traccia e stimolano il rilascio di HIF.



PASSAPORTO BIOLOGICO

È stato proposto all'inizio del 2000 e tiene conto di età, genere e allenamento in altura. Viene utilizzato in modo stringente in pochi sport: ciclismo e atletica. È dal 2008 che è stato validato. Si compone di tre moduli:

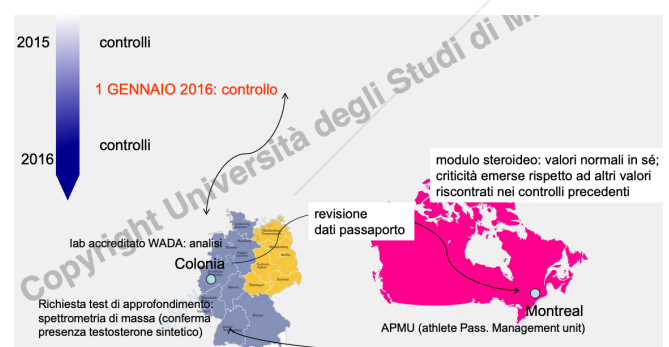
- **Modulo ematologico:** emodoping, dal 2008 per alcune Federazioni;
- **Modulo steroideo:** doping anabolizzanti steroidei, dal 2014;
- **Modulo endocrinologico:** doping GH.

L'analisi antidoping le rilevazioni avvengono a sorpresa e in qualsiasi momento dell'anno. Nel passaporto biologico vengono comparati nel tempo tutti i test eseguiti sull'atleta.

CASO SCHWAZER

È stato sottoposto al modulo steroideo (cerca cataboliti degli steroidi). Il primo gennaio 2016 è stato sottoposto ad un controllo a sorpresa di sangue ed urine. Il campione è stato inviato in un laboratorio accreditato dalla WADA in Colonia. Dalle analisi sono emerse criticità rispetto ad altri valori riscontrati nei controlli precedenti, ma i valori non erano superiori ai valori soglia.

La valutazione dei dati non è fatta dal laboratorio di Colonia, ma è fatta dall'APMU (Athlete Pass Management Unit) in Canada, a Montreal. Siccome a Montreal hanno visto i valori anomali, allora hanno



chiesto al laboratorio di Colonia di fare test di approfondimento tramite spettrometria di massa. Questo secondo test ha confermato la presenza di testosterone sintetico nei campioni di Schwazer.

FASI DEL PASSAPORTO BIOLOGICO

1. Raccolta dei campioni;
2. Trasporto e conservazione dei campioni;
3. Analisi in un laboratorio accreditato WADA;
4. APMU: valutazione dati, controllo validità dati, processamento del passaporto e compilazione dell'adverse passport finding.

Nel **modulo ematologico** vengono dosati:

- Concentrazione media di emoglobina corpuscolare (MCHC);
- Percentuale e numero dei reticulociti;
- Off-Hr score: index of stimulation Hb, è un parametro calcolato che può aiutare ad individuare meglio una stimolazione del midollo osseo;
- Emoglobina corpuscolare media (MCH);
- MCV;
- Conta dei globuli rossi;
- Emoglobina;
- Ematocrito.



Nel **modulo steroideo** vengono dosati:

- **Metaboliti** urinari del testosterone;
- **Epitestosterone**: isomero inattivo;
- Viene fatto anche un rapporto tra testosterone ed epitestosterone. Solitamente questo rapporto è in rapporto di 2:1 o di 3:1. Se un atleta si dopa allora il rapporto aumenterà dato che vi sarà una maggior quantità di testosterone. Un rapporto superiore di 4:1 implica una valutazione successiva dei campioni, mentre un rapporto superiore a 6:1 suggerisce violazione.

Nel modulo steroideo, un passaporto alterato viene approfondito con **IRMS** (spettrometria di massa isotopica) che va a cercare gli isotopi degli atomi di carbonio. L'isotopo ricercato è il C13 che si trova negli steroidi sintetici, mentre negli steroidi endogeni vi è il C12. È soprattutto il rapporto tra il C13 e il C12 che permette il riscontro di steroidi sintetici.

Il **modulo endocrinologico è ancora in fase di studio/proposta**. Questo perché non si sa ancora bene come discriminare la produzione endogena dall'assunzione esogena.

Il GH va a stimolare la produzione e secrezione di IGF-1. Un protocollo allo studio è di valutare l'**IGF-1** presente nel sangue e quindi una maggior produzione dello stesso potrebbe indicare l'assunzione esogena di GH. Però durante un'attività di potenza l'IGF-1 aumenta in modo naturale.

Una seconda possibilità è quella di **cercare le isoforme di GH**. L'ipofisi produce isoforme di GH con delle leggere differenze di peso. Con l'assunzione esogena di GH diventa predominante la forma da 22 KDa. L'idea è di misurare tutte le isoforme e stabilirne i rapporti tra di loro. Nel caso in cui dovesse aumentare l'isoforma da 22 KDa allora si è in caso di un presunto caso di doping.

DOPING GENETICO

Viene alterato direttamente il DNA dell'atleta utilizzando metodiche di terapia genica. Dal gennaio 2003 il CIO ha incluso il doping genico nella lista delle sostanze e metodi proibiti. La definizione della WADA: "uso non terapeutico di cellule, geni, elementi genetici o della modulazione dell'espressione genetica, con lo scopo di migliorare le prestazioni atletiche".

Ad oggi non ci sono possibilità di rilevazione del doping genetico e non si conoscono i potenziali rischi, anche se si presume che sia una maggior possibilità di essere affetto da tumori. I geni interessanti dal doping genetico sono quelli di:

- **Eritropoietina**: si fa in modo che il muscolo scheletrico che produca epo. Vi è un farmaco, l'eritropoigen, che permette di fare questo;
- **GH**: è l'ormone della crescita;
- **Endorfine ed encefaline**: producono un effetto analgesico permanente;
- **IGF-1**: fattore di crescita insulino-simile. È una proteina ipertrofica ad efficacia molto elevata. Aumenta l'attività di potenza e la massa muscolare. Risponde al GH;
- **Inibitore della miostatina**: aumenta la massa muscolare a l'attività di potenza. La miostatina è una proteina anti-ipertrofica. Quindi senza miostatina non vi è più l'attività di controllo di crescita muscolare.