



**Facoltà di Scienze Motorie  
Università degli Studi di Verona**

**Corso di  
“Farmacologia”  
Lezione: Eritropoietina**

**Docenti:  
Guido Fumagalli**

# Eritropoietina (EPO)

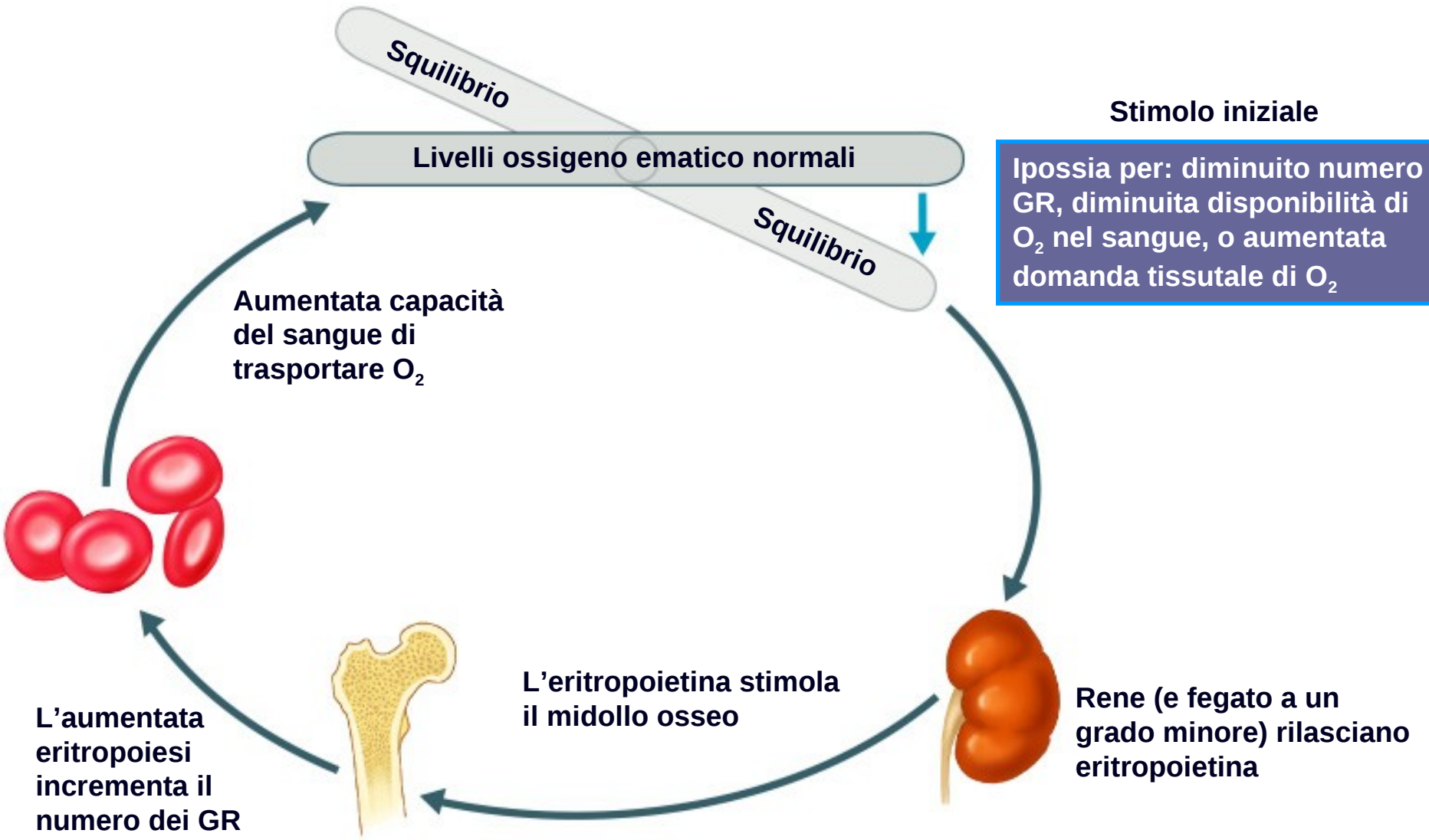


- Come è noto i globuli rossi (GR) trasportano l'ossigeno ai tessuti e negli sport di resistenza, ad esempio ciclismo, sci di fondo, ecc., le richieste di ossigeno sono molto elevate
- Da tempo, pertanto, sono state indagate strategie per aumentare la produzione dei GR in modo da migliorare la performance sportiva
- Una delle più recente strategie è basata sul ruolo dell'eritropoietina nello stimolare il midollo osseo a produrre globuli rossi
- Come doping si usano la EPO ricombinante umana (rHuEPO) e sostanze affini (es. **darbepoietina, CERA,...**)

# Storia dell'eritropoietina

- 1905 Carnot e Deflandre ipotizzarono che un fattore umorale, che chiamarono emopoietina, regolava la produzione dei globuli rossi
- 1936 Hjort dimostrò e confermò l'esistenza di questo fattore
- 1950 Reissmann dimostrò che l'espressione genica del fattore era regolata dalla pressione d'ossigeno
- 1977 Miyake riuscì a purificare l'eritropoietina umana
- 1985 Lin e Jacobs clonarono il gene dell'eritropoietina e svilupparono una linea cellulare transfettata (cellule CHO) capace di produrre eritropoietina ricombinante umana
- 1989 clonazione del recettore dell'EPO
- 2000 sintesi della darbepoietina
- 2004 CEPA

# Eritropoiesi

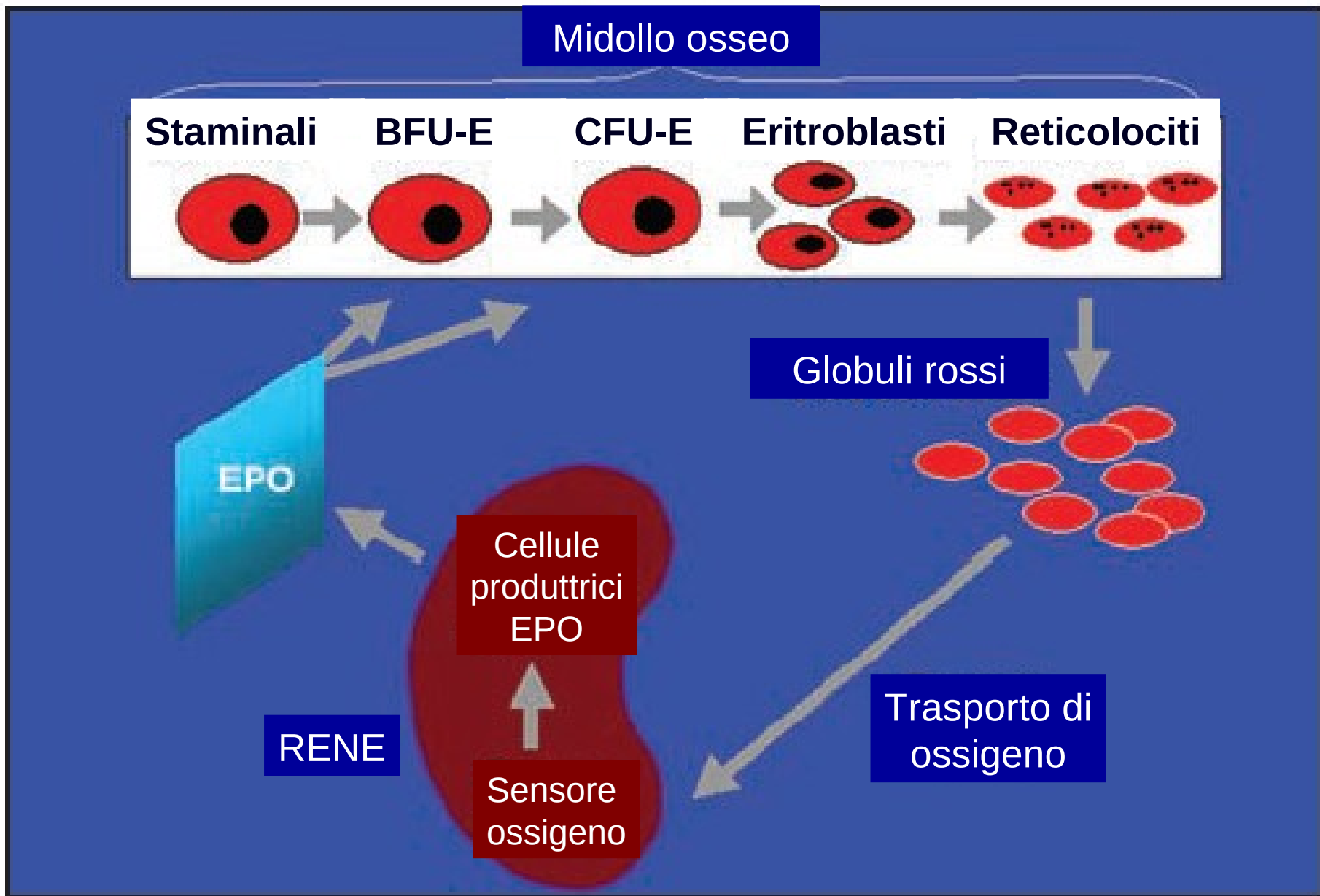


# Eritropoiesi ed ipossia

- L'eritropoiesi è controllata da un sistema a feedback molto sensibile, in cui un sensore a livello del rene percepisce le alterazioni nell'apporto di ossigeno
- Il meccanismo si basa sulla presenza di un fattore di trascrizione (Hypoxia-inducible factor, HIF-1) eterodimerico (HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ ) che aumenta l'espressione del gene dell'eritropoietina
- HIF-1 $\alpha$  è instabile in presenza di ossigeno e viene rapidamente degradato dalla prolil-idrossilasi con il contributo della proteina di von Hippel-Lindau
- Durante ipossia la prolil-idrossilasi è inattiva di conseguenza HIF-1 $\alpha$  si accumula attivando l'espressione dell'eritropoietina che stimola la rapida espansione dei progenitori eritroidi

# Eritropoietina umana

- L'eritropoietina è una proteina composta da 193 aminoacidi (ma i primi 27 sono scissi durante la secrezione)
- Viene prodotta principalmente dalle cellule interstiziali peritubulari del rene, sotto il controllo di un gene situato sul cromosoma 7
- Dopo la secrezione l'eritropoietina, a livello del tessuto emopoietico (midollo osseo), si lega ad un recettore (EPO-R) localizzato sulla superficie dei progenitori eritroidi e viene internalizzata
- In presenza di anemia o ipossiemia la sintesi di EPO cresce rapidamente di più di 100 volte e conseguentemente aumenta la sopravvivenza, proliferazione e maturazione delle cellule progenitrici midollari anche attraverso l'inibizione dell'apoptosi (morte cellulare programmata)



BFU-E = unità formanti aggregati-eritrociti; CFU-E = unità formanti colonie-eritrociti

A

B

Membrana cellulare

JAK2= Janus chinasi 2

C

zione con



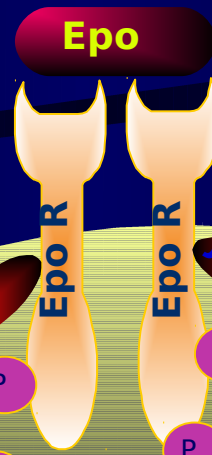
D

ne di P

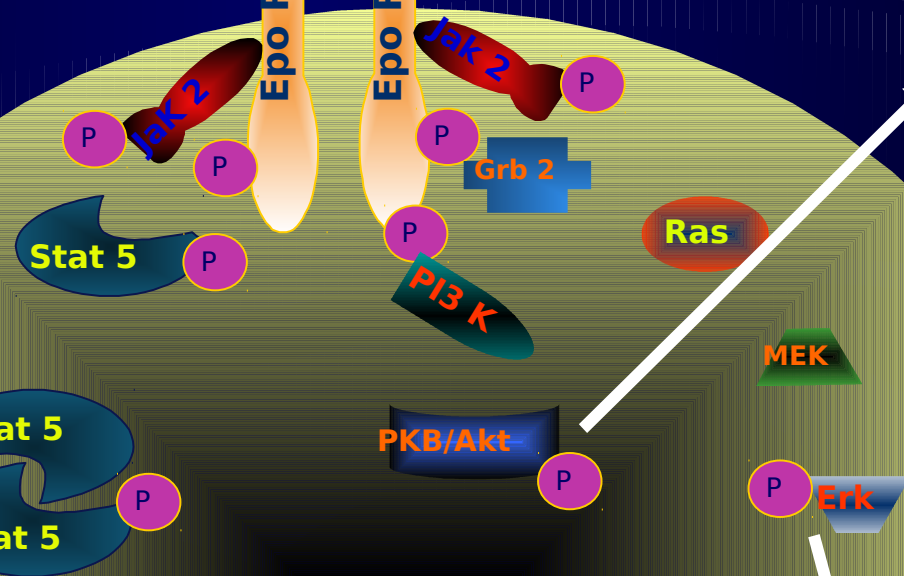




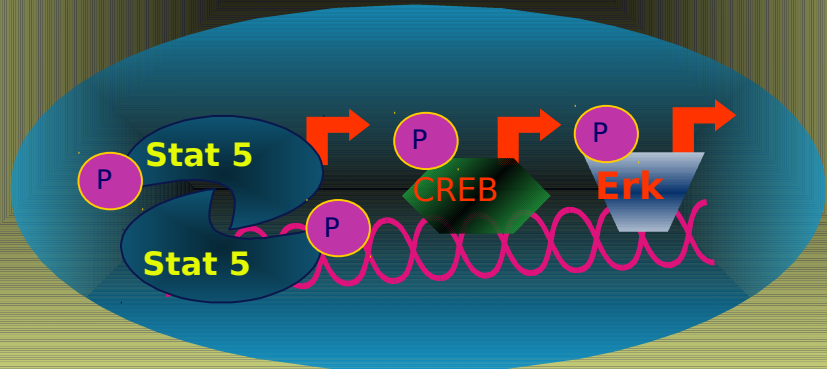
Segnali intracellulari attivati dall'EPO



Sopravvivenza cellulare



Proliferazione



Differenziamento

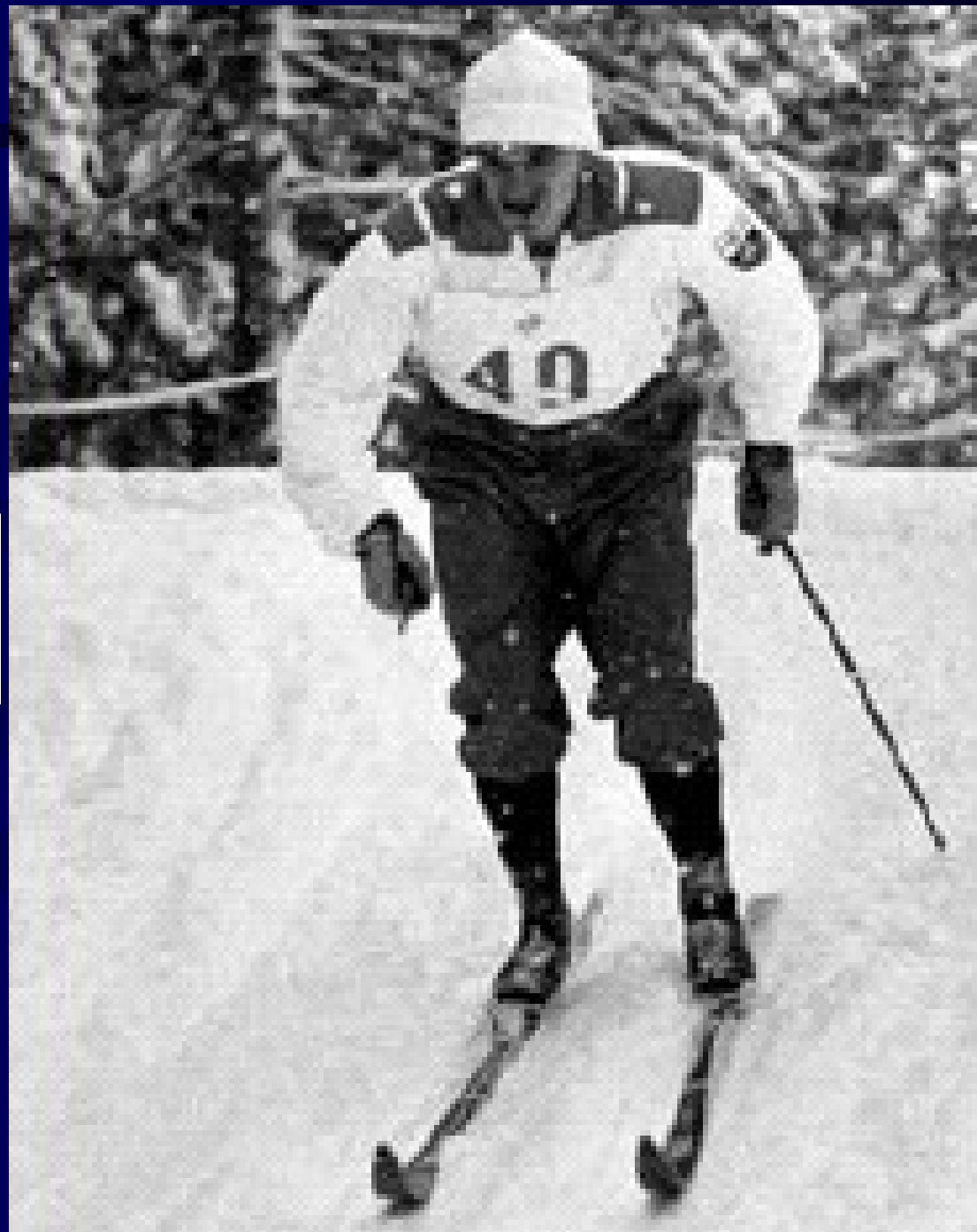
# Eritropoietina umana

- I livelli normali di EPO nel sangue sono circa 2-25 mU/ml, ma possono aumentare di 100-1000 volte come risposta all'ipossia
- Il meccanismo a sensore d'ossigeno porta ad interrompere la produzione di EPO quando il numero dei GR e/o la fornitura di ossigeno ai tessuti ritorna all'equilibrio
- Il meccanismo a feedback assicura una produzione adeguata di GR per prevenire l'anemia e l'ipossia tissutale, ma non troppo elevata da portare a policitemia con eccessiva viscosità del sangue e conseguenti rischi cardiovascolari
- La sovrapproduzione di EPO che porta a policitemia (secondaria da distinguere dalla policitemia vera o primaria: disordine mieloproliferativo dove proliferano cloni, indipendenti dall'EPO, di cellule progenitrici con incremento sia di GR che di granulociti e piastrine) può derivare da patologie cardiache o respiratorie, dall'altitudine, da ostruzioni del flusso sanguigno al sito di produzione dell'EPO, da tumori produttori EPO
- Nella policitemia secondaria i livelli di EPO sono in genere elevati, ma possono anche essere nella norma per aumento del suo turnover

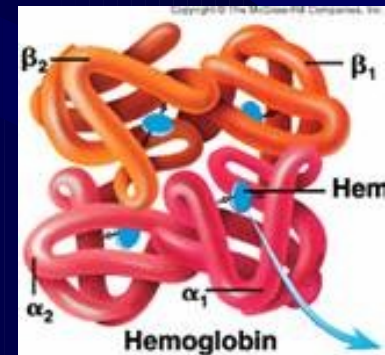
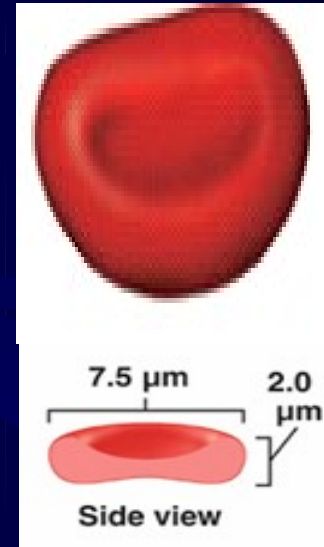
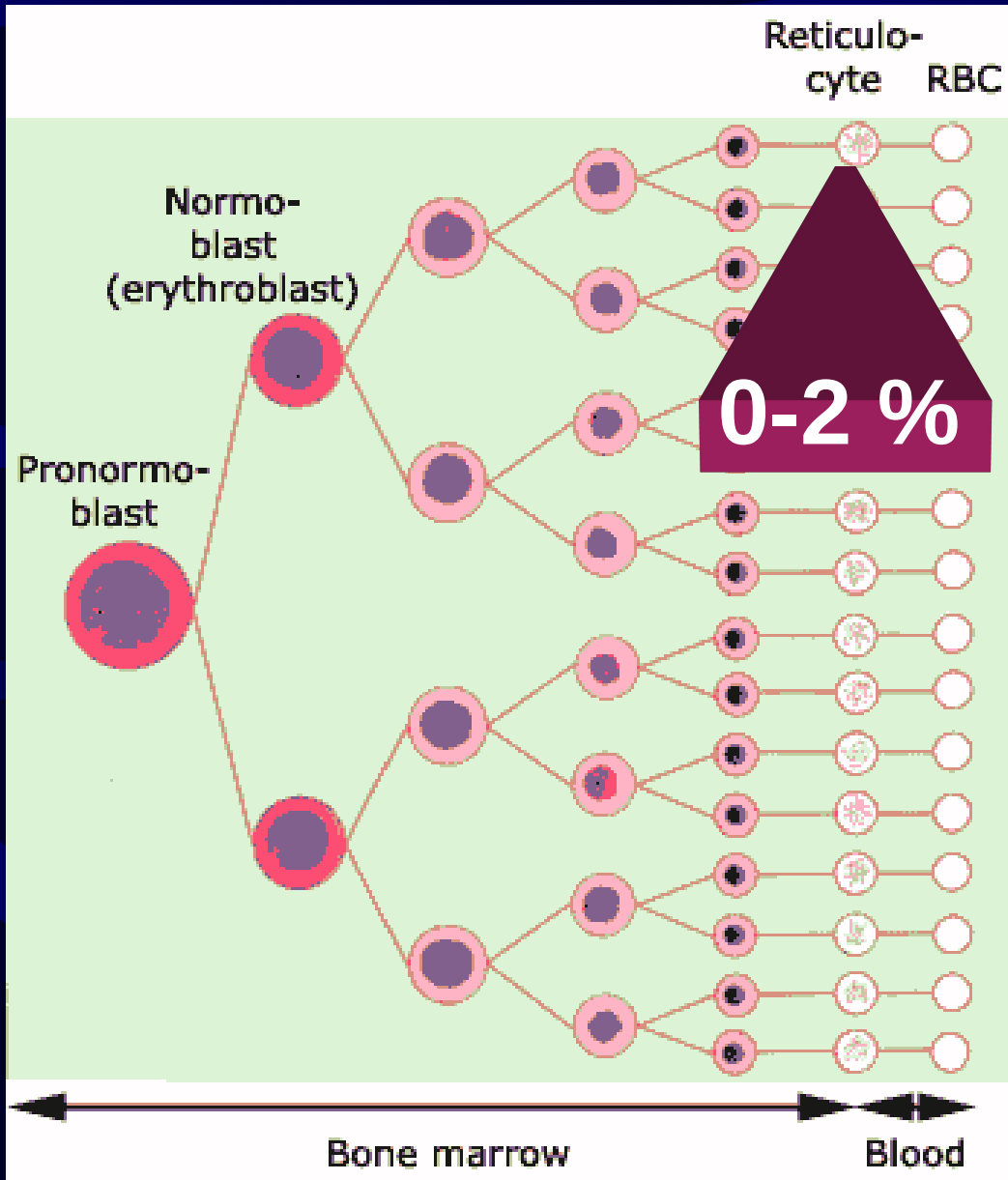
# Eritropoietina umana

- E' noto che le differenze genetiche esistenti tra gli atleti possono essere un elemento alla base delle diverse capacità di prestazione
- Tra le possibili differenze genetiche alcune possono riguardare l'eritropoiesi in generale e specificatamente l'eritropoietina
- Un esempio è la storia del fondista finlandese Eero Mäntyranta, doppia medaglia d'oro alle Olimpiadi del 1964 ad Innsbruck
- Era nato con una mutazione genica dell'EPO (espressa a livello recettoriale) che aumentava del 25-50% la sua capacità di trasporto di O<sub>2</sub> con i GR
- Tale condizione para-fisiologica potrebbe essere riprodotta attraverso manipolazione genica

**EERO MÄNTYRANTA**  
**Naturally Rich Blood**



# Formazione dei globuli rossi



**Maschi <17 g/dl**  
**Femine <16 g/dl**

# Eritropoietina umana

- Il numero dei recettori per l'EPO varia nelle diverse cellule della linea eritrocitaria. Il massimo si ha nelle CFU-E, il numero diminuisce con il progredire del differenziamento e della maturazione delle cellule eritrocitarie. Gli eritrociti maturi sono privi di recettori per l'EPO
- Recettori per l'EPO sono stati individuati anche sui miociti, sulle cellule endoteliali, nel SNC, ovaio e testicoli
- L'EPO, pertanto, si pensa abbia un ruolo fisiologico nello sviluppo del cuore e del cervello
- L'EPO protegge i tessuti cardiaci e nervosi dall'infiammazione e dal danno ischemico: sia attraverso la stimolazione diretta delle cellule nervose e cardiache che indirettamente mobilizzando cellule progenitrici endoteliali promuovendo, così, la neo-vascularizzazione

**CELLS EXPRESSING EPO AND EPOR IN THE CENTRAL  
NERVOUS SYSTEM**

**UNDIFFERENTIATED NEUROEPITHELIAL  
CELLS**

**astrocytes**

**neurons**

**cajal retzius cells  
choroid plexus cells**

**Neurodevelopment    Neuroprotection  
Neurotransmission**

**EPO e  
SNC**

# Eritropoietine esogene

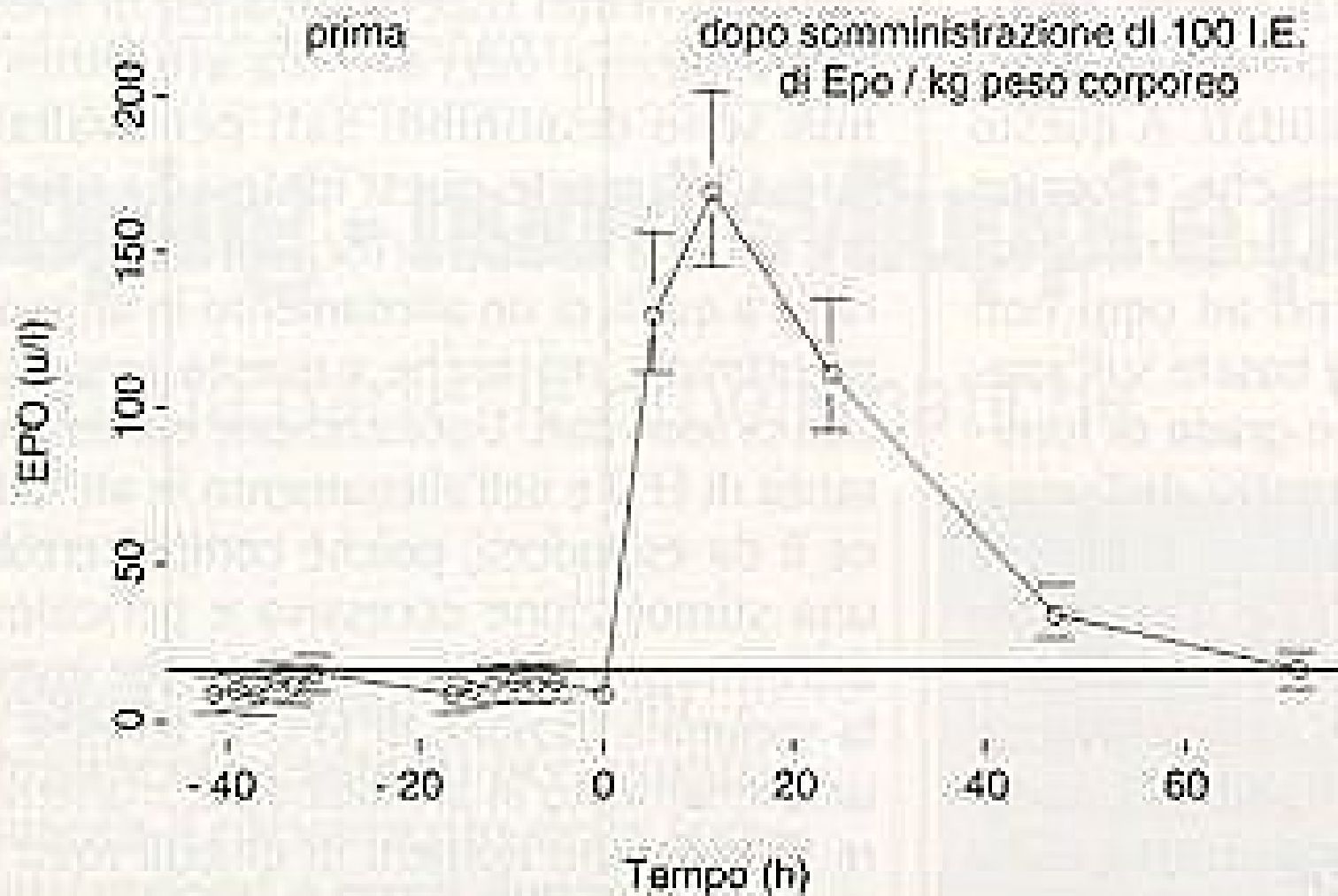
## *Eritropoietina ricombinante umana (epoietina, rHuEPO)*

- Presenta solo lievi differenze (a livello delle catene di carboidrati) rispetto all'EPO fisiologica, che tuttavia si riflettono sul comportamento chimico e fisico della molecola, ad esempio vi sono differenze nella carica elettrica
- Ai fini ergogenici la rHuEPO viene utilizzata con somministrazioni iniettabili ogni 2-3 gg, per 3-4 settimane, associata a preparati di Ferro. Infatti, in condizioni di stimolazione da eritropoietina, diventa necessario fare sintetizzare l'emoglobina negli atleti ad un ritmo molto più elevato che di norma e ciò necessita di un adeguato rifornimento di ferro per mantenere l'efficienza eritropoietica. Emivita e.v. 8,5 ore
- Raggiunta la fase di mantenimento l'assunzione può avvenire a dosi più basse, di più difficile individuazione ai controlli antidoping

## *Darbepoietina*

- Più stabile dell'EPO, con emivita più prolungata (e.v. 25,3 ore) e maggiore efficacia; è più facilmente identificabile per caratteristiche strutturali diverse dal prodotto umano endogeno e per la minore clearance





**Figura 1 - Concentrazioni dell'EPO: concentrazione dell'eritropoietina nel siero ematico di un soggetto di sesso femminile, dopo somministrazione sottocutanea di 100 I. E. di EPO per kg di peso corporeo (da Breidbanch, Schänzer 1998).**

28.04.2009

Olimpiadi

## Cera, sei atleti positivi a Pechino C'è anche Davide Rebellin

Il ciclista italiano sospeso da tutte le attività agonistiche. I risultati emergono dopo 948 nuovi controlli sui campioni provenienti dai Giochi Olimpici del 2008. Grazie a nuove tecnologie, scoperto il doping di seconda generazione. Tre casi anche nell'atletica (tra cui un oro) e due nel sollevamento pesi

**LOSANNA** - I nuovi test costano cari ad altri sei atleti che hanno preso parte ai recenti Giochi di Pechino. Tra questi c'è purtroppo anche Davide Rebellin, sospeso questa mattina da tutte le attività agonistiche (il 4 maggio sarà ascoltato dalla procura antidoping), che ai giochi aveva conquistato la medaglia d'argento nella prova su strada dietro lo spagnolo Samuel Sanchez. Un brutto colpo per lo sport italiano ed il ciclismo in particolare: Rebellin, 38 anni, era stato infatti nell'ultima settimana il protagonista assoluto, con la vittoria alla Freccia Vallone ed il terzo posto alla Liegi-Bastogne-Liegi. Oltre a Rebellin, tre casi nell'atletica (tra essi anche una medaglia d'oro) e due nel sollevamento pesi



# EPO di terza generazione:

Continuous erythropoietin receptor activator (CERA)



*Riccardo Riccò*



*Emanuele Sella*

La CERA è una nuovissima molecola, sviluppata per il trattamento dell'anemia, che attiva i recettori dell'EPO innescando l'eritropoiesi.

La sua emivita, decisamente superiore rispetto a quella dell'eritropoietina ma anche a quella della darbopoietina (circa 5-6 volte), consente di somministrarla 1-2 volte al mese.

E' utilizzata solo in ambito ospedaliero. Al mercato nero sembra che il costo di una singola siringa si aggiri intorno ai 1000 euro

	C.E.R.A. Dosage	
	0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Intravenous)	0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Subcutaneous)
$C_{\text{max}}$ (ng/ml)	9.05 $\pm$ 0.75	4.60 $\pm$ 0.58
$AUC_{\text{last}}$ (ng-h per ml)	1028 $\pm$ 272	1106 $\pm$ 266
Half-life (h)	134 $\pm$ 19	139 $\pm$ 20
$CL^b$ (ml/h per kg)	0.49 $\pm$ 0.06	0.90 $\pm$ 0.13
F (%)	100	52 <sup>c</sup>
$AUE_{1-21d}$ ( $\times 10^9$ -d per L)	1191 $\pm$ 117	1193 $\pm$ 91
$AC-E_{\text{max}}$ ( $\times 10^9$ /L)	36 $\pm$ 5	41 $\pm$ 5

*Iain C. Macdougall et al. Clin J Am Soc Nephrol*

# MIRCERA®

## 5. PROPRIETÀ FARMACOLOGICHE

### 5.1 Proprietà farmacodinamiche

Categoria farmacoterapeutica: altri preparati antianemici, codice ATC: B03XA03

Metossipolietylenglicole-epoetina beta, il principio attivo di MIRCERA, è un attivatore continuo del recettore dell'eritropoietina che mostra, rispetto all'eritropoietina, un'attività diversa a livello recettoriale, caratterizzata da un'associazione più lenta e una dissociazione più rapida dal recettore, un'attività specifica ridotta *in vitro* con un'aumentata attività *in vivo*, nonché un'emivita più lunga. La massa molecolare media è di circa 60 kDa, di cui la porzione proteica e la parte carboidratica corrispondono a circa 30 kDa.

MIRCERA stimola l'eritropoiesi mediante l'interazione con il recettore dell'eritropoietina sulle cellule progenitrici del midollo osseo.

# Usi terapeutici dell'eritropoietina

(epoetina; Eprex<sup>®</sup>, Globuren<sup>®</sup>, Neorecormon<sup>®</sup>;  
darbepoetina: Aranesp<sup>®</sup>, Nespo<sup>®</sup>, Mircera<sup>®</sup>, )

- Anemia in corso di insufficienza renale cronica
- Anemia da zidovudina (anti-HIV)
- Anemia "refrattaria"
- Anemia post-chemioterapia antitumorale
- Carenze patologiche di EPO
- Mieloma
- Sindromi mielodisplasiche

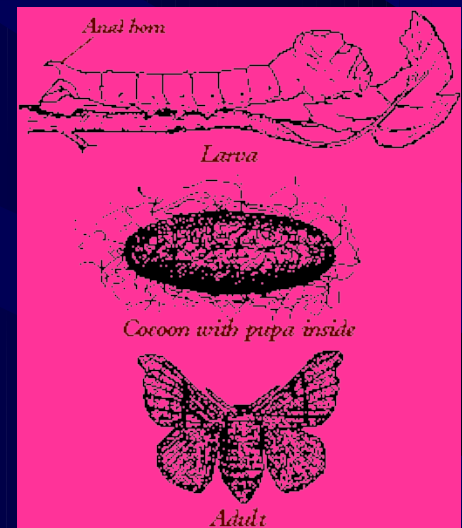
# La ricerca sull' eritropoietina in rapido e continuo sviluppo



## *Prodotti che mimano l'attività dell'EPO*

- Piccoli peptidi o composti non peptidici che possono legarsi, attivandoli, ai recettori dell'EPO (Science 1996; 273:458. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:12156)

- Recentemente, ad esempio, in esperimenti in vitro, è stato dimostrato che l'emolinfa del baco da seta inibisce l'apoptosi di cellule che producono EPO incrementando la produzione dell'EPO di 5 volte (Biotechnol Bioeng 2005; 91:793)





# La ricerca sull' eritropoiesi in rapido e continuo sviluppo



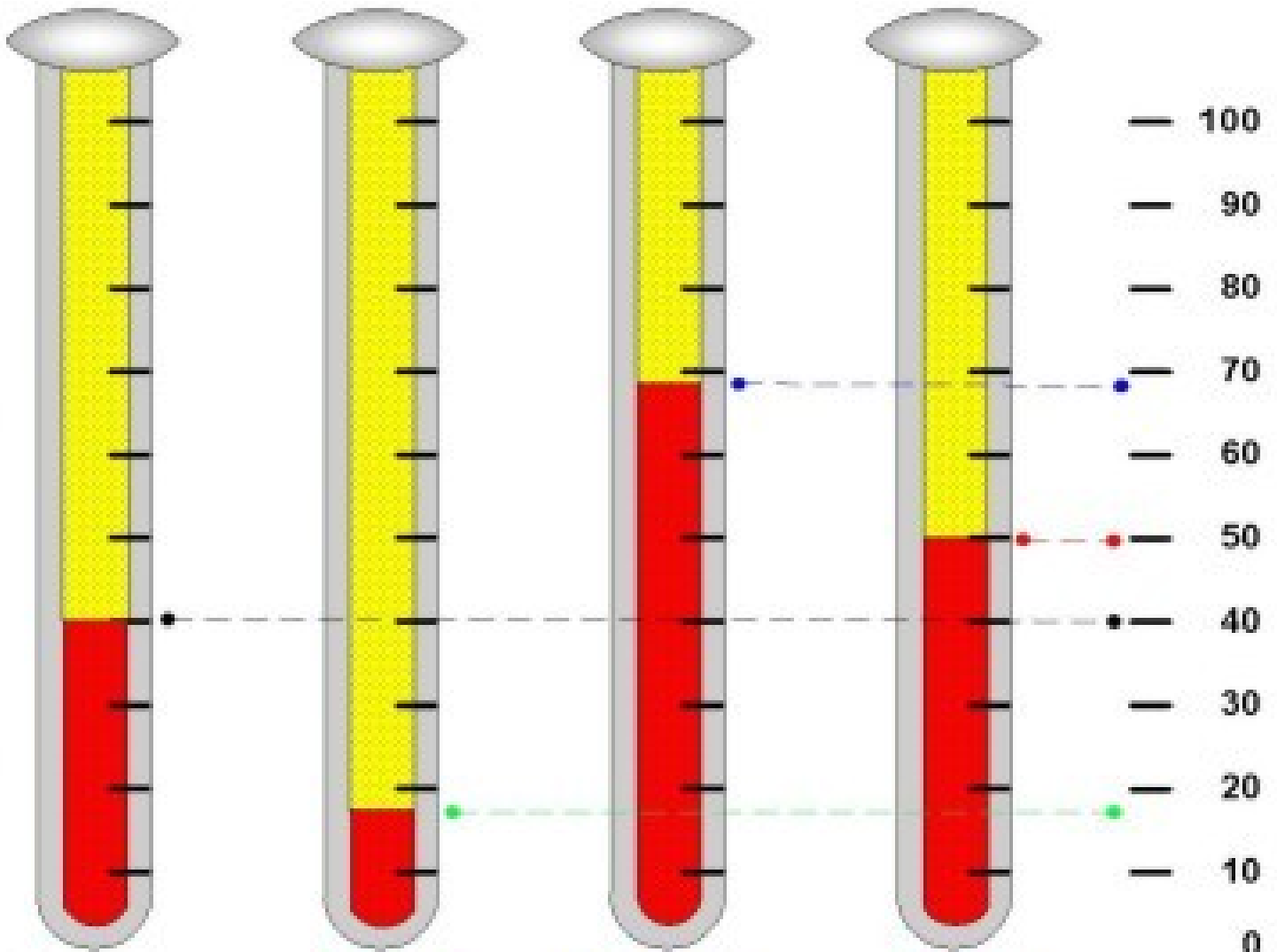
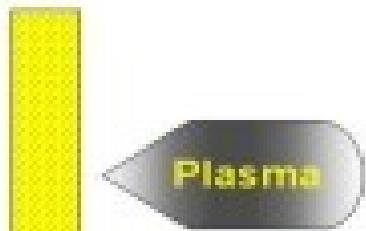
*In fase di sviluppo clinico, con in atto sperimentazioni di fase III sempre per il trattamento dell'anemia, è Hematide® un peptide sintetico non correlato all'eritropoietina che agisce come un recettore dell'EPO. Anche questo ha una lunga emivita e si può somministrare una volta al mese*

*Sotto sviluppo, con metodiche di bioingegneria, il fattore inducibile dall'ipossia stabilizzato FG-2216 che potrebbe essere il primo trattamento efficace orale per l'anemia (e purtroppo anche per il doping)*



# I problemi dei test per l'EPO

- **Misure indirette** per l'EPO
  - Misura della densità dei GR (ematocrito espresso in percentuale), dei livelli di emoglobina, conta dei reticolociti
  - Nel ciclismo misurazioni dell'ematocrito superiori al 50% portano alla sospensione. Valori superiori al 50% vengono ritenuti sospetti dal CIO
  - La Federazione Internazionale di Sci ha imposto un limite di emoglobina di 18,5 g/dL nell'uomo e di 16,5 g/dL nella donna, se riscontrati prima di una gara l'atleta non può partecipare per preservare la sua salute
  - Bisogna sottolineare che i valori di ematocrito ed emoglobina possono variare da atleta ad atleta e in risposta allo stesso esercizio. L'ideale è avere il profilo ematologico nel tempo di ciascun atleta



Normale

Anemia

Policitemia

Pletora

# I problemi dei test per l'EPO

- Le indagini per individuare l'uso di EPO si sono estese a diversi sport ed ovviamente alle Olimpiadi
  - Marco Pantani fu squalificato dal Giro d'Italia per un valore di ematocrito del 52 %
  - Nel 2003 il mezzofondista keniano Bernard Lagat (secondo miglior tempo di sempre nei 1500 m) è risultato positivo (ricerca di rHuEPO nelle urine) per assunzione di EPO prima dei Campionati del Mondo di atletica leggera di Parigi (a cui non ha potuto partecipare) le successive contro-analisi lo hanno però scagionato. Questo caso ha dimostrato la necessità di ricercare test più attendibili.



All rights reserved. ©IAAF

Negli ultimi anni è stato messo a punto (con buoni risultati) un nuovo metodo isoelettrico, diretto, per distinguere l'EPO esogena dall'endogena nei campioni di urine, sviluppato nel laboratorio francese di Chatenay-Malabry (Nature 2000; 405:635; Anal Biochem 2002; 311:119; Clin Chem 2003; 49:901). Si è riusciti ad individuare EPO esogena anche dopo 3 giorni dall'assunzione

# Reazioni avverse da eritropoietina esogena

- Ipertensione arteriosa (Incidenza 1-30%. Il meccanismo non è del tutto chiarito, l'EPO ha un'azione vasocostrittrice inoltre l'esposizione cronica provoca resistenza all'azione vasodilatatrice dell'ossido nitrico. Infine, l'EPO promuove la crescita delle cellule muscolari lisce dei vasi con rimodellamento vascolare e ipertrofia che può contribuire al mantenimento dell'ipertensione [Am J Kidney Dis 1999; 33:821-8])
- **Dolore osseo (non grave, transitorio, incidenza elevata = 40%)**
- Convulsioni (per rapido incremento viscosità del sangue e perdita vasodilatazione ipossica con conseguente aumento resistenze vascolari)
- **Cefalea**
- Fenomeni tromboembolici (EP, IMA, ictus), tutti legati all'iperviscosità ematica
- **Anemia post-trattamento per diminuita produzione EPO endogena**
- Aplasia pura della serie rossa (formazione anticorpi anti-EPO?)
- **Disordini mieloproliferativi (studi su animali, trattamenti a lungo termine?)**

# Danni da eritropoietina come doping

- I dati sulle reazioni avverse dell'eritropoietina elencate in precedenza derivano quasi esclusivamente dai trattamenti terapeutici su pazienti con patologie sottostanti
- **Non ci sono studi sul danno dell'eritropoietina usata come doping su atleti sani**
- Uno studio su atleti a cui fu data EPO per 6 settimane ha evidenziato un significativo incremento della pressione sistolica in risposta ad esercizio sub-massimale
- **Il numero di morti tra ciclisti belgi e olandesi tra il 1987 e il 1990 è stato messo in relazione all'uso di EPO** (*Gambrell e Lombardo. Drugs and doping: blood doping and recombinant human erythropoietin. In: Mellion, M.B. (ed.): Sports medicine secrets. Philadelphia: Hanley & Belfus, 1994, pp. 130-3*)
- Non è sbagliato pensare che le reazioni avverse evidenziate nei pazienti possano verificarsi anche negli atleti sani anche se con un'incidenza inferiore

# Correlazione emoglobina - potenza

<b>Hb</b>	<b>Htc</b>	<b>MCV</b>	<b>Watt</b>
12.8	38.4	93.7	416.0
13.0	39.0	93.7	422.5
14.0	42.0	93.7	455.0
15.0	45.0	93.7	487.5
16.2	48.6	93.7	526.5
17.0	51.1	93.7	552.5
17.8	53.5	93.7	578.5
18.2	54.7	93.7	591.5

(gentilmente fornita da E. Capodacqua, giornalista Repubblica)

# Simulazione teorica (ma non troppo)

Hb gr/dL	Tempo	Distacco	Km/h
12.8	1h	0.0.00	40.522
13.0	14'29" 1h	- 42"	40.742
14.0	13'38" 1h	- 1'55"	41.831
15.0	11'43" 1h	- 3'38"	42.857
16.2	10'00" 1h	- 5'31"	44.042
17.0	08'07" 1h	- 6'38"	44.776
17.8	07'00" 1h	- 7'43"	45.512
18.2	05'55" 1h	- 8'14"	45.872

05'24"

(gentilmente fornita da E. Capodacqua, giornalista Repubblica)



# L'EPO e gli sbalzi nel sangue : un esempio concreto nello sci di fondo

- Valori di Htc di un atleta di spicco dello sci di fondo, stagioni '93-'95

(Dati processo di Ferrara)

Data	Htc	Manifestazione
18/01/93	38,7	non trattato
27/10/93	43,5	
08/01/94	51,3	
28/02/94	54,2	Lillehammer
06/10/94	41,2	
20/02/95	52,8	Mondiali

(gentilmente fornita da E. Capodacqua, giornalista Repubblica)



# Nel ciclismo lo stesso su e giù

- Valori di Htc di un atleta di spicco del ciclismo durante le stagioni 1994 e 1995

(Dati processo di Ferrara)

Data	Htc	Manifestazione
16/03/94	40,7	inizio stagione
23/05/94	54,5	Tappa Loreto Giro
13/06/94	58,0	Fine Giro
18/03/95	45,0	inizio stagione
30/06/95	56,0	prima del Tour

(gentilmente fornita da E. Capodacqua, giornalista Repubblica)

# Il processo di Ferrara: l'altalena di Htc e Hb

	Hb			Htc		
	Min	Max	Diff %	Min	Max	Diff.%
M.Albarello	14,5	18,6	28,3	44,0	57,5	30,7
G.Bontempi	13,9	20,1	44,7	40,1	62,0	54,6
G.Bugno	15,2	17,6	15,8	44,7	51,8	15,9
C.Chiappucci	12,0	19,8	65,0	35,7	60,7	70,0
M.De Zolt	14,3	17,6	23,1	40,6	54,2	33,5
M.Pantani	13,7	18,6	35,8	40,7	57,4	41,0
M. Di Centa	13,0	18,0	38,5	41,2	55,5	34,7
M.Fondriest	13,7	18,0	31,4	40,8	53,9	32,1

(gentilmente fornita da E. Capodacqua, giornalista Repubblica)