

PRIMO STUDIO SULLE CONCENTRAZIONI SALIVARI DI CORTISOLO NEI PILOTI DI TRIAL (dati Preliminari)

Patrizia Di Cave ¹, Margherita Bertone ¹, Franco Sardella ¹,
Maurizio Besi ¹, Roberto Besi ²

(¹ Istituto di Scienza dello Sport del CONI - ² Federazione Motociclistica Italiana)



Per far fronte alle differenti situazioni della vita quotidiana c'è necessità di un intervento coordinato del sistema nervoso autonomo e di quello endocrino: il corretto equilibrio di questi due sistemi risulta essenziale per l'omeostasi e il benessere dell'individuo.

Forti sollecitazioni psicofisiche che possono modificare l'omeostasi individuale vengono definite "stress". Una particolare forma di stress è rappresentata dall'esercizio fisico.

L'esercizio è in grado di determinare una notevole quantità di modificazioni a carico di vari organi e apparati e l'entità delle variazioni così indotte è proporzionale all'intensità e alla durata dello esercizio effettuato. Tra queste risposte quella endocrina è una delle più rilevanti e il cortisolo, in particolare, è uno degli ormoni che più viene influenzato dallo stress.

Il cortisolo è un ormone steroideo, prodotto dalla zona fascicolata del cortico-surrene, che agisce pressoché su tutte le cellule dell'organismo facilitando l'acquisizione di metaboliti energetici da parte di queste.

Il cortisolo circolante è legato in massima parte (80-90%) alla proteina Corticosteroid Binding Globulin e solo l'esigua quota libera dell'ormone è attiva a livello cellulare, e in tale forma è presente nella saliva. La sua concentrazione nell'organismo varia durante le 24 ore seguendo un ritmo "circadiano", con valori più elevati nelle prime ore del mattino per poi decrescere fino ad arrivare ai valori più bassi intorno alle ore 22-24.

Sotto lo stimolo di perturbazioni esterne, l'ipotalamo libera il CRH (Corticotropin Releasing Hormone) ed endorfine. Il CRH stimola l'ipofisi, una ghiandola del cervello, a secernere ACTH (Adreno-Cortico-Tropine Hormone) che, a sua volta, stimola la secrezione del cortisolo da parte delle ghiandole surrenali.

La regolazione ipotalamica del cortisolo influenza in modo determinante la presenza dello steroide in circolo e ne fa un ormone stress-dipendente. In situazioni di ipoglicemia, traumi, malattie acute febbrili, interventi chirurgici, i valori di cortisolo sono particolarmente compromessi.

La letteratura scientifica è ricca di lavori che si sono occupati di valutare l'andamento degli ormoni in relazione alle differenti metodiche di allenamento

(8,9,10), mentre molto scarsa è quella relativa alle variazioni ormonali rilevate durante le competizioni. (4,6).

Attualmente è possibile determinare le concentrazioni di cortisolo anche su un campione di saliva (1,2,6), oltre che su quelli di sangue, risultando i due valori correlati tra loro (3), con il vantaggio di poter effettuare il prelievo da parte dello stesso atleta, di limitare le condizioni di stress e di permettere una più agevole conservazione dei campioni. Nel presente studio, utilizzando i campioni salivari, si è voluto:

- a) verificare il livello di stress nella gara
- b) verificare il livello di stress dei piloti di trial in due differenti condizioni (allenamento e competizione), al fine di valutare l'incidenza della componente psichica in queste due situazioni.



MATERIALE E METODO

Hanno preso parte allo studio 8 piloti di trial, appartenenti al Team Italia. Le caratteristiche di età, statura e peso sono presentate nella tab. 1.

Tab. 1

8 Atleti	Età (Anni)			
	MEDIA	15.6	171	63.7
	± DS	1.41	4	8.05

Le analisi del cortisolo salivare sono state effettuate in occasione dei Campionati italiani a Montecrestese (situazione di elevato stress) e durante un ritiro collegiale a Polcanto (situazione di stress contenuto).

Compatibilmente con le esigenze organizzative, abbiamo prelevato i campioni salivari in tre diversi momenti della giornata.

Durante i Campionati per ogni pilota sono stati effettuati tre prelievi: la mattina al risveglio (ore 7.30-8.30), subito dopo la gara (ore 15.00-17.00) e alla fine della giornata (ore 17.30-18.55).

In occasione del raduno collegiale i campioni salivari sono stati raccolti ad orari fissi: alle 16,00 e alle 18,00 del giorno di allenamento e alle 8,00 del mattino successivo.

Gli atleti, dopo aver dato l'assenso informato sullo scopo della ricerca, sono stati invitati a leggere attentamente e a seguire le istruzioni per la raccolta dei campioni di saliva:

- 📌 non mangiare, bere, fumare e masticare gomma per almeno 30 minuti prima della raccolta del campione

- ▲ non lavare i denti nell'ora precedente la raccolta per minimizzare il rischio di contaminazione ematica

La saliva è stata raccolta in provette Salivette (Sarsted, Germania) specifiche per la raccolta di detto campione biologico tramite un tampone di cotone sterile.

Il tampone veniva imbibito di saliva tenendolo nel cavo orale per circa 60 secondi, come raccomandato dalla ditta, e poi rimesso al suo posto nelle provette Salivette. Successivamente le Salivette erano centrifugate a 2000 giri e a temperatura di 16°C per 13 minuti, per separare la saliva dal tampone di cotone.

La saliva così trattata era conservata a -70°C. Prima dell'analisi i campioni erano riportati a temperatura ambiente.

La concentrazione del cortisolo salivare è stata misurata mediante il metodo immunoenzimatico Competitivo ELISA (Enzyme Linked Immunoassorbent Assay), fornito dalla ditta DRG Diagnostics. I campioni così trattati sono stati analizzati con lettore Eti- System Fast Reader S800 della Sorin Biomedica.

Al fine di raccogliere il maggior numero possibile di informazioni per una corretta interpretazione dei risultati, i piloti sono stati invitati a riempire due questionari:

1. Generale: dati antropometrici (età, peso, statura), notizie sulle modalità di allenamento (frequenza delle sedute, ultimo allenamento, percezione della sensazione di fatica durante le sedute), notizie su alcune abitudini di vita (fumo, qualità e durata del sonno notturno, eventuale assunzione di farmaci).
2. Notizie specifiche sull'andamento della gara: posizione in classifica, eventuali incidenti, sensazioni di disagio causate da fattori esterni, eventuali indisposizioni fisiche.

RISULTATI E ANALISI DEI RISULTATI

Degli otto elementi che hanno preso parte all'esperimento c'è da segnalare che solo 5 erano presenti sia al collegiale di Polcanto che ai campionati di Montecrestese, pertanto quando si confrontano i valori medi relativi alla gara rispetto a quelli ottenuti durante il collegiale ci si riferisce ai soli 5 atleti che hanno partecipato a tutte e due i controlli.

In tab. 2 sono riportati i valori del cortisolo salivare ottenuti nelle due occasioni di raccolta: Montecrestese e Polcanto.

Tab. 2

Montecrestese				Polcanto			
Atleta	Cortisolo (ng/mL)	Cortisolo (ng/mL)	Cortisolo (ng/mL)	Atleta	Cortisolo (ng/mL)	Cortisolo (ng/mL)	Cortisolo (ng/mL)
1	9.9	10.8	6.5	1			
2	9.0	14.3	5.0	2	15.1	3.5	2.8
3	11.9	4.6	4.1	3			
4	10.4	12.4	5.7	4			
5	14.0	7.7	6.5	5	8.7	3.6	2.0
6	20.7	23.2	7.2	6	17.0	12.2	3.1
7	13.0	9.4	5.4	7	6.8	2.6	2.0
8	9.9	4.8	4.9	8	11.6	2.2	2.2

mattina

dopo gara

sera

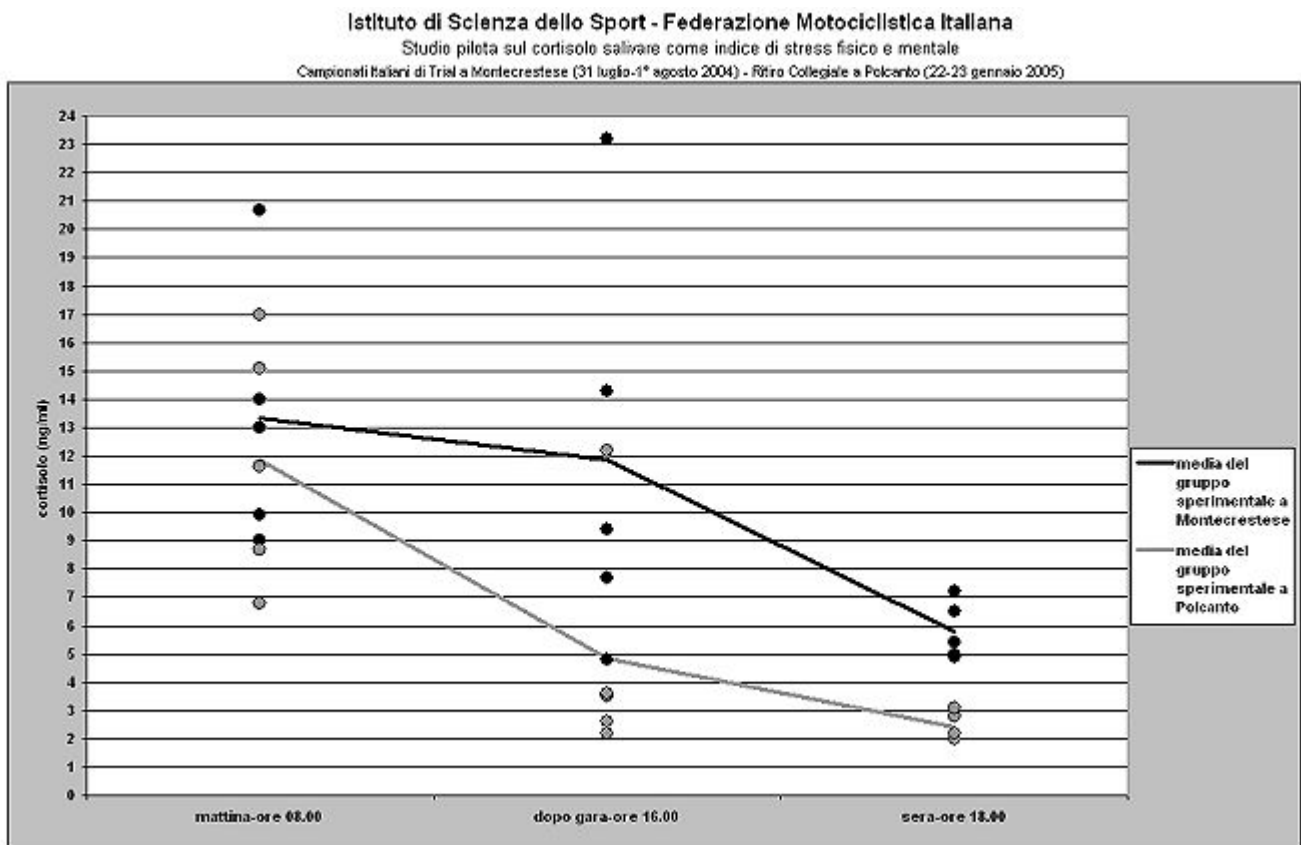
mattina

dopo gara

sera

In fig. 1 sono rappresentati in forma grafica i valori di cortisolo salivare relativi alle due occasioni di studio.

Fig. 1 - Valori di cortisolo ottenuti nelle due occasioni di controllo (Montecrestese e Polcanto)



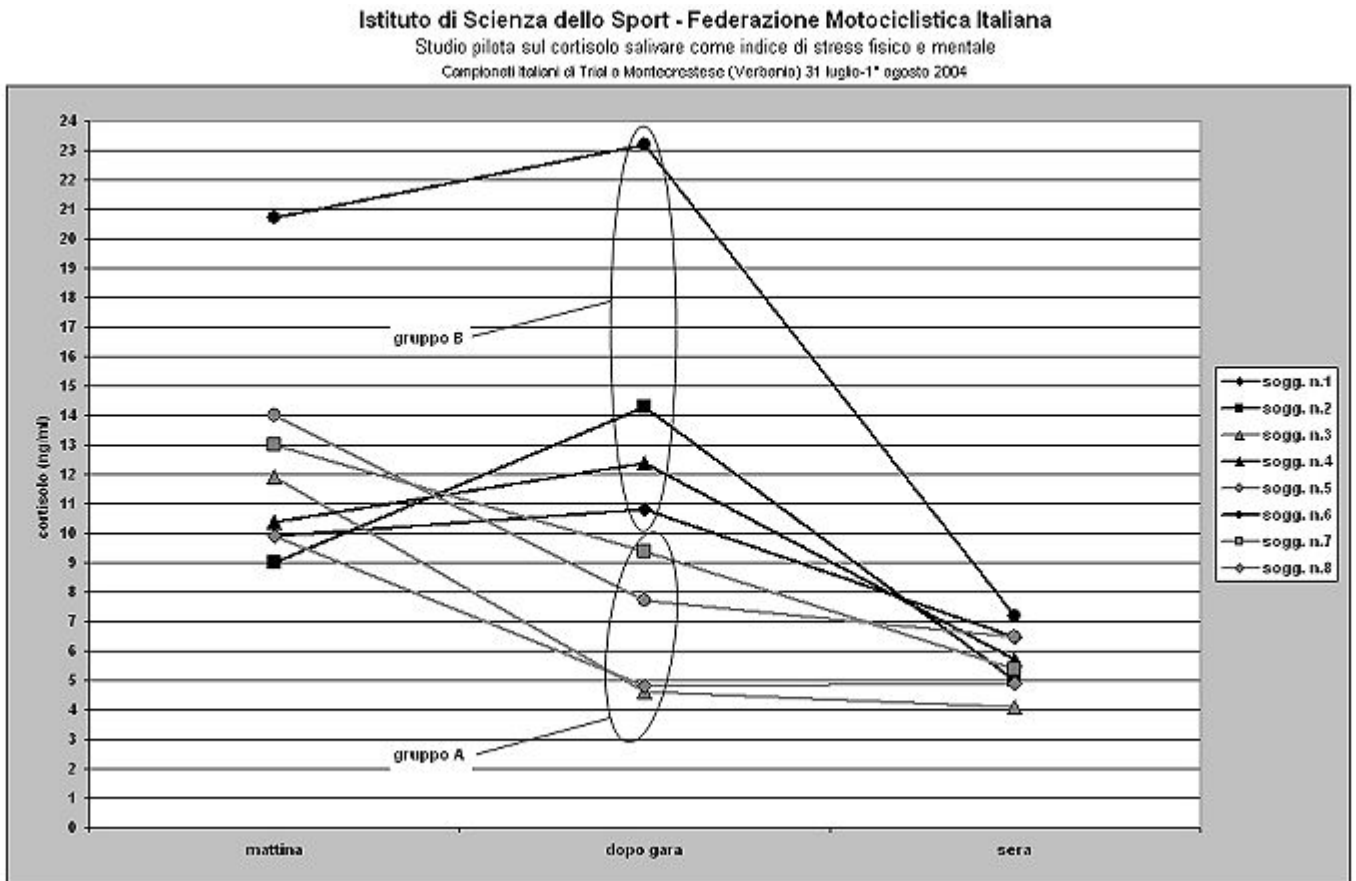
Da quanto mostrato nella figura si possono evidenziare i seguenti aspetti di analisi statistica:

- 📌 Le medie dei valori del cortisolo salivare prelevato al gruppo sperimentale nel ritiro collegiale a Polcanto (situazione con stress molto contenuto) presentano un andamento che rispecchia il ciclo circadiano dell'ormone in situazione di relativo riposo: ad un elevato valore al mattino fa seguito una forte diminuzione nel primo pomeriggio, seguita a sua volta da un ulteriore abbassamento, più contenuto, durante la sera.
- 📌 Le medie dei valori del cortisolo salivare prelevato durante i Campionati Italiani di Trial a Montecrestese (situazione di elevato stress) mostrano un andamento in linea con le aspettative dell'esperimento:
 - 1- la media relativa al mattino è di poco superiore a quella di Polcanto (differenza statisticamente non significativa, Wilcoxon Test, p-level 0.50)
 - 2- la media dei valori del dopo gara presenta una diminuzione rispetto al prelievo mattutino molto contenuta se raffrontata con quella misurata durante il Collegiale (e la differenza fra i due valori pomeridiani risulta statisticamente significativa, Wilcoxon Test, p-level 0.04), indice del forte stress causato dalla competizione
 - 3- la media dei prelievi serali, nel giorno dei Campionati, tende anch'essa verso il

minimo come per Polcanto, pur mantenendo dei valori statisticamente più alti rispetto a quelli del Ritiro Collegiale (Wilcoxon Test, p-level 0.04).

I valori salivari ottenuti in occasione dei campionati di Montecrestese sono riportati in fig. 2.

Fig. 2 - Valori dei campioni salivari ottenuti in occasione dei Campionati Italiani di Montecrestese



Nei valori del cortisolo salivare degli 8 soggetti esaminati a Montecrestese si evidenziano due gruppi:

- gruppo A, con andamento dei valori simile a quello posseduto dalle medie del campione (valore massimo la mattina, poi diminuzione progressiva verso il minimo serale)

- gruppo B, caratterizzato da un aumento del cortisolo nel dopo-gara rispetto alla mattina, con raggiungimento comunque del minimo nel prelievo serale.

In particolare si possono notare:

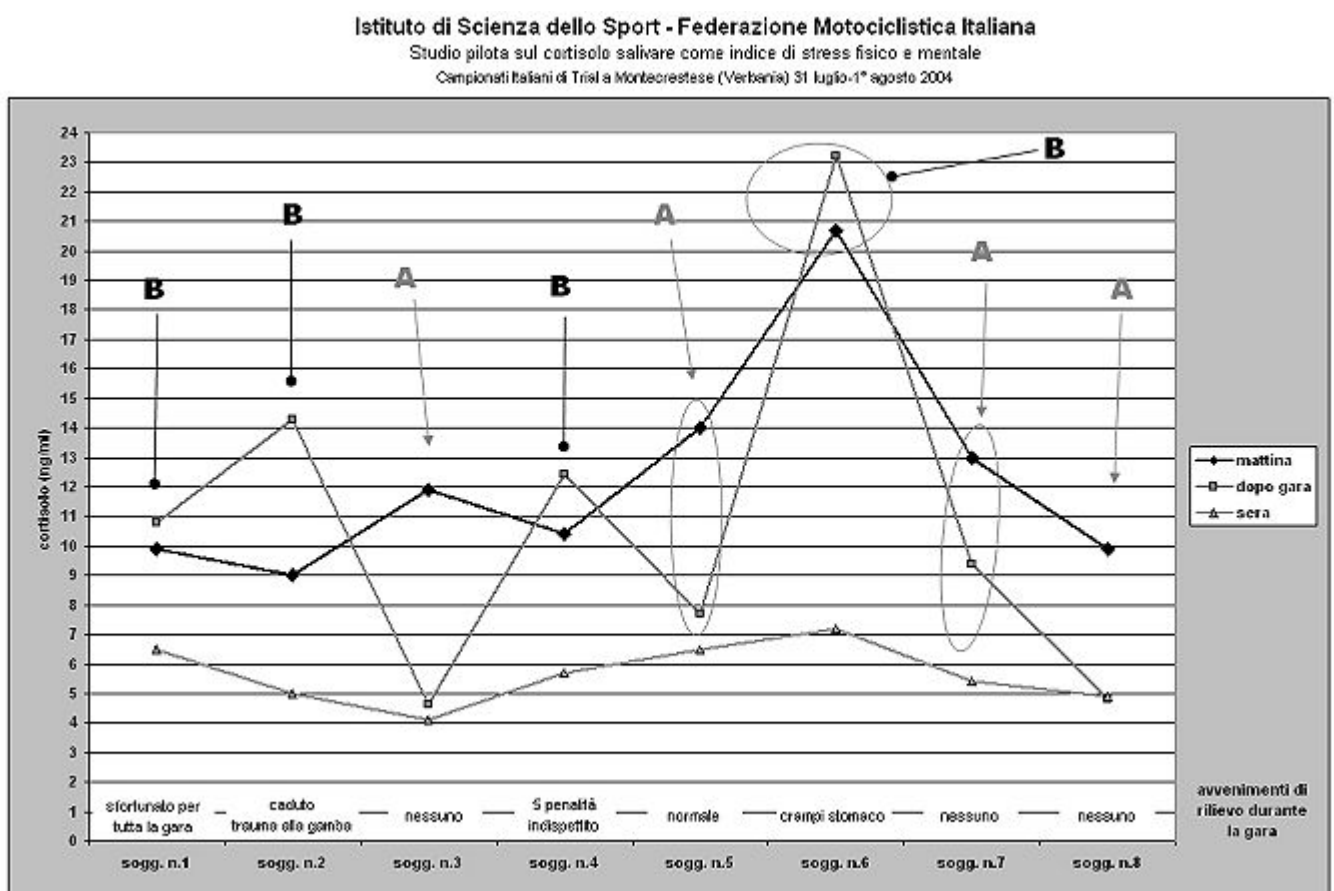
- 🚩 livelli di ormone altamente superiori al resto del gruppo nel pilota n. 6 sia nel prelievo mattutino che in quello successivo alla competizione,
- 🚩 i valori di cortisolo salivare risultano più simili tra i soggetti nel prelievo serale ($ds=1.02$), si diversificano maggiormente in quello del mattino ($ds=3.78$), raggiungono la massima variabilità nel prelievo del dopo-gara ($ds=6.03$), a indicare una maggiore specificità dei soggetti nella loro reazione allo stress competitivo. La tendenza permane anche non considerando i valori del soggetto n. 6, che si distaccano in modo

evidente dalle misure del gruppo (ds senza n. 6: sera=0.88
mattina=1.84 dopo gara=3.69).

Anche se per motivi organizzativi a Montecrestese i prelievi serali sono stati effettuati, per ogni soggetto, a un intervallo di tempo diverso dal prelievo del dopo-gara (da 50 minuti a 2 ore e 50 min), da un punto di vista statistico non è stata rilevata alcuna correlazione significativa fra questi tempi e l'entità della diminuzione del cortisolo tra il dopo gara e la sera.

Nella fig. 3 vengono messi in rapporto i valori di cortisolo salivare con gli avvenimenti vissuti dai soggetti durante la gara di Montecrestese, avvenimenti da loro evidenziati nel questionario somministrato.

Fig. 3 - Valori di cortisolo e avvenimenti di rilievo durante la competizione



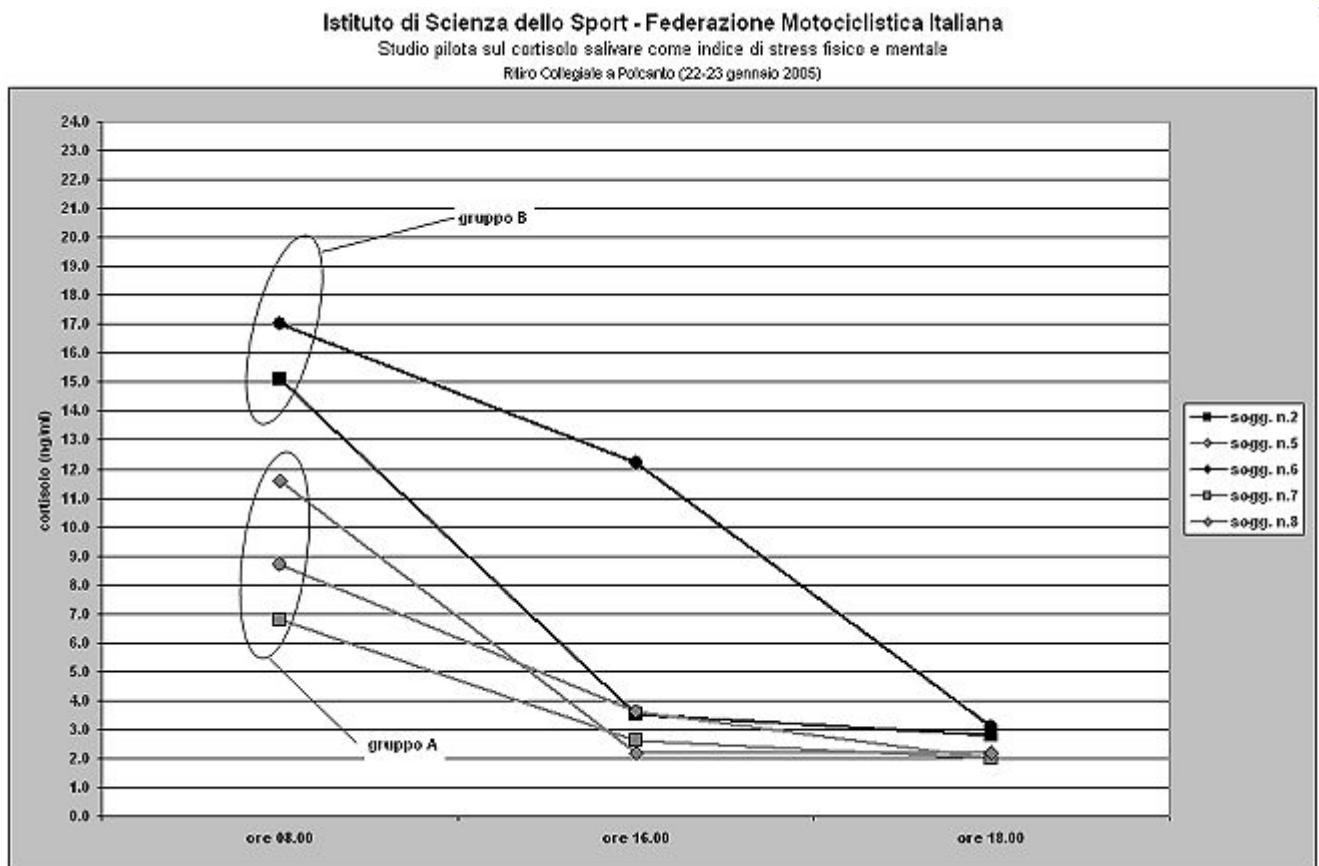
Nella fig. 3 si può notare come i piloti che fanno parte del gruppo B (aumento del cortisolo nel dopo-gara rispetto alla mattina) siano anche quelli che hanno risposto nel questionario di aver vissuto un avvenimento di rilievo durante la competizione (caduta con trauma, crampi allo stomaco, sentimento di rabbia per le penalità, serie di episodi sfortunati durante il percorso), mentre i soggetti del gruppo A (diminuzione del cortisolo nel dopo-gara rispetto alla mattina) hanno risposto di non aver registrato alcun avvenimento anomalo o particolare.

Nel dettaglio, tre soggetti vengono evidenziati sul grafico con delle ellissi: il pilota n. 6 (facente parte del gruppo B) che presenta valori di cortisolo salivare molto elevati rispetto a quelli del campione, sia alla mattina che nel dopo-gara, mentre il valore serale non presenta un'alterazione così pronunciata; i piloti n.

5 e n. 7 (appartenenti al gruppo A) sono invece evidenziati perché presentano valori elevati rispetto alla mediana del campione per quanto riguarda i prelievi del mattino. Nel dopo gara i valori si abbassano, pur rimanendo il gap con gli altri due soggetti del gruppo A.

In fig. 4 sono riportati i valori relativi al collegiale di Polcanto (basso stress) dove erano presenti solo 5 degli 8 piloti partecipanti all'esperienza di Montecrestese.

Fig. 4 - Valori di cortisolo relativi ai 5 piloti che hanno partecipato al collegiale di Polcanto



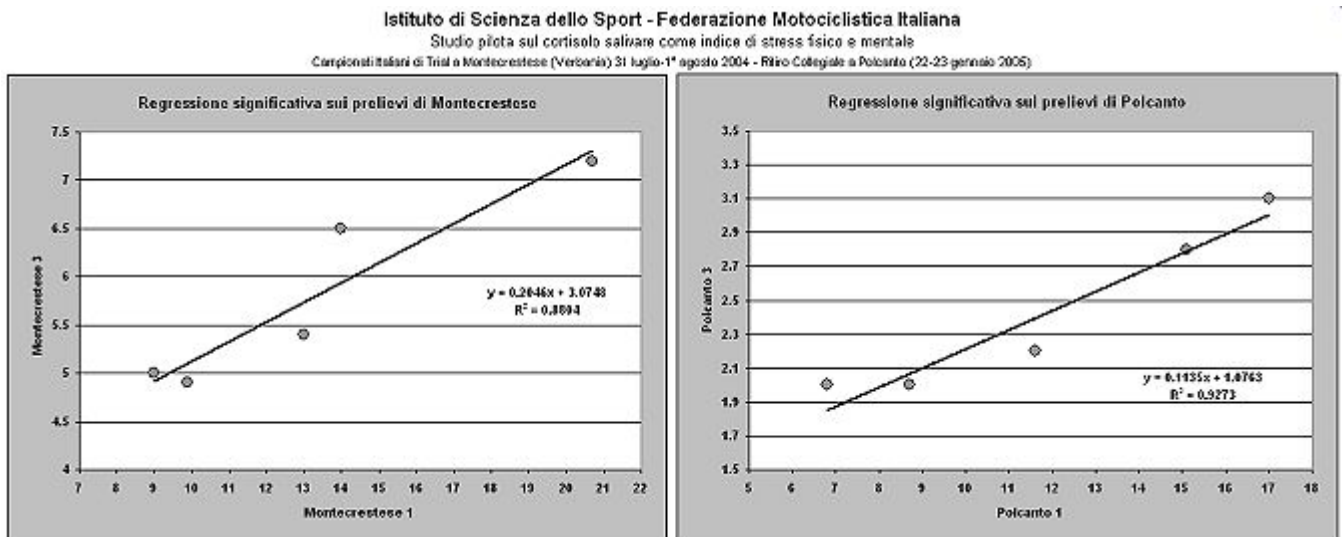
L'analisi dei dati raccolti nel collegiale di Polcanto porta a queste considerazioni:

- 📌 senza un evento stressante come i Campionati Italiani, per tutti i soggetti i valori dell'ormone, durante la giornata di Polcanto, si attestano sui livelli più alti alle ore 08.00 del mattino, subiscono una forte diminuzione verso le ore 16.00, hanno un ulteriore piccolo abbassamento o rimangono costanti alle ore 18.00. Solo nel pilota n. 6 la diminuzione pomeridiana, pur presente, appare meno marcata, anche se il valore si riporta vicino ai livelli del gruppo in corrispondenza del controllo serale
- 📌 sia per il prelievo effettuato alle 08.00 che per quello delle 18.00, i 2 soggetti rimasti del gruppo B (aumento a Montecrestese del cortisolo nel dopo gara rispetto alla mattina) presentano valori più alti di ormone rispetto ai 3 soggetti rimanenti del gruppo A (diminuzione a Montecrestese del cortisolo nel dopo gara rispetto alla mattina)

- 🚩 il soggetto n. 6 mostra in questa prova di controllo a Polcanto, come a Montecrestese, i valori più alti del campione. Il gap è particolarmente evidenziato nel prelievo pomeridiano.

Per i prelievi di Polcanto, quindi senza un forte stress competitivo, il valore del cortisolo salivare risulta più simile tra i soggetti nel prelievo serale (ds=0.5), mentre si diversifica maggiormente in quello del mattino (ds=4.26) ed in quello del pomeriggio (ds=4.17); quest'ultimo dato è però pesantemente influenzato dal valore particolarmente elevato rilevato in un soggetto. Calcolando di nuovo la deviazione standard senza questo pilota si ottengono valori (mattina: 3.62, pomeriggio: 0.68, sera: 0.39) che indicano una sostanziale similitudine fra i soggetti per i prelievi delle 16.00 e delle 18.00, mentre la maggiore variabilità e quindi specificità di comportamento, si ottiene alle 08.00.

Fig. 5 - Applicazione del test di Spearman sui valori di cortisolo salivare



Pur con le dovute cautele giustificate dall'esigua numerosità del campione (n=5), il test di Spearman (fig. 5) ha evidenziato due correlazioni statisticamente significative:

Polcanto mattina <--> Polcanto sera

Montecrestese mattina <--> Montecrestese sera

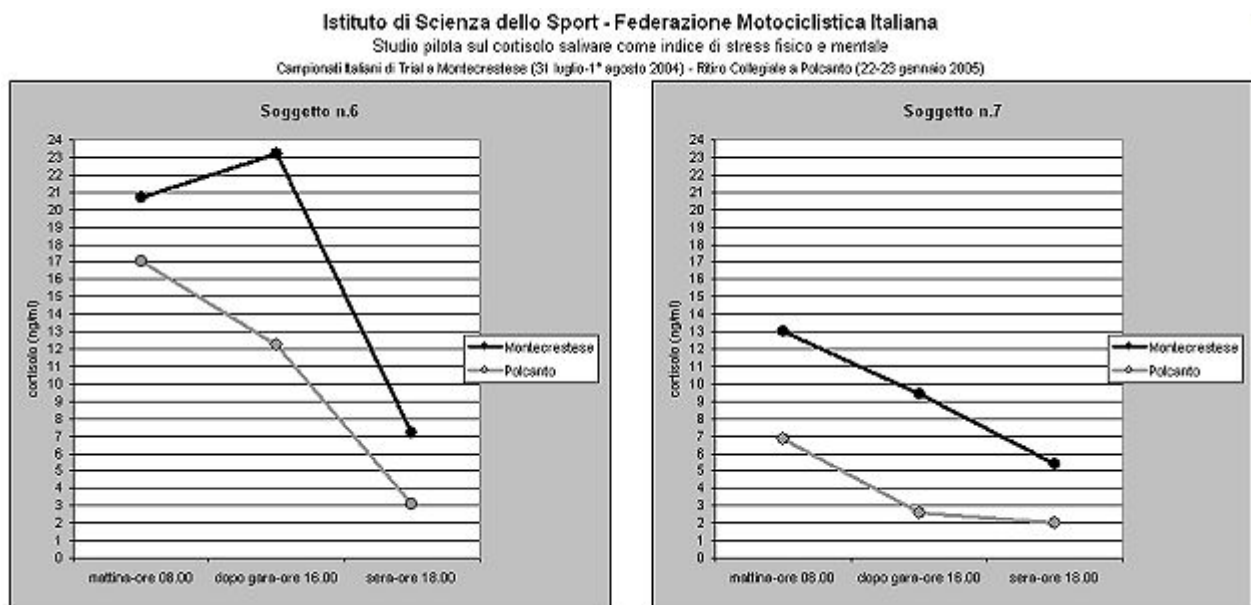
Sembra dunque che la presenza o meno di un forte evento stressante non spezzi il legame rilevato tra i livelli di cortisolo salivare posseduti nelle prime ore della giornata e quelli raggiunti in serata.

I valori pomeridiani sembrano invece fare storia a sé, probabilmente influenzati più direttamente dagli eventi vissuti.

Comunque nessuna altra correlazione, anche incrociata, fra i prelievi relativi ai Campionati Italiani e quelli del Ritiro Collegiale è risultata significativamente degna di nota, a parte quella fra i valori di Polcanto pomeriggio e Montecrestese sera, difficilmente interpretabile e molto probabilmente casuale.

Esaminando i grafici dei soggetti singolarmente (figg. 6, 7, 8), si può notare come in tutti i piloti si rilevino valori più alti di ormone a Montecrestese, sia per quanto riguarda i prelievi del pomeriggio, sia per quelli serali. L'effetto stressante dei Campionati Italiani si evidenzia quindi in ogni soggetto.

Fig. 6



Per quanto riguarda il prelievo del mattino, tre soggetti su cinque mostrano come la mattina pre gara abbia prodotto valori ormonali più alti. In relazione invece ai due piloti che presentano valori mattutini maggiori nei prelievi effettuati a Polcanto (uno del gruppo A e uno del gruppo B), dai dati in nostro possesso non è possibile capire se ciò sia dovuto a qualche evento accaduto nelle prime ore del Raduno Collegiale, a un particolare ciclo ormonale dei due piloti in questione, o infine alla capacità dei due soggetti di controllare efficacemente l'ansia prima della gara.

Fig. 7

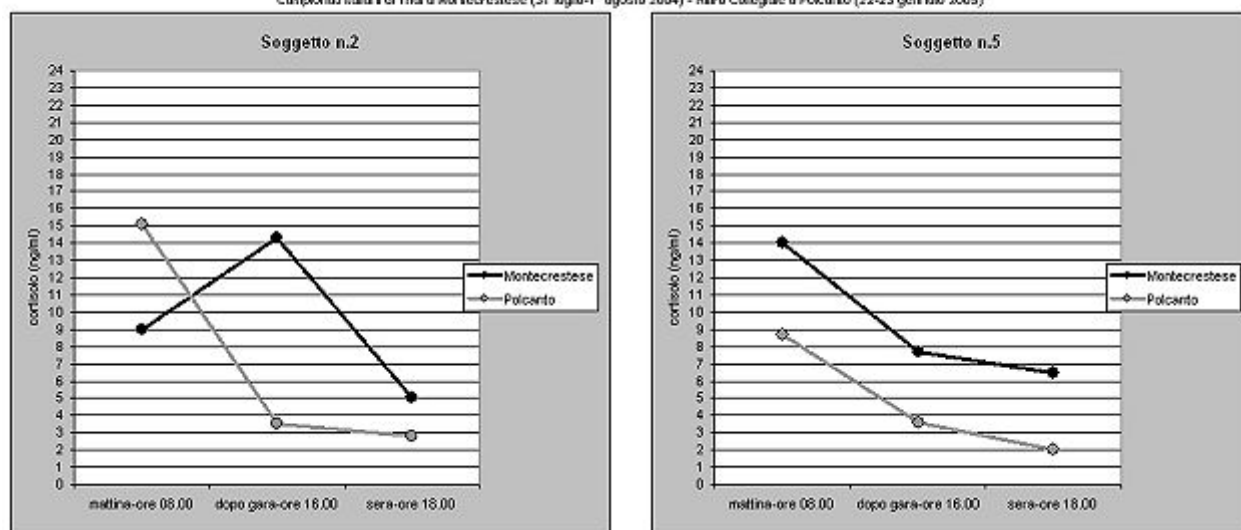
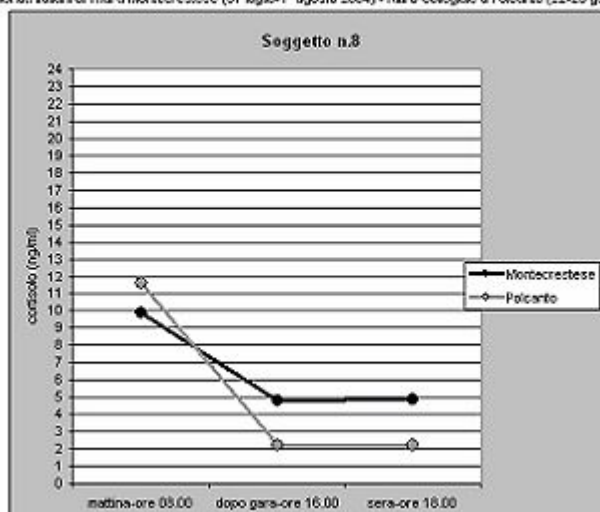


Fig. 8



CONCLUSIONI

La particolare popolazione atletica presa in esame (soggetti giovani, 15-16 anni, ancora in fase adolescenziale, quindi ancora con equilibri neuroendocrini in fase evolutiva, condizionati da un'attività dove le abilità neuromotorie temporo-spaziali e di equilibrio sono esasperate al massimo) ci fa ipotizzare che questi atleti possano avere livelli di cortisolo situati oltre i valori che si considerano normali per una "popolazione standard".

Attualmente i valori considerati normali sono inclusi tra 4 e 10 ng/mL per i valori del cortisolo mattutino e tra 0.7 e 1.5 ng/mL per quelli del prelievo serale. I valori medi relativi al nostro campione sono 12.4 ± 3.8 ng/mL per la mattina di gara, 11.8 ± 4.3 per la mattina di allenamento e rispettivamente 5.7 ± 1 e 2.4 ± 0.5 ng/mL per la sera.

I valori ottenuti in questo lavoro sono quindi decisamente superiori a quelli considerati standard.

I risultati di questo studio, pur confermando quanto già espresso in letteratura a proposito dell'effetto "stressante" della gara, evidenziano l'importanza della componente psichica quale elemento che si somma in modo determinante alle "peculiarità condizioni ambientali", modulando ed aggravando ulteriormente il livello di stress raggiunto dai soggetti durante la competizione e il relativo allenamento ad essa finalizzato.

Inoltre, pur con la cautela dovuta all'esiguo numero dei soggetti, questo lavoro mostra come l'analisi del cortisolo salivare possa essere opportunamente utilizzata quale indice pratico e sufficientemente sensibile per individuare i diversi livelli di stress dei soggetti, focalizzando l'attenzione sui valori dei campioni di saliva raccolti la sera e la mattina piuttosto che su quelli del dopo gara, troppo influenzati dal picco di stress della competizione. Per esaminare quest'ultimo aspetto sarà necessario incrementare la numerosità del campione, con lo scopo di definire con sicurezza i tempi di prelievo più significativi nell'arco della giornata, per testare la validità del raffronto tra valori serali e valori mattutini nella diagnosi di "eccesso di stress", per individuare più adeguati e precisi valori di riferimento.

BIBLIOGRAFIA

1. E. Aardal e A. Holm "**Cortisol in saliva**". Eur J Clin Biochem 1995; 33; 927-932
2. C. Kirschbaum e D. Hellhammer. "**Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications**". Psychoneuroendocrinology, Vol. 19; 313-333, 1994
3. Z. Obminski e R. Stupnicki. "**Comparison of the testosterone to cortisol ratio values obtained from assays in saliva and serum**". J Sports Med Phys Fitness 1997; 37: 50-5
4. P. Passelergue, G. Lac. "**Saliva cortisol, testosterone and T/C ratio variations during a wrestling competition and during the post-competitive recovery period**". Int J Sports Med. 1999; 20:109-113
5. H. Adlercreutz, M. Harknem. "**Physical activity and hormones**". Adv Cardiol 1976; 18: 144-157
6. E. Filaire, X. Bernain, G. Lac. "**Preliminary results on mood state, salivary testosterone: cortisol ratio and team performance in a professional soccer team**". Eur J Appl Phys Germany 2001; 86 (2)
7. H. Raff, P. J. Homar and D. P. Skoner. "**New Immunassay for Salivary Cortisol**". Clinical Chemistry 2003, 49, 203-204
8. S.E. Mulligan, S.J. Fleck, S.E. Gordon, L.P. Koziris, H.T. Triplett-Mc Bride and W.J. Kramer (1996). "**Influence of resistance exercise volume on serum growth hormone and cortisol concentrations in women**". Journal of Strength and Conditioning Research 10, 256-262
9. I. Smilios, T. Piliandis, M. Karamouzis and S.P. Tokmakidis (2003). "**Hormonal responses after various resistance exercise protocols**". Medicine and Science in Sport and Exercise 35, 644-654
10. G. Lac. and P. Berthon (2000). "**Changes in cortisol and testosterone levels and T/C ratio during an endurance competition and recovery**". Journal of Sport Medicine and Physical Fitness 40, 139-144