

INTEGRATORI ALIMENTARI A BASE DI *CORDYCEPS SINENSIS* e *GANODERMA LUCIDUM*: EFFETTI SUL RAPPORTO TESTOSTERONE/CORTISOLO IN UN GRUPPO DI SPORTIVI

Paola Rossi^a, Elisa Altobelli^b, Daniela Buonocore^a, Fulvio Marzatico^a, Elena Savino^b

^aUniversità di Pavia, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani", paola.rossi@unipv.it

^bUniversità di Pavia, Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente, elena.savino@unipv.it



INTRODUZIONE Vengono descritti gli effetti sui livelli di testosterone e cortisolo salivare dopo l'assunzione, per 4 mesi, di due integratori alimentari a base fungina da parte di un gruppo di ciclisti impegnati in gare di Gran Fondo. Tali integratori comprendono degli estratti idroalcolici, l'uno di *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., più noto con il termine giapponese "Reishi" e definito anche "fungo dell'immortalità" per la sua azione polivalente sull'organismo umano; l'altro di *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc., dal 2007 rinominata *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, un ascomicete che cresce solo sulle alte montagne dell'Himalaya e con effetti tonificanti. Queste due specie, insieme a *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr. e *Poria cocos* F.A. Wolf, sono menzionate in uno dei trattati fondamentali della medicina tradizionale cinese ("Shen Nung Pen ts'ao ching") dove le piante medicinali vengono suddivise in tre classi, di cui la prima, considerata la superiore, comprende le erbe ad azione tonificante sull'organismo, note come le "erbe dell'imperatore". L'utilizzo sinergico dei due integratori in atleti adulti trova la sua giustificazione nel fatto che i due funghi presentano un'attività complementare: *Cordyceps sinensis* è tipicamente il fungo degli sportivi con un notevole effetto stimolante, mentre *Ganoderma lucidum* ha un'azione protettiva sull'attività cardiovascolare (Cazzavilla, 2011). Il testosterone è un ormone steroideo appartenente al gruppo degli androgeni classificabile come un ormone virilizzante e con effetti anabolici. Gli effetti anabolici includono l'aumento di massa e forza muscolare, aumento della densità ossea, stimolazione dello sviluppo osseo. Il cortisolo è un ormone steroideo appartenente alla famiglia dei glucocorticoidi. Il cortisolo è secreto dalla corteccia surrenalica attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi-corteccia surrenalica (asse HPA) e aumenta in risposta a stressori, tra i quali anche l'esercizio fisico intenso. Il cortisolo è considerato il principale ormone ad effetto catabolico; riduce, infatti, la sintesi proteica, aumenta la degradazione proteica e inibisce la risposta immunitaria. Il rapporto testosterone/cortisolo è ritenuto un indice dell'attività anabolica dell'organismo: una sua diminuzione indica una tendenza al catabolismo, mentre un aumento esprime una tendenza verso l'anabolismo. Una certa diminuzione del rapporto T/C nelle fasi di incremento dei carichi di lavoro è indice di un allenamento adeguato ed efficace. Tuttavia, una diminuzione del T/C superiore al 30% rispetto ai valori iniziali è considerata un indice di rischio di *overtraining* ovvero sovrallenamento dell'atleta [Meeusen et al., 2004]. Il termine *overtraining* definisce una situazione di squilibrio tra gli stress derivanti dai carichi di lavoro sostenuti in allenamento o in competizione e la capacità di recupero dell'atleta. E' possibile ritenere che un atleta incapace di recupero completo entro le 72 ore dall'impegno fisico massimale sia affetto da sindrome da *overtraining* (Kentta e Hassmen, 1998). L'*overtraining* è un fenomeno che colpisce oltre il 65% degli atleti all'apice della loro carriera professionale (Sassi, 1998; McKenzie, 1999).

METODI
Tutte le sostanze chimiche, solventi e i kit per i saggi Elisa usati in questo studio sono forniti dalla ditta DiaMetra, 20090 Segrate - Milano Italy.
Soggetti
Tutte le procedure utilizzate nello studio sono state approvate dal Comitato etico dell'Università di Pavia. Ciascun soggetto reclutato per lo studio è stato pienamente informato in relazione alle linee guida della WMA Declaration of Helsinki (18th WMA General Assembly, Helsinki, 1964).

Il soggetto sono 6 ciclisti di sesso maschile (di età compresa tra i 35 e i 40 anni), appartenenti a società di ciclisti non professionisti. Gli atleti sono stati seguiti e monitorati durante la stagione delle Gran Fondo del 2011. I campioni di saliva sono stati raccolti in 4 periodi differenti: febbraio 2011 (gara 1 di Laigueglia, sotto placebo); marzo 2011 (gara 2 di Franciacorta, dopo 1 mese di integrazione fungina); giugno 2011 (gara 3 di Aprica dopo 3 mesi di integrazione fungina); luglio 2011 (allenamento lungo, sotto placebo).

Gara di Gran fondo, percorso 160-200 km, durata dalle 4 alle 6 ore
V_{media} = 36 Km/h, il percorso è reso particolarmente duro dalle pendenze e dalle caratteristiche tecniche

POSOLOGIA: (3 cps *C. sinensis* + 2 cps *G. lucidum*)/die
Cordyceps sinensis
Ingredienti per cps: 445 mg estratto intero standardizzato da corpo fruttifero in polvere privo di maltodestrine;
Informazioni nutrizionali: valore energetico per cps 0,12 Kcal; 33,2% polisaccaridi di cui 7,8% β-glucani; 25,3% proteine; 18,3% mannitolo; 3,6% grassi; 0,45% adenosina.

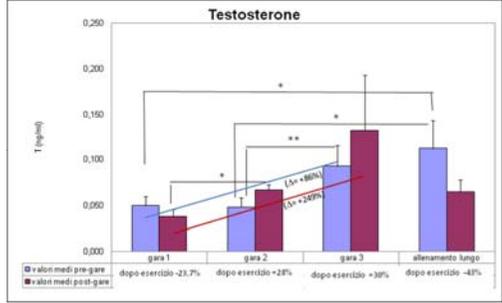
Ganoderma lucidum
Ingredienti per cps: 390 mg estratto puro vegetale; 3,9 mg diossido di silicio; 0,5 mg capsula vegetale HPMC
Informazioni nutrizionali: valore energetico per cps 0,12 Kcal; 33% polisaccaridi di cui 24,6% β-glucani; 23% proteine; 2,1% grassi; 1,5% triterpeni.

Raccolta e trattamento dei campioni di saliva
I campioni di saliva sono stati raccolti immediatamente prima e subito dopo l'arrivo dalla competizione. I soggetti erano stati istruiti a depositare la saliva in un collettore (salivette, "DiaMetra Italy"). La saliva veniva congelata a -20°C e mantenuta a questa temperatura fino all'arrivo in laboratorio. I campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 655 x g, per eliminare ogni residuo di cibo o possibili contaminanti. Il surnatante recuperato è stato successivamente analizzato come riportato di seguito.

Determinazione di cortisolo e testosterone nella saliva con metodo immunoenzimatico diretto
Le determinazioni quantitative di cortisolo (Arakawa et al., 1979) e di testosterone (Joshi et al., 1979) in saliva sono state effettuate con metodi colorimetrici immunoenzimatici competitivi ELISA. La maggior parte del cortisolo nella saliva non è legato ad alcun componente e passa nella saliva come ultra filtrato del sangue. L'ormone d'interesse presente nella saliva compete con l'ormone legato alla perossidasi di rafano per il legame ad anticorpi anti-cortisolo o anti-testosterone presenti nelle micro-piastre. Dopo aver atteso un tempo necessario affinché la reazione enzimatica sia completa con lo sviluppo di colore, la stessa viene fermata e l'assorbimento viene misurato ad una λ di 450nm. L'intensità della colorazione è inversamente correlata alla concentrazione di cortisolo o testosterone nel campione in analisi. La concentrazione di cortisolo o testosterone è calcolata in relazione ad una curva standard di riferimento.
I dati sono riportati come media ed errore standard medio (SEM). Test t di Student. *P<0,05; **P<0,02.

Si ringrazia la ditta FreeLend Srl Nutraceutica Immunonutrizione per il supporto alla ricerca in oggetto.
BIBLIOGRAFIA
Arakawa H, Maeda M, Tsuji A. Chemiluminescence enzyme immunoassay of cortisol using peroxidase as label. *Anal Biochem.* 1979;97(2):248-54.
Brownlee KK, Moore AW, Hackney AC. *Jour. of Sports Sc. and Med.*, 2005, 4, 76-83
Cazzavilla S. FUNGHI MEDICINALI - dalla tradizione alla scienza. Nuova IPSA ed., Palermo, 2011; pp 336
Daly W, Seegers CA, Rubin DA, Dobridge JD, Hackney AC. *Eur J Appl Physiol.* 2005, 93, 375-380
Kentta G, Hassmen P. *Overtraining and recovery. A conceptual model.* Sports Medicine. 1998, 26:31.
Joshi LM, Shah HP, Suchana SP. A sensitive and specific enzymemimic assay for serum testosterone. *Steroids.* 1979;34(1):35-46.
Meeusen R, Piacentini MF, Buuschaert B, Buysse L, De Schutter G, Stray-Gundersen J. Hormonal responses in athletes: the use of a without exercise protocol to detect subtle differences in overtraining status. *Eur J Appl Physiol.* 2004, 91:140-6.
Sassi A. *Allenamento e Sovralimentazione. Le basi per conoscere e prevenire l'overtraining.* Edi. Ermes, Milano, 1998; pp 150.

RISULTATI
FIGURA 1: LIVELLI DI TESTOSTERONE PRIMA (PRE-GARE) E DOPO LE GARE (POST-GARE) IN SEGUITO A 1 MESE DI PLACEBO (GARA1 e allenamento lungo) E DOPO SUPPLEMENTAZIONE FUNGINA PER 1 MESE (GARA 2) e PER 3 MESI (GARA 3)



L'istogramma mostra l'effetto sui livelli di testosterone salivare dell'integrazione fungina. L'integrazione per 3 mesi con *Cordyceps* e *Reishi* aumenta i valori di testosterone prima della gara dell'86,5% (dopo 1 mese di integrazione, test P<0,002) e dopo la gara del 249,5% (dopo 3 mesi di integrazione test NS) rispetto alla condizione di placebo iniziale. Inoltre, mentre sotto placebo il valore di testosterone cala dopo l'esercizio fisico intenso, durante l'integrazione fungina si assiste ad un aumento della concentrazione di testosterone salivare (valore post-gara su pre-gara) del 28% dopo 1 mese di integrazione e del 30% dopo 3 mesi di integrazione. Si può notare come nella condizione finale, dopo 1 mese di placebo, si assiste al ritorno alla condizione iniziale, con un valore di testosterone pre-gara più alto rispetto al post-gara. Tuttavia, il valore di testosterone pre-gara si mantiene ancora statisticamente superiore rispetto al valore del placebo iniziale (test P<0,03).
L'aumento graduale dell'effetto dell'integrazione fungina (gara 3 vs gara 2) evidenzia la necessità di prolungare l'integrazione per almeno 3 mesi.

CONCLUSIONI
La variabilità dei dati basali di testosterone e cortisolo salivare nei diversi soggetti richiede un'ulteriore indagine per poter far emergere tutti i dati dal punto di vista statistico.

Lo studio evidenzia come siano necessari almeno 3 mesi di integrazione fungina alle dosi indicate.

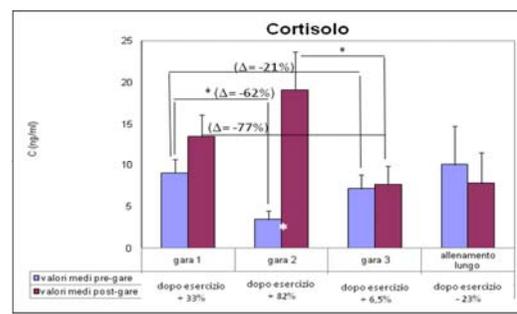
Nella condizione di placebo iniziale il rapporto testosterone e cortisolo post-gara rispetto alla condizione pre-gara cala del 41,6%; dopo integrazione per 3 mesi con *Cordyceps* e *Reishi* non si assiste ad alcuna modifica di tale rapporto, evidenziando come l'esercizio fisico intenso venga "protetto" dalla attesa variazione anabolica/catabolica dei due ormoni usati come biomarcatori.

Dopo 1 mese dalla sospensione dell'integrazione fungina, il rapporto T/C pre gara si mantiene elevato e significativamente differente dal placebo iniziale, mentre il rapporto T/C post-gara tende a tornare ai valori iniziali, non proteggendo più l'atleta dallo stress imposto dall'esercizio fisico.

❖ **In conclusione**, la supplementazione con *Cordyceps sinensis* e *Ganoderma lucidum* è in grado di modulare e ridurre la sindrome da sovrallenamento (*overtraining syndrome*, OTS).

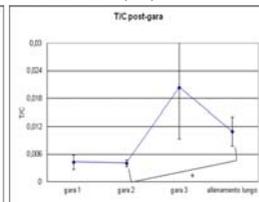
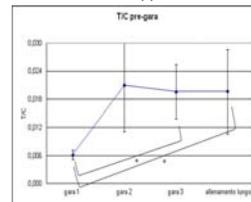
❖ **In conclusione**, l'analisi dei dati ottenuti in questo lavoro di tesi induce ad ipotizzare che l'integrazione, da noi studiata, potrebbe avere una certa importanza nelle gare a tappe, dove risulta essenziale una corretta programmazione dei tempi di recupero
❖ **Rimangono** ancora da analizzare i parametri antifiammatori, necessari per comprendere il ruolo svolto sul sistema immunitario dai due funghi, ciò sarà materia di proseguimento dello studio in futuro.

FIGURA 2: LIVELLI DI CORTISOLO PRIMA (PRE-GARE) E DOPO LE GARE (POST-GARE) IN SEGUITO A 1 MESE DI PLACEBO (GARA1 e allenamento lungo) E DOPO SUPPLEMENTAZIONE FUNGINA PER 1 MESE (GARA 2) e PER 3 MESI (GARA 3)



L'istogramma mostra l'effetto sui livelli di cortisolo salivare dell'integrazione fungina. L'integrazione per 4 mesi con *Cordyceps* e *Reishi* determina una tendenza alla diminuzione del cortisolo salivare prima della gara del 21,1% e dopo la gara del 77,1%, sebbene la variabilità dei dati non permetta di evidenziare una differenza statisticamente significativa rispetto alla condizione di placebo iniziale.
Dopo 1 mese di integrazione fungina mentre si assiste ad un calo del 62,1% del cortisolo salivare pre-gara (test P<0,03) il livello di cortisolo post-gara aumenta del 29,6% (test NS).
Risulta significativo (test P<0,04) il calo post-gara dei valori dopo 1 mese rispetto a 3 mesi di integrazione fungina.
Nella condizione finale di placebo non si assiste ad alcun cambiamento statisticamente significativo dei livelli di cortisolo salivare pre e post-gara.
In analogia con quanto visto per il testosterone, anche in questo caso, mentre sotto placebo il valore di cortisolo salivare aumenta nel post-gara rispetto al pre-gara del 33%, dopo 3 mesi di integrazione fungina i valori di cortisolo salivare non mostrano alcun aumento significativo.

FIGURE 3,4: PRE/POST-GARA: RAPPORTO TESTOSTERONE/CORTISOLO IN SEGUITO A 1 MESE DI PLACEBO (GARA1 e allenamento lungo) E DOPO SUPPLEMENTAZIONE FUNGINA PER 1 MESE (GARA 2) e PER 3 MESI (GARA 3). Come indicatore del livello dello stress imposto dall'esercizio fisico, è stato misurato il rapporto tra testosterone e cortisolo (T:C).



L'istogramma mostra l'effetto sul rapporto testosterone/cortisolo (T/C) salivare dell'integrazione fungina nella condizione pre-gara.
Dopo 3 mesi di supplementazione fungina, i ciclisti hanno mostrato una risposta adattativa nella condizione di pre-gara che si è espressa con un aumento del rapporto T/C (test P<0,03). Questo dato, come visto in precedenza, riflette l'aumento dei livelli di testosterone (+86,5%) e il calo dei livelli di cortisolo (-21,1%).
Dopo 1 mese dall'interruzione dell'integrazione fungina (allenamento lungo sotto placebo finale) il rapporto T/C rimane elevato (test P<0,04 placebo finale/placebo iniziale).

L'istogramma mostra l'effetto sul rapporto testosterone/cortisolo (T/C) salivare dell'integrazione fungina nella condizione post-gara.
Dopo 3 mesi di supplementazione fungina, i ciclisti hanno mostrato una risposta adattativa al sovraccarico conseguente all'esercizio fisico che si è espressa con un aumento del rapporto T/C. Questo dato, come visto in precedenza, riflette l'aumento dei livelli di testosterone (+249,5%) e il calo dei livelli di cortisolo (-77,1%).
A differenza di quanto emerso nella condizione pre-gara, dopo 1 mese dall'interruzione dell'integrazione fungina (allenamento sotto placebo finale) il rapporto T/C tende a diminuire e non mostra una significativa differenza rispetto al placebo iniziale.