

# Salivary testosterone and cortisol levels to assess conditioning training program in rugby union players

Livelli di testosterone e cortisolo salivari per valutare il programma di allenamento di condizionamento nel rugby a 15

S. PACINI<sup>1</sup>, J. J. V. BRANCA<sup>1</sup>, M. GULISANO<sup>1</sup>  
M. LEVI MICHELI<sup>1</sup>, M. CEROTI<sup>2</sup>, M. RUGGIERO<sup>3</sup>, G. MORUCCI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Anatomy and Histology Section, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Florence, Florence, Italy

<sup>2</sup>Molecular and Nutritional Epidemiology Unit, ISPO, Florence, Italy

<sup>3</sup>Experimental Pathology and Oncology Section, Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, University of Florence, Florence, Italy

## SUMMARY

**Aim.** Aim of the present study was to prevent overtraining and to ensure that the athletic training program will result in performance improvements, regular performance tests as well as heart rate evaluation and questionnaires are necessary. However, none of them are routinely performed on regular basis mainly for their interference with the session training, thus leading to the risk of an over-reaching which in turn may result in an overtraining. In this study we evaluate the possibility to monitor the development of the training program of high level rugby players by a simple, non-invasive and fast salivary testosterone and cortisol measure.

**Methods.** Testosterone and cortisol samplings were performed in several moments of the preseason training program. Measures were correlated with anthropometric evaluations performed by bioelectrical impedance analysis before and after the training program. To assess a potential role of genetic, athletes were also genotyped for ACTN3 and ACE gene polymorphisms.

**Results.** Data from this study show that hormone salivary measures correlate with changes in anthropometric values during the training program. No correlations were observed between genotypes and variations in hormone levels; however, ACE genotype correlates with the different team position of rugby players.

**Conclusion.** Hormone salivary measures represent a valid, fast, non-invasive and stress-free system of monitoring the athletic preparation.

KEY WORDS: Testosterone - Rugby - Physical education and training.

## RIASSUNTO

**Obiettivo.** Obiettivo del presente studio è stato quello di prevenire il sovrallenamento e garantire che il programma di allenamento sportivo si traduca in miglioramenti delle prestazioni e in test di performance regolari, oltre che valutare la frequenza cardiaca e somministrare questionari laddove reputato necessario. Tuttavia, niente di tutto ciò viene condotto di routine su base regolare, soprattutto per l'interferenza con la sessione di allenamento, determinando in tal modo il rischio di sovrallenamento (overreaching) che può a sua volta condurre al sovrallenamento. Nel presente studio, abbiamo valutato la possibilità di monitorare lo sviluppo del programma di allenamento di rugbisti di alto livello mediante una misurazione semplice, veloce e non invasiva dei livelli di testosterone e cortisolo salivari.

**Metodi.** I campionamenti di testosterone e cortisolo sono stati effettuati in diversi momenti del programma di allenamento pre-campionato. Le misurazioni hanno mostrato una correlazione con le valutazioni antropometriche effettuate mediante analisi bioimpedenziometrica, prima e dopo il programma di allenamento. Al fine di valutare un potenziale ruolo della genetica, gli atleti sono stati genotipizzati per i polimorfismi dei geni ACTN3 e ACE.

Risultati. I dati ottenuti dal presente studio mostrano che le misurazioni salivari degli ormoni sono correlate con i cambiamenti nei valori antropometrici durante il programma di allenamento. Non abbiamo osservato nessuna correlazione tra i genotipi e le variazioni nei livelli ormonali; tuttavia, il genotipo ACE ha mostrato una correlazione con il diverso ruolo tattico dei rugbisti.

Conclusioni. Le misurazioni dei livelli degli ormoni salivari rappresentano un sistema valido, rapido, non invasivo e non stressante per monitorare la preparazione atletica.

PAROLE CHIAVE: Testosterone - Rugby - Educazione fisica e allenamento.

Rugby union is a sport requiring players to perform bouts of intense activity such as physical collisions and sprinting separated by short bouts of low intensity activity.<sup>1</sup> The goal of athletic training in rugby union as well as in all the other disciplines is to enhance or to maintain physical performances. This requires an optimal training program; in fact, when training is prolonged, excessive stress can arise concurrently with inadequate recovery. In this case, the positive physiological modifications induced by physical training are reversed with the severe risk of overreaching and overtraining.<sup>2, 3</sup>

To prevent overtraining and to adjust the training load and the training strain, one of the most used methods is the session-rating of perceived exertion questionnaire.<sup>4</sup> This method is commonly used but only few data are available concerning its use during intense training in team-sports athletes.<sup>5</sup> Moreover psychological questionnaires and/or other extraneous indicators (e.g., the evaluation of the physical status of the athlete by the experienced observation of the trainer) can present limits and disadvantages due to the partial subjectivity of the data.

Thus, other indicators have been proposed to early identify the symptoms of overtraining and levels of testosterone to cortisol ratio seem to inversely correlate with the score obtained from the questionnaire.<sup>6</sup>

Many studies demonstrate that salivary measures of hormones and immunological compounds provide a good reference for the respective hormonal blood concentrations giving useful information on how steroid hormones are modified in response to exercise and training.<sup>6-8</sup>

Several studies investigated salivary cortisol response to high-intensity exercise.<sup>9-12</sup>

The use of saliva for monitoring steroid, peptide, and immune markers in sport and exercise represents an alternative to the collection of plasma and serum.<sup>13</sup> It is a non-invasive method allowing a frequent and quick collec-

*I* rugby a 15 è uno sport nel quale i giocatori effettuano sessioni ad alta intensità, come collisioni fisiche e corsa veloce, intervallate da brevi periodi di attività a bassa intensità.<sup>1</sup> L'obiettivo dell'allenamento atletico nel rugby a 15, come in tutte le altre discipline sportive, è quello di promuovere o mantenere le performance fisiche. Ciò richiede un programma di allenamento ottimale; infatti, quando l'allenamento è prolungato, può insorgere uno stress eccessivo e un concomitante recupero inadeguato. In tal caso, le modifiche fisiologiche positive indotte dall'allenamento fisico sono invertite con il grave rischio di sovrallenamento e sovrallenamento.<sup>2, 3.</sup>

Per prevenire il sovrallenamento e regolare il carico di allenamento e il relativo sforzo, uno dei metodi più utilizzati è il questionario di valutazione dello sforzo percepito durante la sessione.<sup>4</sup> Questo metodo è utilizzato abitualmente, ma è disponibile una scarsa quantità di dati riguardo il suo utilizzo durante un allenamento ad alta intensità in atleti che praticano sport di squadra.<sup>5</sup> Inoltre, i questionari psicologici e/o altri indicatori estrinseci (ad es. la valutazione dello stato fisico dell'atleta attraverso un'osservazione esperta da parte dell'allenatore) possono presentare limiti e svantaggi a causa della parziale soggettività dei dati.

Pertanto, sono stati proposti altri indicatori per identificare precocemente i sintomi di sovrallenamento; inoltre, i livelli del rapporto testosterone-cortisolo sembrano essere inversamente correlati con il punteggio ottenuto dai questionari.<sup>6.</sup>

Numerosi studi hanno indicato che le misurazioni salivari degli ormoni e dei composti immunologici rappresentano un buon riferimento per le rispettive concentrazioni ematiche ormonali, fornendo informazioni utili sul modo in cui gli ormoni steroidei vengono modificati in risposta all'esercizio fisico e all'allenamento.<sup>6-8.</sup>

Numerosi studi hanno esaminato la risposta del cortisolo salivare all'esercizio fisico di elevata intensità.<sup>9-12.</sup>

L'utilizzo della saliva per il monitoraggio di steroidi, peptidi e marcatori immunitari nello sport e nell'esercizio fisico rappresenta un'alternativa alla

tion, without any stress or interference with the training session. It does not require a medical assistance and can be performed on the sport field.

In this research we investigated the possibility to use salivary measurements of testosterone and cortisol as early markers of overreaching leading to overtraining. Salivary levels of testosterone and cortisol were evaluated in different moments of a conditioning training program. Hormonal levels were correlated with phenotypic features obtained by bioelectrical impedance analysis (BIA) at the beginning and at the end of the conditioning performance training.

Furthermore we evaluated the correlation between ACTN3 (alpha-actinin skeletal muscle isoform 3) and ACE (Angiotensin Converting Enzyme) gene polymorphisms and hormonal levels variations during the seasonal performance training; also the association between ACTN3 and ACE polymorphisms and the specific position in the rugby team was investigated.

## Materials and methods

### *Experimental approach to the problem*

Testosterone, cortisol and testosterone to cortisol ratio levels from rugby union players saliva samples were evaluated over the pre-season training period in order to monitor and validate the sport-specific physical conditioning training program.

Body composition (bioelectrical impedance analysis, BIA) and physical performance measurements were evaluated to assess the physical status of the athletes and to plan and set the pre-season specific conditioning training program.

The possible association between the polymorphisms of genes potentially involved in affecting physical performance such as ACE and ACTN3, and the steroid hormone levels evaluated over the physical conditioning training program, was studied in order to acquire new elements useful to better understand how sport-related genetic traits can affect the response of the high level athletes to specific training programs.

### *Subjects*

Sixteen male professional rugby union players (Rugby Club I Cavalieri, Excellence Cham-

*raccolta di plasma e siero*<sup>13</sup>. Si tratta di un metodo non invasivo, che consente una raccolta rapida e frequente, senza stress o interferenza con la sessione di allenamento. Non richiede assistenza medica e può essere eseguito sul terreno di gioco.

*Nella presente ricerca abbiamo studiato la possibilità di utilizzare le misurazioni di testosterone e cortisolo salivari come marcatori precoci del sovraccarico e del conseguente sovrallenamento. I livelli di testosterone e cortisolo salivari sono stati valutati in diversi momenti di un programma di allenamento di condizionamento. I livelli ormonali erano correlati con le caratteristiche fenotipiche ottenute mediante analisi bioimpedenziometrica (BIA) all'inizio e al termine dell'allenamento della performance di condizionamento.*

*Inoltre, abbiamo valutato la correlazione tra i polimorfismi dei geni ACTN3 (isoforma 3 dell'alfa actinina muscolare scheletrica) e ACE (enzima di conversione dell'angiotensina)*

*e le variazioni nei livelli ormonali durante l'allenamento della performance nel campionato; è stata esaminata anche l'associazione tra i polimorfismi ACTN3 e ACE e lo specifico ruolo tattico nella squadra di rugby.*

### **Materiali e metodi**

#### *Approccio sperimentale al problema*

*I livelli di testosterone, cortisolo e del rapporto testosterone-cortisolo in campioni salivari di rugbisti a 15 sono stati valutati nel corso dell'allenamento pre-campionato al fine di monitorare e convalidare il programma di allenamento di condizionamento fisico specifico alla disciplina sportiva.*

*La composizione corporea (analisi bioimpedenziometrica, BIA) e le misurazioni della performance fisica sono state valutate per determinare lo stato fisico degli atleti e per pianificare e stabilire lo specifico programma di allenamento di condizionamento fisico precampionato.*

*La possibile associazione tra i polimorfismi dei geni potenzialmente coinvolti nell'influenza della performance fisica, come ACE e ACTN3, e i livelli degli ormoni steroidei valutati nel corso del programma di allenamento di condizionamento sono stati studiati al fine di acquisire nuovi elementi utili per comprendere meglio in che modo tratti genetici associati allo sport possano influenzare la risposta degli atleti di alto livello a specifici programmi di allenamento.*

#### *Soggetti*

*Sedici rugbisti a 15, professionisti e di sesso maschile (squadra di rugby "I Cavalieri", campionato*

pionship) volunteered to participate in this study. The mean age of athletes was  $24.8 \pm 3.5$  years.

The study was performed in accordance with the required ethical standards and approved by the president, the ethic committee and the medical staff of the Rugby Club I Cavalieri (Prato, Italy). Written informed consent was provided by all the participants included in this study and the study protocol was in accordance with the Declaration of Helsinki for Human Research.

### Procedures

This study was completed between July and September 2012. Before starting the preseason conditioning training program, anthropometric measurements and aptitude and athletic performance tests were administered to each athlete as prognostic evaluation of their physical fitness status and to plan the opportune training loads.

Each player underwent a 7-weeks conditioning training program divided into 3 different training cycles (see Conditioning Training Program).

Five saliva samples were taken from each player over the pre-season training period and just before the beginning of the National Championship according to key steps of the conditioning training program. Saliva samples were collected: after the off-season summer period, just before the beginning of the pre-season training sessions (T0); 7 days after T0, *i.e.*, after 5 days of training mild in volume and intensity and followed by two days of rest (T1); 6 days after T1, *i.e.*, after 5 days of training heavy in volume and intensity (13 sessions) without any following day of rest (T2); at the end of the pre-season performance training (6 weeks) and after 1 day of rest (T3); during the season performance training, *i.e.*, after 5 consecutive days of training heavy in volume and intensity and without any following day of rest (T4). In terms of physical conditioning, tiring and physical stress each time corresponds to a different status: T0 corresponds to a low conditioning status after a 5-6 week off-season period, T1 to a mild reconditioning without tiring, T2 to a mild conditioning with heavy tiring and physical stress, T3 to a medium conditioning with low tiring, T4 to a medium conditioning with light tiring and low physical stress.

*di eccellenza), si sono offerti volontari per prendere parte al presente studio. L'età media degli atleti era di  $24,8 \pm 3,5$  anni.*

*Lo studio è stato condotto in conformità agli standard etici richiesti e approvati dal Presidente, dal Comitato etico e dal personale medico della squadra di rugby "I Cavalieri" (Prato, Italia). Tutti i partecipanti inclusi in questo studio hanno fornito il loro consenso informato scritto; il protocollo dello studio era conforme alla Dichiarazione di Helsinki per la ricerca che coinvolge soggetti umani.*

### Procedure

*Il presente studio è stato condotto tra luglio e settembre 2012. Prima di iniziare il programma di allenamento di condizionamento pre-campionato, sono state effettuate le misurazioni antropometriche; inoltre, sono stati somministrati test di attitudine e performance atletica a ciascun atleta come valutazione prognostica dello stato di forma fisica e per pianificare gli opportuni carichi di allenamento.*

*Ogni rugbista è stato sottoposto a 7 settimane di un programma di allenamento di condizionamento diviso in tre diversi cicli di allenamento (vedere la sezione "Programma di allenamento di condizionamento").*

*Cinque campioni di saliva sono stati prelevati da ciascun giocatore durante il periodo di allenamento pre-campionato e poco prima dell'inizio del campionato nazionale secondo le fasi chiave del programma di allenamento di condizionamento. I campioni di saliva sono stati raccolti: dopo il periodo di pausa estivo, appena prima dell'inizio delle sessioni di allenamento pre-campionato (T0); 7 giorni dopo T0, cioè dopo 5 giorni di allenamento a volume e intensità moderati seguiti da due giorni di riposo (T1); 6 giorni dopo T1, cioè dopo 5 giorni di allenamento a volume e intensità elevati (13 sessioni) senza alcun successivo giorno di riposo (T2); al termine dell'allenamento della performance pre-campionato (6 settimane) e dopo un giorno di riposo (T3); durante l'allenamento della performance nel campionato; cioè dopo 5 giorni consecutivi di allenamento a volume e intensità elevati e senza alcun successivo giorno di riposo (T4). In termini di condizionamento fisico, l'affaticamento e lo stress fisico corrispondono ogni volta a uno stato diverso: T0 corrisponde a un basso stato di condizionamento dopo un periodo di pausa di 5-6 settimane, T1 a un ricondizionamento lieve senza affaticamento, T2 a un condizionamento lieve con elevato affaticamento e stress fisico, T3 a un condizionamento medio con un basso affaticamento, T4 a un condizionamento medio con leggero affaticamento e basso stress fisico.*

From the five samplings, six different periods were considered: T0-T1, T0-T3, T0-T4, T1-T2, T1-T3, T2-T4. These particular time intervals were chosen for their link with specific aspects strictly related to the conditioning training program. Values of salivary testosterone and cortisol levels were measured in all the athletes and for each of the five samplings, then mean values of differences ( $\Delta$ ) between different samplings were calculated.

#### CONDITIONING TRAINING PROGRAM

During the study, July 30-September 21, 69 training sessions, 2 friendly matches and 1 regular championship match were performed. The training has been divided into 3 cycles:

— 1<sup>st</sup> preseason cycle (July 30-August 12): 18 training sessions and 8 days of rest were performed. 73% of the cycle was dedicated to physical training to increase hypertrophy, flexibility and aerobic power while 27% was dedicated to rugby activity;

— 2<sup>nd</sup> preseason cycle (August 13-September 2): 27 training sessions, 1 friendly match and 13 days of rest were performed; 56% of the cycle was dedicated to physical training to increase maximum power, aerobic power and lactic acid tolerance while 44% was dedicated to rugby activity;

— season cycle (September 3-21): 24 training sessions, 1 friendly match and 1 championship match were performed; 55% of the cycle was dedicated to physical training to increase the explosive strength, aerobic power and lactic acid tolerance while 45% was dedicated to rugby activity.

#### ANTHROPOMETRIC EVALUATION AND PHYSICAL PERFORMANCE MEASUREMENTS

Body composition was assessed by single frequency (50 kHz) bioelectrical impedance analysis (BIA 101 Anniversary Akern Srl, Florence, Italy). The resistance (R) and reactance (Xc) values were normalized by the standing height (H) then plotted on the R-Xc graph and evaluated with bioelectrical impedance vector analysis. The phase angle (PA) was calculated by using the arctangent (Xc/R).

To assess the physical status at the beginning of the training, athletes underwent physical performance measurements representing different aspects of physical fitness in rugby (maximal oxygen consumption, sprinting speed over

*Dai cinque campionamenti, sono stati presi in considerazione sei diversi periodi: T0-T1, T0-T3, T0-T4, T1-T2, T1-T3, T2-T4. Tali specifici intervalli di tempo sono stati scelti per il loro collegamento con specifici aspetti strettamente legati al programma di allenamento di condizionamento. I valori dei livelli salivari di testosterone e cortisolo sono stati misurati in tutti gli atleti e per ciascuno dei cinque campionamenti, quindi sono stati calcolati i valori medi delle differenze ( $\Delta$ ) tra i diversi campionamenti.*

#### PROGRAMMA DI ALLENAMENTO DI CONDIZIONAMENTO

*Nel corso dello studio, condotto dal 30 luglio al 21 settembre, si sono svolte 69 sessioni di allenamento, 2 incontri amichevoli e 1 partita regolamentare di campionato. L'allenamento è stato suddiviso in 3 cicli:*

— 1° ciclo pre-campionato (30 luglio-12 agosto): sono state effettuate 18 sessioni di allenamento con 8 giorni di riposo. Il 73% del ciclo è stato dedicato all'allenamento fisico per aumentare l'ipertrofia, la flessibilità e la potenza aerobica, mentre il 27% è stato dedicato all'attività del rugby;

— 2° ciclo pre-campionato (13 agosto-2 settembre): sono state condotte 27 sessioni di allenamento e 1 incontro amichevole con 13 giorni di riposo; il 56% del ciclo è stato dedicato all'allenamento fisico per aumentare la potenza massima, la potenza aerobica e la tolleranza all'acido lattico, mentre il 44% è stato dedicato all'attività del rugby;

— ciclo di campionato (3-21 settembre): sono state condotte 24 sessioni di allenamento, 1 incontro amichevole e un incontro di campionato; il 55% del ciclo è stato dedicato all'allenamento fisico per aumentare la forza esplosiva, la potenza aerobica e la tolleranza all'acido lattico, mentre il 45% è stato dedicato all'attività del rugby.

#### VALUTAZIONE ANTROPOMETRICA E MISURAZIONI DELLA PERFORMANCE FISICA

*La composizione corporea è stata valutata mediante analisi bioimpedenziometrica a singola frequenza (50 kHz) (BIA 101 Anniversary Akern Srl, Firenze, Italia). I valori di reattanza (Xc) e resistenza (R) sono stati normalizzati per l'altezza in posizione eretta (H), quindi tracciati nel grafico R-Xc e valutati con l'analisi vettoriale di impedenza bioelettrica. L'angolo di fase (PA) è stato calcolato mediante la formula dell'arcotangente (Xc/R).*

*Al fine di valutare la condizione fisica all'inizio dell'allenamento, gli atleti sono stati sottoposti a misurazioni della performance fisica che rappresentano diversi aspetti della forma fisica nei rugbisti (consumo massimo di ossigeno, corsa veloce sui*

10 m and 40 m, vertical jumping height and mechanical power of the lower limb extensor musculature).

#### HORMONE ASSAYS

Saliva samples were taken from each subject in the morning, before starting the training session. Subjects were asked to chew for at least 2 minutes the Salivette device (Sarsted, Verona, Italy). Concentrations of testosterone and cortisol were determined using a competitive immune-enzymatic colorimetric method for quantitative determination (Grifols Italia, Pisa, Italy).

#### GENOTYPING

Genomic DNA was extracted from saliva samples. Total DNA purification was performed by using a QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Srl, Milan, Italy). Genotyping of the ACE I/D and ACTN3 R577X polymorphisms were performed by polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, when necessary.

#### Statistical analyses

Student's *t* test was performed to study salivary hormone level variations over the time periods examined and variations of BIA parameters.

$\chi^2$  test was performed to compare genotype frequencies in relationship with the specific player positions (forwards and backs). All values are expressed as mean. P value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

### Results

#### BIA values before and after the training program

BIA results showed, as expected, a significant increase of the mean values of PA and of BCM between T0 and T4, *i.e.*, before and after the conditioning training program (Figure 1A, B).

#### Evaluation of hormone levels during the training program

##### TESTOSTERONE

The mean salivary testosterone concentration significantly increased in the T0-T4 period with a  $\Delta T4-T0$  of 24.28 pg/mL (Figure 2).

10 e 40 metri, altezza del salto in alto e potenza meccanica della muscolatura estensoria degli arti inferiori).

#### DOSAGGI ORMONALI

*I campioni di saliva sono stati prelevati da ciascun soggetto al mattino, prima di iniziare la sessione di allenamento. Ai soggetti è stato chiesto di masticare per almeno 2 minuti il dispositivo Salivette (Sarsted, Verona, Italia). Le concentrazioni di testosterone e cortisolo sono state determinate utilizzando un metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa (Grifols Italia, Pisa, Italia).*

#### GENOTIPIZZAZIONE

*Il DNA genomico è stato estratto da campioni di saliva. La purificazione del DNA totale è stata effettuata utilizzando un QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Srl, Milano, Italia). La genotipizzazione dei polimorfismi ACE I/D e ACTN3 R577X è stata effettuata con l'amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) e l'analisi del polimorfismo da lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP), laddove necessario.*

#### Analisi statistiche

*Il test *t* di Student è stato utilizzato per studiare le variazioni dei livelli ormonali salivari nei periodi di tempo esaminati e le variazioni dei parametri BIA.*

*Il test  $\chi^2$  è stato effettuato per confrontare le frequenze del genotipo in relazione allo specifico ruolo tattico dei giocatori (attaccanti e difensori). Tutti i valori sono espressi come medie. Un valore  $P \leq 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.*

### Risultati

#### Valori BIA prima e dopo il programma di allenamento

*I risultati BIA hanno mostrato, come previsto, un significativo aumento dei valori medi di PA e massa cellulare corporea (BCM) tra T0 e T4, cioè prima e dopo il programma di allenamento di condizionamento (Figura 1A, B).*

#### Valutazione dei livelli ormonali durante il programma di allenamento

##### TESTOSTERONE

*La concentrazione media di testosterone salivare è aumentata in maniera significativa nel periodo T0-T4 con una  $\Delta T4-T0$  di 24,28 pg/ml (Figura 2).*

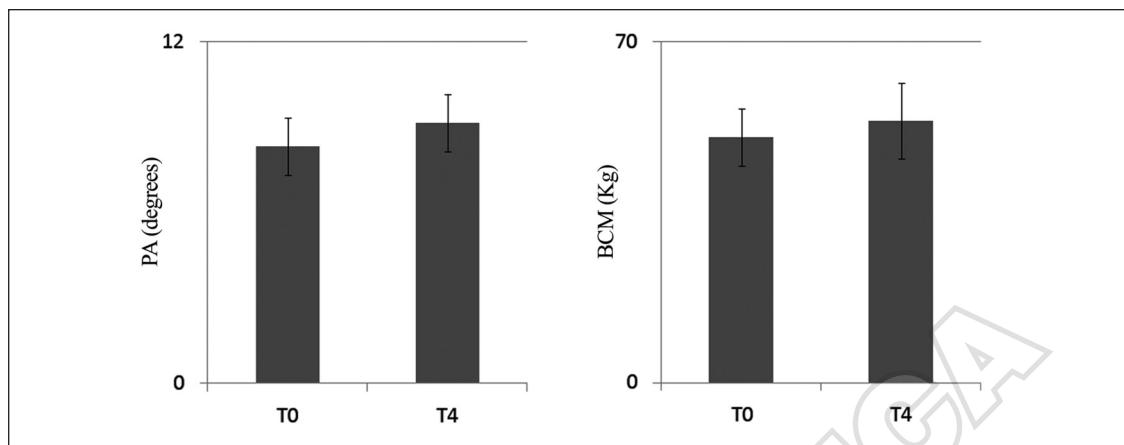


Figure 1.—BIA values before and after the training program. A) Mean values of phase angle (PA) are significantly increased at the end of the training program (T4) in comparison to the mean values measured before starting the training program (T0). Mean $\pm$ SD:  $0.82\pm 1.27$ ;  $P=0.02$ ; B) mean values of Body Cell Mass (BCM) are significantly increased at the end of the training program (T4) in comparison to the mean values measured before starting the training program (T0). Mean $\pm$ SD:  $3.39\pm 6.44$ ;  $P=0.05$ .

Figura 1. — Valori BIA prima e dopo il programma di allenamento. A) i valori medi dell'angolo di fase (PA) sono aumentati in maniera significativa al termine del programma di allenamento (T4) rispetto ai valori medi misurati prima di iniziare il programma di allenamento (T0). Media $\pm$ DS:  $0,82\pm 1,27$ ;  $P=0,02$ ; B) i valori medi della massa cellulare corporea (BCM) sono aumentati in maniera significativa al termine del programma di allenamento (T4) rispetto ai valori medi misurati prima di iniziare il programma di allenamento (T0). Media $\pm$ DS:  $3,39\pm 6,44$ ;  $P=0,05$ .

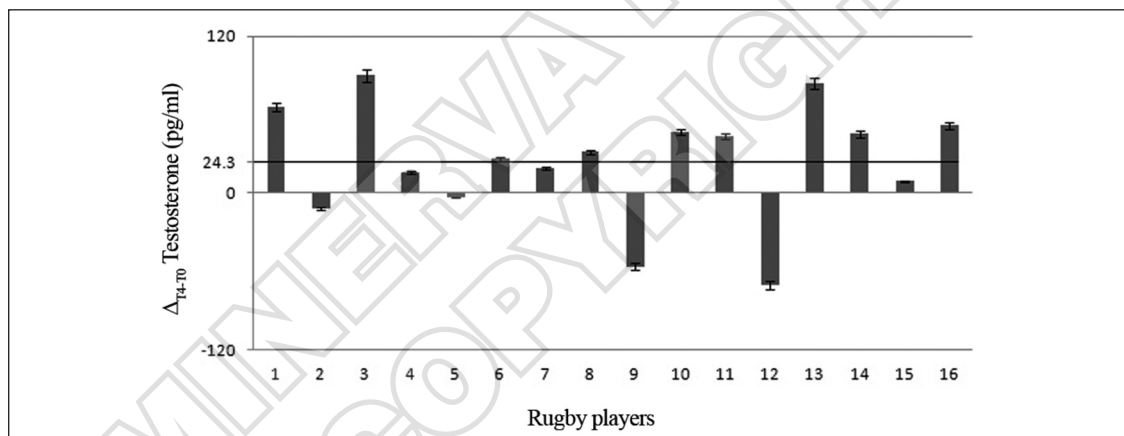


Figure 2.—Testosterone levels during the training program. Differences in testosterone levels ( $\Delta T_4-T_0$ ) for each athlete are reported on the x axis. Each number indicates a different subject. The mean testosterone concentration, expressed in pg/ml, is indicated by the horizontal line. Mean $\pm$ SD:  $24.28\pm 44.39$ ;  $P=0.045$ .

Figura 2. — Livelli di testosterone durante il programma di allenamento. Le differenze nei livelli di testosterone ( $\Delta T_4-T_0$ ) per ciascun atleta sono riportate sull'asse x. Ciascun numero indica un soggetto diverso. La concentrazione media di testosterone, espressa in pg/ml, è indicata dalla linea orizzontale. Media $\pm$ DS:  $24,28\pm 44,39$ ;  $P=0,045$ .

Also in all the other examined time periods the mean salivary testosterone levels increased. None of these differences were statistically significant; however the trend of the salivary testosterone concentrations of the entire population was constantly increasing from the beginning toward the end of the training program (Figure 3A).

I livelli medi di testosterone salivare sono aumentati anche in tutti gli altri intervalli di tempo esaminati. Nessuna di queste differenze era statisticamente significativa; tuttavia, l'andamento delle concentrazioni di testosterone salivare di tutta la popolazione era in costante aumento dall'inizio al termine del programma di allenamento (Figura 3A).

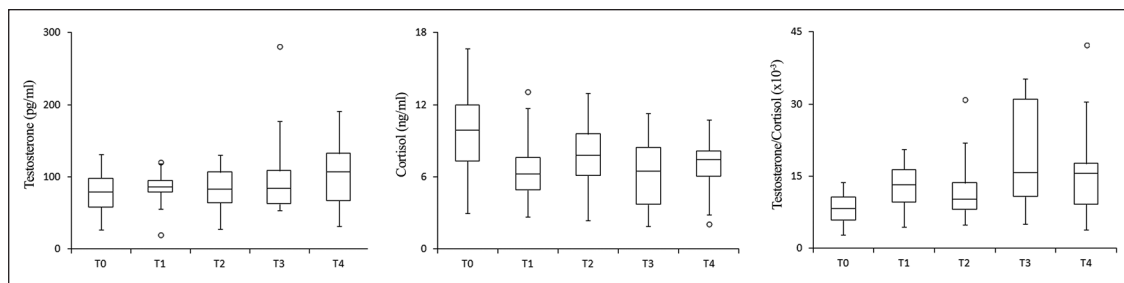


Figure 3.—Box plot representation of the distribution of salivary testosterone (panel A), cortisol (panel B) and testosterone to cortisol ratio (panel C) levels for each time of sampling. ° Outliers.

Figura 3. — Rappresentazione mediante box plot della distribuzione di testosterone salivare (riquadro A), cortisolo (riquadro B) e rapporto testosterone-cortisolo (riquadro C) per ciascun tempo di campionamento. ° Valori erratici.

### CORTISOL

The mean salivary cortisol level significantly decreased in the T0-T1 period with a  $\Delta T1-T0$  of  $-2.9$  ng/mL (Figure 4A), in the T0-T3 period with a  $\Delta T3-T0$  of  $-3.55$  ng/mL (Figure 4B), and in the T0-T4 period with a  $\Delta T4-T0$  of  $-2.61$  ng/mL (Figure 4C). Also in the T1-T3 and T2-T4 periods the mean cortisol levels slightly decreased even though without reaching any statistical relevance.

The only period where a small (not statistically significant) increase of the mean salivary cortisol concentration was observed was the T1-T2 period, the most physically stressful period over the conditioning training. Figure 3B shows that cortisol levels, measured in the entire population, were decreased in all the sampling after T0; the most relevant decrease was observed for the interval T0-T1.

### TESTOSTERONE TO CORTISOL RATIO

The mean values of the salivary testosterone to cortisol ratio significantly increased considering the T0-T1 period with a  $\Delta T1-T0$  of  $4.96$  (Figure 5A). Also in the T1-T3 period a significant increase was observed with a  $\Delta T3-T1$  of  $5.85$  (Figure 5B) as well as in the T2-T4 period with a  $\Delta T4-T2$  of  $4.21$  (Figure 5C), in the T0-T3 period with a  $\Delta T3-T0$  of  $10.81$  (Figure 5D) and in the T0-T4 period with a  $\Delta T4-T0$  of  $7.33$  (Figure 5E).

The only one period where a small decrease (not statistically significant) of the mean value of the testosterone to cortisol ratio was observed was the T1-T2. Except that for the T2 sampling, the trend of the salivary testosterone to cortisol ratio of the entire population was constantly increasing from the beginning toward the end of the training program (Figure 3C).

### CORTISOLO

Il livello medio di cortisolo salivare è diminuito in maniera significativa nel periodo T0-T1 con una  $\Delta T1-T0$  di  $-2,9$  ng/ml (Figura 4A), nel periodo T0-T3 con una  $\Delta T3-T0$  di  $-3,55$  ng/ml (Figura 4B) e nel periodo T0-T4 con una  $\Delta T4-T0$  di  $-2,61$  ng/ml (Figura 4). Anche nei periodi T3-T1 e T2-T4 i livelli medi di cortisolo sono diminuiti lievemente, pur senza raggiungere una rilevanza statistica.

L'unico periodo nel quale è stato osservato un lieve aumento (non statisticamente significativo) della concentrazione media di cortisolo salivare è stato il periodo T1-T2, il periodo più fisicamente stressante durante l'allenamento di condizionamento. La figura 3B mostra che i livelli di cortisolo, misurati in tutta la popolazione, sono diminuiti in tutti i campionamenti dopo T0; la diminuzione più rilevante è stata osservata per l'intervallo T0-T1.

### Rapporto testosterone-cortisolo

I valori medi del rapporto testosterone-cortisolo salivare sono aumentati in maniera significativa, considerando il periodo T0-T1 con una  $\Delta T1-T0$  di  $4,96$  (Figura 5A). Anche nel periodo T1-T3 è stato osservato un aumento significativo con una  $\Delta T3-T1$  di  $5,85$  (Figura 5B), così come nel periodo T2-T4 con una  $\Delta T4-T2$  di  $4,21$  (Figura 5C), nel periodo T0-T3 con una  $\Delta T3-T0$  di  $10,81$  (Figura 5D) e nel periodo T0-T4 con una  $\Delta T4-T0$  di  $7,33$  (Figura 5E).

L'unico periodo in cui è stata osservata una lieve riduzione (non statisticamente significativa) del valore medio del rapporto testosterone-cortisolo è stato il periodo T1-T2. Fatta eccezione per il campionamento T2, la tendenza del rapporto testosterone-cortisolo salivare di tutta la popolazione era in costante aumento dall'inizio al termine del programma di allenamento (Figura 3C).



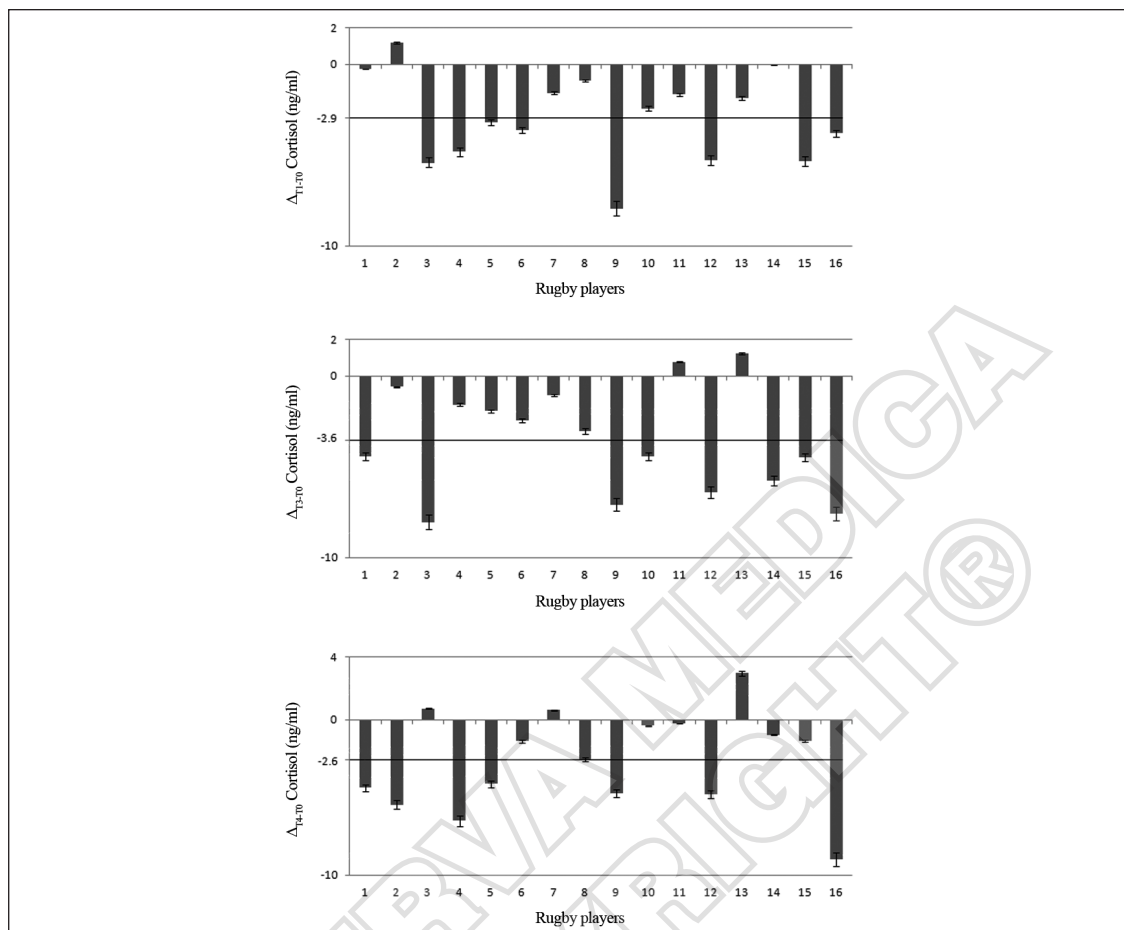


Figure 4.—Cortisol levels during the training program. A) Differences in cortisol levels ( $\Delta_{T1-T0}$ ) for each athlete are reported on the x axis. Each number indicates a different subject. The mean cortisol concentration, expressed in ng/mL, is indicated by the horizontal line. Mean $\pm$ SD:  $-2.93\pm 2.44$ ;  $P=0.0002$ ; B) differences in cortisol levels ( $\Delta_{T3-T0}$ ) for each athlete are reported on the x axis. Each number indicates a different subject. The mean cortisol concentration, expressed in ng/mL, is indicated by the horizontal line. Mean $\pm$ SD:  $-3.55\pm 2.94$ ;  $P=0.0002$ ; C) differences in cortisol levels ( $\Delta_{T4-T0}$ ) for each athlete are reported on the x axis. Each number indicates a different subject. The mean cortisol concentration, expressed in ng/mL, is indicated by the horizontal line. Mean $\pm$ SD:  $-2.61\pm 3.14$ ;  $P=0.0046$ .

Figura 4. — Livelli di cortisolo durante il programma di allenamento. A) Le differenze nei livelli di cortisolo ( $\Delta_{T1-T0}$ ) per ciascun atleta sono riportate sull'asse x. Ciascun numero indica un soggetto diverso. La concentrazione media di cortisolo, espressa in ng/ml, è indicata dalla linea orizzontale. Media $\pm$ DS:  $-2.93\pm 2.44$ ;  $P=0.0002$ ; B) le differenze nei livelli di cortisolo ( $\Delta_{T3-T0}$ ) per ciascun atleta sono riportate sull'asse x. Ciascun numero indica un soggetto diverso. La concentrazione media di cortisolo, espressa in ng/ml, è indicata dalla linea orizzontale. Media $\pm$ DS:  $-3.55\pm 2.94$ ;  $P=0.0002$ ; C) le differenze nei livelli di cortisolo ( $\Delta_{T4-T0}$ ) per ciascun atleta sono riportate sull'asse x. Ciascun numero indica un soggetto diverso. La concentrazione media di cortisolo, espressa in ng/ml, è indicata dalla linea orizzontale. Media $\pm$ DS:  $-2.61\pm 3.14$ ;  $P=0.0046$ .

### Correlation between ACTN3 ACE polymorphisms with hormone levels, BIA and different rugby position

ACTN3 and ACE genotypes are reported in Table I.

Among the 16 athletes examined in this study, 9 were RR, 1 XR and 6 RR for ACTN3

### Correlazione tra i polimorfismi ACTN3 e ACE con i livelli ormonali, i valori BIA e il diverso ruolo tattico dei rugbyisti

I genotipi ACTN3 e ACE sono riportati nella Tabella I.

Tra i 16 atleti esaminati nel presente studio, 9 erano RR, 1 era XR e 6 RR per il polimorfismo

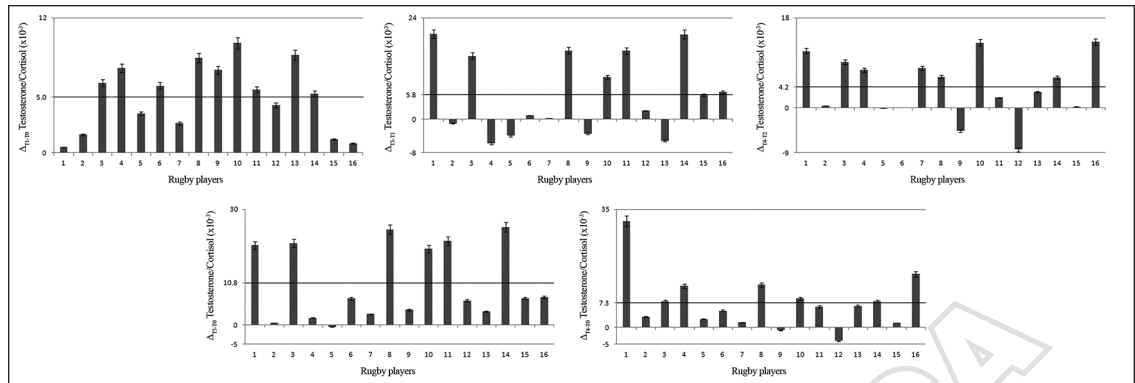


Figure 5.—Testosterone to cortisol ratio during the training program. A) Differences in testosterone to cortisol ratio ( $\Delta_{T1-T0}$ ) for each athlete are reported on the x axis. Each number indicates a different subject. The mean testosterone to cortisol ratio is indicated by the horizontal line. Mean $\pm$ SD: 4.96 $\pm$ 3; P<0.0001; B) differences in testosterone to cortisol ratio ( $\Delta_{T3-T1}$ ) for each athlete are reported on the x axis. Each number indicates a different subject. The mean testosterone to cortisol ratio is indicated by the horizontal line. Mean $\pm$ SD: 5.85 $\pm$ 9.24; P<0.023; C) differences in testosterone to cortisol ratio ( $\Delta_{T4-T2}$ ) for each athlete are reported on the x axis. Each number indicates a different subject. The mean testosterone to cortisol ratio is indicated by the horizontal line. Mean $\pm$ SD: 4.21 $\pm$ 6.19; P=0.016; D) differences in testosterone to cortisol ratio ( $\Delta_{T3-T0}$ ) for each athlete are reported on the x axis. Each number indicates a different subject. The mean testosterone to cortisol ratio is indicated by the horizontal line. Mean $\pm$ SD: 10.81 $\pm$ 9.50; P=0.0004; E) differences in testosterone to cortisol ratio ( $\Delta_{T4-T0}$ ) for each athlete are reported on the x axis. Each number indicates a different subject. The mean testosterone to cortisol ratio is indicated by the horizontal line. Mean $\pm$ SD: 7.33 $\pm$ 8.26; P=0.029.

Figura 5. — Rapporto testosterone-cortisolo durante il programma di allenamento. A) le differenze nel rapporto testosterone-cortisolo ( $\Delta_{T1-T0}$ ) per ciascun atleta sono riportate sull'asse x. Ciascun numero indica un soggetto diverso. Il rapporto testosterone-cortisolo medio è indicato dalla linea orizzontale. Media $\pm$ DS: 4,96 $\pm$ 3; P<0.0001; B) le differenze nel rapporto testosterone-cortisolo ( $\Delta_{T3-T1}$ ) per ciascun atleta sono riportate sull'asse x. Ciascun numero indica un soggetto diverso. Il rapporto testosterone-cortisolo medio è indicato dalla linea orizzontale. Media $\pm$ DS: 5,85 $\pm$ 9,24; P<0,023; C) le differenze nel rapporto testosterone-cortisolo ( $\Delta_{T4-T2}$ ) per ciascun atleta sono riportate sull'asse x. Ciascun numero indica un soggetto diverso. Il rapporto testosterone-cortisolo medio è indicato dalla linea orizzontale. Media $\pm$ DS: 4,21 $\pm$ 6,19; P = 0,016; D) le differenze nel rapporto testosterone-cortisolo ( $\Delta_{T3-T0}$ ) per ciascun atleta sono riportate sull'asse x. Ciascun numero indica un soggetto diverso. Il rapporto testosterone-cortisolo medio è indicato dalla linea orizzontale. Media $\pm$ DS: 10,81 $\pm$ 9,50; P=0,0004; E) le differenze nel rapporto testosterone-cortisolo ( $\Delta_{T4-T0}$ ) per ciascun atleta sono riportate sull'asse x. Ciascun numero indica un soggetto diverso. Il rapporto testosterone-cortisolo medio è indicato dalla linea orizzontale. Media $\pm$ DS: 7,33 $\pm$ 8,26; P=0,029.

TABLE I.—ACTN3 and ACE genotype distribution.

TABELLA I. — Distribuzione dei genotipi ACTN3 e ACE.

Genotype	ACTN3			ACE		
	RR	XX	RX	II	ID	DD
Number of subjects	9	1	6	2	6	8

TABLE II.—ACE genotype distribution in rugby players on the basis of the position.

TABELLA II. — Distribuzione del genotipo per i polimorfismi ACE I/D tra i giocatori di rugby in diversi ruoli tattici.

Position		ACE genotype			Total
		DD	ID	II	
Forward	Frequence	7	2	0	9
	Percentage (%)	43.75	12.5	0	56.25
Back	Frequence	1	4	2	7
	Percentage (%)	6.25	25	12.5	43.75
Total (Forward + Back)	Frequence	8	6	2	16
	Percentage (%)	50	37.5	12.5	100

This document is protected by international copyright laws. No additional reproduction is authorized. It is permitted for personal use to download and save only one file and print only one copy of this Article. It is not permitted to make additional copies (either sporadically or systematically, either printed or electronic) of the Article for any purpose. It is not permitted to distribute the electronic copy of the article through online internet and/or intranet file sharing systems, electronic mailing or any other means which may allow access to the Article. The use of all or any part of the Article for any Commercial Use is not permitted. The production of derivative works from the Article is not permitted. The production of reprints for personal or commercial use is not permitted. It is not permitted to remove, cover, overlay, obscure, block, or change any copyright notices or terms of use which the Publisher may post on the Article. It is not permitted to frame or use framing techniques to enclose any trademark, logo, or other proprietary information of the Publisher.

polymorphism. For ACE polymorphism, 2 were II, 6 were ID and 8 were DD.

No statistical correlations were found between gene polymorphisms (ACTN3 and ACE) and hormone levels or BIA values. However statistical differences ( $P=0.0298$ ) in the genotype distribution were observed for ACE I/D polymorphisms among athletes playing in different positions (Table II). Seven out of 8 players carrying the DD genotype play as a forward while the only players carrying the II genotype play back.

### Discussion

The goal of this study was to assess, in a selected group of rugby players, whether salivary levels of testosterone and cortisol could be provide precise and reliable measure of the physiological adaptation during a specific training program in order to avoid overtraining. For this purpose we used a simple, non-invasive and fast salivary hormone test. Hormone levels were measured at the beginning of the training program (T0) and in other four moments considered crucial for their relevance in the training program (T1, T2, T3, T4). Mean differences ( $\Delta$ ) in hormone levels were calculated for six different periods, critical for their link with specific aspects strictly related to the training program: T0-T1, T0-T2, T0-T3, T0-T4, T1-T3, T2-T4.

This study show that in the first period of pre-season (T0-T1) no significant changes were observed in the mean salivary levels of testosterone while levels of cortisol significantly decreased thus leading to a testosterone to cortisol ratio significantly increased. This first period corresponds to the first week of pre-season training which has the aim of inducing a general conditioning after the summer rest. Training in the first weeks prior to the start of a sport season is critical to an athlete's success. Besides the physical advantages an athlete will gain, a successful pre-season strength and conditioning program prevents short and long-term injury (<http://www.stopsportsinjuries.org/>). According to the fact that levels of cortisol are strictly related to physical stress,<sup>14</sup> from these results we argue that a significant decrease of cortisol in the first pre-season training program week could suggest a sort of anti-stress effect. This leads us to guess that a first week of mild intensity training, after a long rest, together with an appropriate life style (always

ACTN3. Per il polimorfismo ACE, 2 erano II, 6 erano ID e 8 erano DD.

Non abbiamo osservato nessuna correlazione statistica tra i polimorfismi genetici (ACTN3 e ACE) con i livelli ormonali o i valori BIA. Tuttavia, abbiamo osservato differenze statistiche ( $P=0,0298$ ) nella distribuzione del genotipo per i polimorfismi ACE I/D tra gli atleti in diversi ruoli tattici (Tabella II). Sette giocatori su 8, portatori del genotipo DD, erano attaccanti, mentre gli unici giocatori portatori del genotipo II erano difensori.

### Discussione

Obiettivo del presente studio è stato quello di valutare, in un gruppo selezionato di rugbisti, se i livelli di testosterone e cortisolo salivari possano fornire una misurazione precisa e affidabile dell'adattamento fisiologico durante un programma di allenamento specifico, al fine di evitare il sovrallenamento. A tale scopo, abbiamo utilizzato un semplice test, rapido e non invasivo, dei livelli ormonali salivari. I livelli ormonali sono stati misurati all'inizio del programma di allenamento (T0) e in altri quattro momenti considerati essenziali per la loro rilevanza all'interno del programma di allenamento (T1, T2, T3, T4). Le differenze medie ( $\Delta$ ) nei livelli ormonali sono state calcolate per sei diversi periodi, critici per il loro legame con aspetti specifici strettamente correlati al programma di allenamento: T0-T1, T0-T2, T0-T3, T0-T4, T1-T3, T2-T4.

Il presente studio ha mostrato che nel periodo iniziale di pre-campionato (T0-T1) non sono state osservate variazioni significative nei livelli medi di testosterone salivare, mentre i livelli di cortisolo sono diminuiti in maniera significativa, inducendo in tal modo un significativo aumento del rapporto testosterone-cortisolo. Questo periodo iniziale corrisponde alla prima settimana di allenamento pre-campionato, che ha lo scopo di indurre un condizionamento generale dopo il riposo estivo. L'allenamento nelle settimane che precedono l'inizio del campionato è fondamentale per il successo di un atleta. Oltre ai vantaggi fisici per l'atleta, un efficace programma pre-campionato per il condizionamento e la forza previene gli infortuni a breve e lungo termine (<http://www.stopsportsinjuries.org/>). Poiché i livelli di cortisolo sono strettamente associati allo stress fisico<sup>14</sup>, in base a tali risultati sosteniamo che una significativa riduzione del cortisolo nel primo programma di allenamento pre-campionato potrebbe suggerire una specie di effetto anti-stress. Questo ci porta a immaginare che una prima settimana di allenamento di moderata intensità, dopo un lungo periodo di riposo, unitamente a un ade-

required for high level athletes) might represent an appropriate starting point to positively affect athletes in sustaining the following weeks of heavy training load.

In the second period (T1-T2) no significant changes were observed in the mean salivary levels of testosterone and cortisol. However cortisol level was slightly increased in comparison to the level observed in the previous period T0-T1 thus leading to a decrease of testosterone to cortisol ratio. These data are in agreement with the fact that after a mild week of training (T0-T1), players, at the end of the T1-T2 period, have been exposed to an heavy load training with a consistent increase of psychophysical stress (as shown by the slight increase of cortisol level).

In the third period (T1-T3), even though the increase of testosterone level and the decrease of cortisol level were not statistically significant, the testosterone to cortisol ratio significantly increased. In this period we compare the status of rugby players after the first week of medium-low training with their status after 5 weeks of conditioning when players have reached a good adaptation to the training loads. According to these data we might interpret the increase of testosterone level as an appropriate answer of body to adaptation after repeated training stimuli aimed to the strength conditioning; on the other hand, the decrease of cortisol level could be considered as an expression of adaptation allowing players to develop low level of tiring and psychophysical stress and a better answer to training stimuli. The increase of testosterone to cortisol ratio might be interpreted as a good indicator of the ability of players to assimilate the training load.

In the following period (T2-T4) the hormone trends (*i.e.* the increase of testosterone, the decrease of cortisol and the increase of the testosterone to cortisol ratio) observed in the previous two periods were confirmed.

The increased testosterone to cortisol ratio is mainly due to the strong increase of testosterone rather than to the slight decrease of cortisol thus confirming a good physical adaptation leading to an increase in strength.

In the period (T0-T3) testosterone level was increased while cortisol level was significantly decreased so that the testosterone to cortisol ratio was significantly decreased. This period is the one where level of cortisol is the lowest suggesting a good physical condition with

*guato stile di vita (sempre necessario per gli atleti di alto livello) potrebbe rappresentare un punto di partenza appropriato per influenzare positivamente gli atleti nel sostenere le successive settimane di allenamento ad alta intensità.*

*Nel secondo periodo (T1-T2) non abbiamo osservato alcuna variazione nei livelli medi di testosterone e cortisolo salivari. Tuttavia, il livello di cortisolo è aumentato lievemente rispetto al livello osservato nel precedente periodo T0-T1, conducendo in tal modo a una riduzione del rapporto testosterone-cortisolo. Tali dati sono in linea col fatto che, dopo una settimana di allenamento moderato (T0-T1), al termine del periodo T1-T2, i giocatori sono stati esposti a un allenamento di elevata intensità con un notevole aumento dello stress psicofisico (come mostrato dal lieve aumento del livello di cortisolo).*

*Nel terzo periodo (T1-T3), anche se l'aumento del livello di testosterone e la diminuzione del livello di cortisolo non erano statisticamente significativi, il rapporto testosterone-cortisolo è aumentato in maniera significativa. In tale periodo abbiamo confrontato lo stato dei rugbisti dopo la prima settimana di allenamento a intensità medio-bassa con il loro stato dopo 5 settimane di condizionamento, quando i giocatori hanno raggiunto un buon adattamento ai carichi di lavoro. Secondo tali dati, potremmo interpretare l'aumento del livello di testosterone come una risposta adeguata del corpo all'adattamento dopo ripetuti stimoli di allenamento mirati al condizionamento della forza; d'altro canto, la diminuzione del livello di cortisolo potrebbe essere considerata un'espressione dell'adattamento che permette ai giocatori di sviluppare un basso livello di affaticamento, un basso stress psicofisico e una migliore risposta agli stimoli dell'allenamento. L'aumento del rapporto testosterone-cortisolo potrebbe essere interpretato come un buon indicatore dell'abilità dei giocatori di assimilare il carico di allenamento.*

*Nel successivo periodo (T2-T4) le tendenze ormonali (cioè l'aumento di testosterone, la diminuzione di cortisolo e l'aumento del rapporto testosterone-cortisolo) osservate nei due periodi precedenti sono state confermate.*

*L'aumento del rapporto testosterone-cortisolo è principalmente dovuto al significativo aumento del testosterone piuttosto che alla leggera diminuzione del cortisolo, confermando così un buon adattamento fisico che conduce a un aumento nella forza.*

*In tale periodo (T0-T3), il livello di testosterone è aumentato, mentre il livello di cortisolo è diminuito in maniera significativa, cosicché il rapporto testosterone-cortisolo è diminuito in maniera significativa. Tale periodo è quello in cui il livello di cortisolo è più basso, suggerendo una buona condizione*

a concomitant low tiring and psychophysical stress.

The last period (T0-T4) was characterized by a significant increase in testosterone level as well as a significant decrease in cortisol level with a consequent testosterone to cortisol ratio significantly increased. The high level of testosterone confirms the fact that an important physical adaptation occurred allowing the player to support high training load without a concomitant psychophysical stress (low cortisol level).

At the first glance dividing the training period in six mini cycles could be at least curious; however the availability of biochemical parameters frequently and in real time could represent an important tool for trainers. In fact, saliva testosterone and cortisol levels provide coaches, in a very short time, a scientific support to the fact that the training program thought for each athlete is providing the expected results without any risk that overreaching and overtraining are arising.

Monitoring the internal training load through immune-endocrine response by the salivary measurements of cortisol and testosterone appeared an effective tool to validate the specific training program administered to the rugby players enrolled in this study.

These measurements were effective, practical, noninvasive and stress-free and proved to be easy to apply during the pre-season and season training periods of a professional rugby team.

BIA values, measured before and after the conditioning training program, showed that PA as well as BCM were increased at the end of the training program thus reinforcing the accuracy of saliva hormone measures.

Rugby players are characterized by a strong muscular power, speed, agility and aerobic power.<sup>5</sup> Several athletic performances are differently expressed according to the different team position; backs usually perform a metabolic activity in comparison to forwards which are able to mostly perform high peaks of strength.<sup>15</sup>

Considering these differences between backs and forwards, we evaluated the relationship among the team position and the hormone levels as well as BIA values but no significant correlation were found. Concerning the different team position, our results provided a significant correlation between the different team position and genotype. In this study we considered the genetic polymorphisms of ACE and ACTN3

*fisica con un concomitante basso affaticamento e stress psicofisico.*

*L'ultimo periodo (T0-T4) era caratterizzato da un significativo aumento del livello di testosterone, oltre che da una significativa riduzione del livello di cortisolo, con un conseguente significativo aumento del rapporto testosterone-cortisolo. L'elevato livello di testosterone conferma il fatto che si è verificato un importante adattamento fisico, consentendo ai giocatori di sostenere un elevato carico di allenamento senza un concomitante stress psicofisico (basso livello di cortisolo).*

*A un primo sguardo, la suddivisione del periodo di allenamento in sei mini-cicli potrebbe sembrare alquanto inconsueta; tuttavia, la disponibilità di parametri biochimici in maniera frequente e in tempo reale potrebbe rappresentare un importante strumento per gli allenatori. Infatti, i livelli di testosterone e cortisolo salivari forniscono agli allenatori, in un lasso di tempo molto breve, un supporto scientifico al fatto che il programma di allenamento concepito per ciascun atleta sta fornendo i risultati attesi senza alcun rischio di sovraffaticamento e sovrallenamento.*

*Il monitoraggio del carico di allenamento interno attraverso la risposta immunoendocrina, con le misurazioni salivari di cortisolo e testosterone, si è dimostrato uno strumento efficace per convalidare il programma di allenamento specifico somministrato ai rugbisti reclutati nel presente studio.*

*Tali misurazioni sono efficaci, pratiche, non invasive, non comportano alcuno stress e si sono dimostrate facili da applicare durante i periodi di allenamento di pre-campionato e campionato in una squadra di rugby professionista.*

*I valori BIA, misurati prima e dopo il programma di allenamento di condizionamento, hanno mostrato che PA e BCM sono aumentati al termine del programma di allenamento, rafforzando così la precisione delle misurazioni ormonali salivari.*

*I rugbisti sono caratterizzati da una forte potenza muscolare, oltre che da velocità, agilità e potenza aerobica<sup>5</sup>. Numerose performance atletiche sono espresse in maniera diversa in base al diverso ruolo tattico sul terreno di gioco; i difensori generalmente svolgono un'attività metabolica rispetto agli attaccanti, che sono in grado di raggiungere soprattutto elevati picchi di forza<sup>15</sup>.*

*Tenendo in considerazione tali differenze tra difensori e attaccanti, abbiamo valutato la relazione tra il ruolo tattico e i livelli ormonali, oltre che i valori BIA, ma non abbiamo osservato correlazioni significative. Per quanto concerne il diverso ruolo tattico, i nostri risultati hanno mostrato una correlazione significativa tra il diverso ruolo tattico e il genotipo. Nel presente studio abbiamo valutato i*

gene. ACE gene, besides regulating blood pressure, is expressed in skeletal muscle where it influences its function and biomechanical properties. The ACE D allele would favor performance in power or strength-oriented versus more endurance exercise tasks. Indeed, the D allele has been associated with "sprint" athletic performance.<sup>16</sup> According to the literature, almost all of the forwards examined in this study are DD. This leads us to argue that having a DD genotype, most of the forwards are prone to strength performances. On the other hand, the II genotype mostly represented in the backs, correlates to resistance according to the fact that backs are characterized by high metabolic activity performances. Another strong candidate to influence muscle phenotype is the ACTN3 gene which encodes a  $\alpha$ -actinin-3 in skeletal muscle fibers, a protein necessary to produce fast and powerful contractions. However, from our data, no significant correlations were found between ACTN3 polymorphisms and hormone levels, BIA values or team position.

### Conclusions

From our study it emerged that the specific periodised preseason training program was effective in preparing the athletes for the beginning of the National Championship as showed by improvements in recovery-stress state and physical performance monitored by the variations of the salivary cortisol and testosterone levels and BIA values.

This study creates a solid basis for the use of saliva testosterone and cortisol levels to better monitor and customize season training program.

These measures represent a useful, effective, fast, noninvasive and stress-free tool to monitor, validate and set sport-specific conditioning training programs.

Our findings are supported by other previous studies confirming the relation between the adrenocortical response and intense physical exercise,<sup>9-12</sup> and suggest that such measures may be useful biological markers of training responses.

When used as part of a multi-factorial monitoring program (e.g., athletic performance tests, questionnaires, immune-endocrine responses, BIA values, genetic association studies, experienced observation of the trainers, etc.), monitoring the salivary testosterone and cortisol levels over the pre-season and the season training pe-

*polimorfismi genetici dei geni ACE e ACTN3. Il gene ACE, oltre a regolare la pressione arteriosa, è espresso nel muscolo scheletrico, del quale influenza la funzionalità e le proprietà biomeccaniche. L'allele D del gene ACE favorirebbe la performance negli esercizi fisici orientati alla potenza o alla forza rispetto a quelli orientati maggiormente alla resistenza. In effetti, l'allele D è stato associato con le performance atletiche della "corsa veloce"<sup>16</sup>. Secondo la letteratura, quasi tutti gli attaccanti esaminati in questo studio sono DD. Questo ci conduce a sostenere che, avendo un genotipo DD, la maggior parte degli attaccanti è predisposta a performance di forza. D'altro canto, il genotipo II è rappresentato soprattutto nei difensori ed è correlato alla resistenza, in base al fatto che i difensori sono caratterizzati da elevate performance di attività metabolica. Un altro forte candidato per influenzare il fenotipo muscolare è il gene ACTN3 che codifica una  $\alpha$ -actinina-3 nelle fibre muscolari scheletriche, una proteina necessaria a produrre contrazioni rapide e potenti. Tuttavia, dai nostri dati, non sono state osservate correlazioni significative tra i polimorfismi ACTN3 e i livelli ormonali, i valori BIA o il ruolo tattico.*

### Conclusioni

*Dal nostro studio è emerso che uno specifico programma periodizzato di allenamento pre-campionato è efficace nel preparare gli atleti per l'inizio del campionato nazionale, come mostrato dai miglioramenti nello stato di recupero-stress e dalla performance fisica monitorata dalle variazioni dei livelli di testosterone e cortisolo salivari e dai valori BIA.*

*Il presente studio crea solide fondamenta per l'utilizzo dei livelli di testosterone e cortisolo salivari al fine di monitorare e personalizzare meglio il programma di allenamento durante il campionato.*

*Tali misurazioni rappresentano uno strumento utile, efficace, rapido, non invasivo e privo di stress per monitorare, convalidare e configurare programmi di allenamento di condizionamento specifici per una disciplina sportiva.*

*I nostri risultati sono supportati da altri precedenti studi, a conferma della relazione tra la risposta corticosurrenale e l'esercizio fisico di elevata intensità<sup>9, 12</sup> e suggeriscono che tali misurazioni potrebbero essere utili marcatori biologici delle risposte all'allenamento.*

*Quando utilizzato come parte di un programma di monitoraggio multifattoriale (ad es. test di performance atletica, questionari, risposte immunoendocrine, valori BIA, studi di associazione genetica, osservazione competente da parte degli allenatori, ecc.), il monitoraggio dei livelli di testosterone e cortisolo salivari nel corso dei periodi di allenamento*

riods could represent an effective tool useful to assist coaches making decisions regarding how a group or individual is responding to the training.

Customized and well monitored training increases athletic performance, structural stability, strength expression and power projection, optimize the fitness components required for the competition season and, at the same time, reduces the risk of overtraining syndrome and injuries.

Even though the sample size was small and the multi-factorial components affecting the athletic performance and the hormonal response limit the possibilities to draw definite conclusions, this study suggest useful information and potential tool to improve the group and individual training and monitoring programs, and to prepare the athletes to high level competitions.

Additional cross-link studies on the appropriate management of external and internal training loads and multi-factorial monitoring programs during successive competitions and at different periods of the pre-season and playing season such as upcoming genetic association studies are other essential areas for future research.

#### References/Bibliografia

- 1) Duthie G, Pyne D, Hooper S. Applied physiology and game analysis of rugby union. *Sports Med* 2003;33:973-91.
- 2) Armstrong LE, VanHeest JL. The unknown mechanism of the overtraining syndrome: clues from depression and psychoneuroimmunology. *Sports Med* 2002;32:185-209.
- 3) Meeusen R, Nederhof E, Buysse L, Roelands B, de Schutter G, Piacentini MF. Diagnosing overtraining in athletes using the two-bout exercise protocol. *Br J Sports Med* 2010;44:642-8.
- 4) Haddad M, Chaouachi A, Castagna C, Wong DP, Behm DG, Chamari, K. The construct validity of session RPE during an intensive camp in young male Taekwondo athletes. *Int J Sports Physiol Perform* 2011;6:252-63.
- 5) Elloumi M, Makni E, Moalla W, Bouaziz T, Tabka Z, Lac G, et al. Monitoring training load and fatigue in rugby sevens players. *Asian J Sports Med* 2012;3:175-84.
- 6) – Maso F, Lac G, Filaire E, Michaux O, Robert A. Salivary testosterone and cortisol in rugby players: correlation with psychological overtraining items. *Br J Sports Med* 2004;38:260-3.
- 7) Grewther BT, Lowe TE, Ingram J, Weatherby RP. Validating the salivary testosterone and cortisol concentration measures in response to short high-intensity exercise. *J Sports Med Phys Fitness* 2010;50:85-92.
- 8) Elloumi M, Maso F, Michaux O, Robert A, Lac G. Behaviour of saliva cortisol [C], testosterone [T] and the T/C ratio during a rugby match and during the post-competition recovery days. *Eur J Appl Physiol* 2003;90:23-8.
- 9) Minetto M, Rainoldi A, Gazzoni M, Terzolo M, Borriero P, Termine A *et al.* Differential responses of serum and salivary interleukin-6 to acute strenuous exercise. *Eur J Appl Physiol* 2005;93:679-86.
- 10) Paccotti P, Minetto M, Terzolo M, Ventura M, Ganzi GP, Borriero P *et al.* Effects of high-intensity isokinetic exercise on salivary cortisol in athletes with different training schedules: relationships to serum cortisol and lactate. *Int J Sports Med* 2005;26:747-55.
- 11) Gomez RV, Moreira A, Lodo L, Nosaka K, Coutts AJ, Aoki MS. Monitoring training loads, stress, immune-endocrine responses and performance in tennis players. *Biol Sport* 2013;30:173-80.
- 12) Nunes JA, Moreira A, Grewther BT, Nosaka K, Viveiros L, Aoki MS. Monitoring training load, recovery-stress state, immune-endocrine responses and physical performance in elite female basketball players during a periodized training program. *J Strength Cond Res* 2014 [Epub ahead of print].
- 13) Papacosta E, Nassis GP. Saliva as a tool for monitoring steroid, peptide and immune markers in sport and exercise science. *J Sci Med Sport* 2011;14:424-34.
- 14) Gatti R, De Paolo EF. An update: salivary hormones and physical exercise. *Scand J Med Sci Sports* 2011;21:157-69.
- 15) Grewther BT, Kilduff LP, Cook CJ, Cunningham DJ, Bunce PJ, Bracken RM *et al.* Scaling strength and power for body mass differences in rugby union players. *J Sports Med Phys Fitness* 2012;52:27-32.
- 16) Rodríguez-Romo G, Ruiz JR, Santiago C, Fiuza-Luces C, González-Freire M, Gómez-Gallego F *et al.* Does the ACE I/D polymorphism, alone or in combination with the ACTN3 R577X polymorphism, influence muscle power phenotypes in young, non-athletic adults? *Eur J Appl Physiol* 2010;110:1099-106.

**Funding.**—This research was supported by the University of Florence, Italy.

**Acknowledgments.**—The authors would like to thank the Rugby Club I Cavalieri (Prato, Italy) for the facilitation and support provided.

**Conflicts of interest.**—The authors certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

Received on April 2, 2014. - Accepted for publication on July 23, 2014.

Corresponding author: G. Morucci, Anatomy and Histology Section, Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence, largo Brambilla 3, 50134 Florence, Italy. E-mail: gabriele.morucci@unifi.it