

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II – REVISÃO DE LITERATURA	3
1. <i>HORMONAS</i>	3
1.1 Cortisol.....	4
1.2 Testosterona.....	5
2. <i>COMPORTAMENTO DAS HORMONAS EM EXERCÍCIO GENÉRICO</i>	7
2.1 Cortisol e Exercício Físico	7
2.1.1 Efeitos agudos do cortisol em resposta ao exercício físico	8
2.1.2 Efeitos crônicos do cortisol em resposta ao exercício físico	10
2.2 Testosterona e Exercício Físico	10
2.2.1 Efeitos agudos do testosterona em resposta ao exercício físico	11
2.2.2 Efeitos crônicos da testosterona em resposta ao exercício físico	11
2.3 Racio Testosterona/Cortisol (T/C)	11
3. <i>VIAS ENERGÉTICAS</i>	12
3.1 Sistema Anaeróbio Aláctico.....	13
3.2 Sistema Anaeróbio Láctico	13
3.3 Sistema Aeróbio	14
4. <i>IMPORTÂNCIA DO CONSUMO MÁXIMO DE OXIGÊNIO (VO₂ MÁX)</i>	14
4.1 Teste de Luc-Léger.....	17
4.2 Avaliação do Potencial Aeróbio (VO ₂ MÁX) e do comportamento do cortisol	18
CAPÍTULO III - METODOLOGIA	21
1. <i>CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA</i>	21
2. <i>PROCEDIMENTOS NO TERRENO</i>	22
3. <i>PROCEDIMENTOS EM LABORATÓRIO</i>	22
3. 1 Análise das Salivas	23
3. 1.1 Determinação do Cortisol Salivar	23
3. 1.2 Determinação da Testosterona Salivar	24
4. <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	25
CAPÍTULO IV – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	27
1. <i>TESTE DE LUC-LÉGER</i>	27
2. <i>PARÂMETOS FISIOLÓGICOS</i>	28
3. <i>PARÂMETROS HORMONAIS</i>	28

3.1 ANÁLISE DESCRITIVA.....	28
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	35
<i>1. CONCLUSÕES</i>	35
<i>2. SUGESTÕES</i>	36
ANEXOS	45

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura II. 1** – Classificação das Hormonas.
- Figura II. 2** – Mecanismo para a regulação da secreção de glucocorticoides (*in* Guyton & Hall, 1997)
- Figura II. 3** – Padrão típico da concentração de cortisol durante um período de 24h (*in* Guyton & Hall, 1997).
- Figura II. 4** – Controlo da secreção da testosterona pelo hipotálamo e hipófise anterior (*in* Powers & Howley, 2001).
- Figura II. 5** – Controlo da secreção do cortisol (*in* Powers & Howley, 2001).
- Figura II. 6** – Variações na concentração plasmática do cortisol (*in* Wilmore & Costill, 1994)
- Figura II. 7** – VO₂máx ou consumo máximo de oxigénio em atletas e não atletas (*in* Powers & Howley, 2001).
- Figura II. 8** – Testes para a determinação do VO₂máx.
- Figura II. 9** – Variação da percentagem do cortisol plasmático com o aumento da intensidade do exercício. (*in* Powers & Howley, 2001)
- Figura III.1** – Grelha de poços.
- Figura III.2** – Placa de poços.
- Figura III.3** – Amostras de saliva.
- Figura III.4** – Lavagem dos poços.
- Figura III.5** – Colocação da tetrametilbezidina.
- Figura III.6** – Leitor de Elisa ELx 800.

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

- Quadro II. 1** – Sistemas de produção de ATP (Adaptado de Fox, 1996).
- Tabela IV. 1** – Mínimos, máximos, médias e desvios padrão dos dados recolhidos no teste Luc-Léger (nº de percursos, velocidade atingida e VO₂máx).
- Tabela IV. 2** - Mínimos, máximos, médias e desvios padrão dos parâmetros fisiológicos controlados (lactatos, frequência cardíaca, VO₂máx).

Tabela IV. 3 - Mínimos, máximos, médias e desvios padrão dos parâmetros hormonais controlados (concentrações salivares do cortisol (pg.ml^{-1}) obtidas nos diversos momentos).

Tabela IV. 4 - Mínimos, máximos, médias e desvios padrão dos parâmetros hormonais controlados (concentrações salivares da testosterona (pg.ml^{-1}) obtidas nos diversos momentos).

Tabela IV. 3 - Mínimos, máximos, médias e desvios padrão dos parâmetros hormonais controlados (concentrações salivares do rácio testosterona/cortisol (pg.ml^{-1}) obtidas nos diversos momentos).

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico IV. 1 – Variação da concentração salivar do cortisol nos diversos momentos do estudo.

Gráfico IV. 2 – Variação da concentração salivar da testosterona nos diversos momentos do estudo.

Gráfico IV. 3 – Variação da concentração salivar do rácio testosterona/cortisol nos diversos momentos do estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormona Adrenocorticotrofina

ADP – Ácido adenosico difosfórico

ATP – Adenosina Trifosfato

CRF – Hormona de Libertação da Corticotrofina

ELISA – Enzyme linked immuno-assay

FC – Frequência Cardíaca

IMC – Índice de Massa Corporal

GnRH – Hormona Libertadora da Gonadotrofina

LH – Hormona Luteínica

NPD – Natação Pura Desportiva

O₂ – Oxigénio

P - Fósforo

PC – Fosfocreatina

QR – Quociente Respiratório

T/C – Testosterona/Cortisol

VO₂ máx – Consumo máximo de Oxigénio

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – Tabela do Atleta para o Teste Luc-Léger

ANEXO 2 – Protocolo de Recolha das Amostras de Saliva

ANEXO 3 – Dados para a Caracterização da Amostra

ANEXO 4 – Resultados do Teste Luc-Léger

ANEXO 5 – Kit Salimetrics (USA) Cortisol

ANEXO 6 – Kit Salimetrics (USA) Testosterona

ANEXO 7 – Ficha de Registo de Placas - ELISA

ANEXO 8 – Ficha de Registo de Placas – ELISA, para concentração do Cortisol

ANEXO 9 – Ficha de Registo de Placas – ELISA, para concentração da Testosterona

ANEXO 10 – Tratamento Estatístico

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

As variações do comportamento hormonal do nosso organismo em resposta ao exercício físico, tem sido alvo permanente de investigação, com o propósito de compreender a influência da duração e da intensidade do mesmo nos parâmetros hormonais.

O presente estudo tem por objectivo analisar o comportamento de duas hormonas com um papel muito importante nos processos metabólicos do nosso organismo, o cortisol e a testosterona, antes e após um teste máximo, o Luc-Léger, num período de 24h. Estas hormonas têm sido consideradas como bons marcadores do stress derivado do treino e capazes de evidenciar o equilíbrio entre o anabolismo e o catabolismo.

O estudo iniciou-se através de uma breve revisão da literatura onde foram contextualizados os parâmetros essenciais ao desenvolvimento do mesmo numa perspectiva fisiológica, particularmente o comportamento das hormonas, e o exercício aeróbio, tendo sido esta informação retirada de alguns manuais de fisiologia geral e do exercício. Para complementar toda a informação recolhida, com o intuito de lhe oferecer o rigor científico, são também referidas publicações relativas a investigações realizadas nesta área, pesquisadas em várias fontes, como a Internet e bibliotecas. Devo referir que os trabalhos publicados nesta área são um pouco escassos, tendo sido dado por isso especial relevo a estudos de características gerais, como o comportamento do cortisol e de testosterona em exercício físico, e não em exercício aeróbio máximo como seria desejável.

O protocolo experimental que utilizamos utilizou uma amostra, composta por 12 atletas nadadores do sexo masculino. Na Metodologia são descritos os diversos procedimentos do estudo, relativamente à aplicação do teste Luc-Léger (procedimentos no terreno), e à análise das concentrações salivares de cortisol e de testosterona nos diversos momentos do estudo (procedimentos em laboratório). Como este estudo se trata de uma continuação de estudos efectuados em anos anteriores, os procedimentos no terreno foram realizados por colegas nossos, centrando-nos então por isso nos procedimentos laboratoriais. Para analisarmos o comportamento do cortisol e da

testosterona, foi escolhido como fluido corporal a saliva. Segundo Obminiski (1997), num estudo realizado com praticantes de karaté, os resultados obtidos a partir de amostras de saliva mostram-se mais fiáveis do que os resultados obtidos através de amostras de plasma sanguíneo. O mesmo pressuposto é corroborado por Chatard (2002), em relação ao cortisol.

Após a recolha dos dados, procedeu-se à apresentação e discussão dos mesmos. Para tal, recorreu-se à análise estatística descritiva (mínimos, máximos, médias e desvios padrão) e não paramétrica utilizando o Wilcoxon Test, uma vez que os parâmetros hormonais não apresentaram um padrão de normalidade.

Ao estudarmos o comportamento salivar das hormonas cortisol e testosterona em resposta ao Luc-Léger, constatámos que este influenciou os níveis dos parâmetros hormonais estudados. Após o exercício de elevada intensidade, a concentração salivar de cortisol aumentou de forma estatisticamente significativa, tal como a concentração salivar de testosterona. Como se tratam de duas importantes hormonas, uma anabólica e a outra catabólica, é importante que os treinadores tenham em conta os resultados obtidos neste estudo, de forma a perceber as consequências que um esforço desta magnitude provoca no organismo dos atletas.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

1.HORMONAS

As funções corporais são reguladas por dois sistemas principais de controlo, o *sistema nervoso* e o *sistema hormonal ou endócrino*. O sistema hormonal está envolvido sobretudo com o controlo das funções metabólicas corporais, controlando a velocidade das reacções químicas nas células, o transporte de substâncias através das membranas celulares ou outros aspectos do metabolismo celular, como o crescimento e a secreção.

Uma hormona é uma substância química produzida nos líquidos internos do corpo por uma célula ou um grupo de células e que exerce efeito fisiológico de controlo sobre outras células do corpo (Guyton & Hall, 1998).

As hormonas produzidas pelo nosso organismo podem ser agrupadas em três categorias: *catecolaminas* (adrenalina e noradrenalina), *polipéptidos e glicoproteínas*, e ainda *esteróides* (como o cortisol e testosterona).

As hormonas esteróides são segregadas pelo córtex adrenal, participando na regulação mineral e no equilíbrio energético, denominando-se assim de corticoesteróides. Estes agrupam-se ainda em três categorias funcionais: *mineralcorticoides* (que regulam o equilíbrio do potássio e do sódio), *glucocorticoides* (que regula o mecanismo da glicose e de outras moléculas orgânicas) e os *esteróides sexuais* (androgéneos, que suplementam as hormonas sexuais segregadas pelas gónadas) (Fox, 1996).

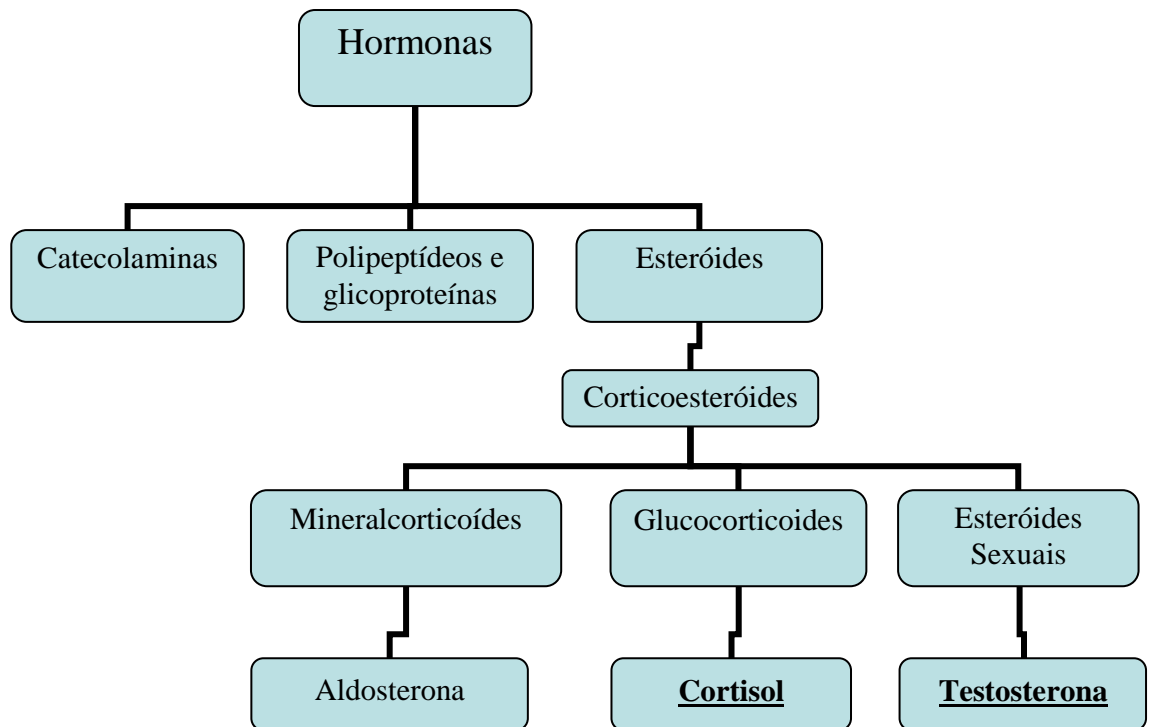


Figura II. 1 Classificação das hormonas

1.1 CORTISOL

O cortisol é responsável pelo menos 95% da actividade glucocorticoide, sendo o seu maior efeito sobre o metabolismo a estimulação da gliconeogénese (formação de hidratos de carbono a partir de proteínas e algumas substâncias) pelo fígado. Esta estimulação resulta devido a dois efeitos do cortisol: aumenta todas as enzimas necessárias à conversão de aminoácidos em glicose nas células hepáticas; e à mobilização de aminoácidos a partir dos tecidos extra-hepáticos, sobretudo do músculo. O cortisol causa ainda, uma diminuição moderada da taxa de utilização da glicose pelas células em todo o corpo.

A secreção de cortisol é controlada inteiramente pela hormona adrenocorticotrófica (ACTH) produzida pela hipófise anterior. Esta hormona, tal como muitas hormonas hipofisárias, é controlada pela hormona libertadora corticotrofina (CRF) produzida no hipotálamo. Quando a concentração de cortisol se torna demasiado alta, este tem efeito inibidor directo sobre o hipotálamo, para diminuir a formação de CRF, esta sobre a hipófise anterior, para diminuir a formação de ACTH.

A secreção dos glucocorticoides varia ao longo do dia (ritmo circadiano), sendo as taxas de secreção de cortisol, ACTH e CRF mais altas de manhã cedo e mais baixas à tarde e noite (variando entre 20ug/dl e 5 ug/dl). Este efeito resulta de uma alteração cíclica de 24h nos sinais a partir do hipotálamo que causam a secreção do cortisol. Sendo assim, as medidas dos níveis de cortisol sanguíneo, só são significativas quando expressas em termos do momento do ciclo em que foram tomadas (Guyton & Hall, 1997).

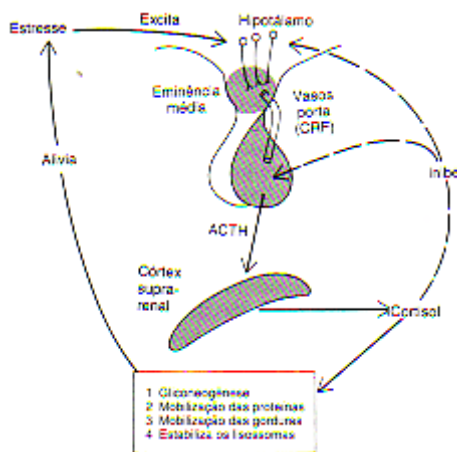


Figura II. 2 Mecanismo para a regulação da secreção de glucocorticoides (in Guyton & Hall, 1997).

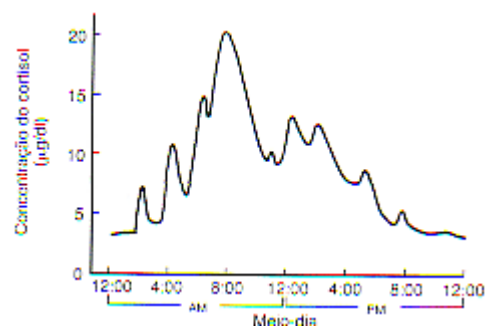


Figura II. 3 Padrão típico da concentração do cortisol durante um período de 24h (in Guyton & Hall, 1997).

1.2 TESTOSTERONA

Os testículos segregam várias hormonas sexuais masculinas, que são colectivamente denominadas de androgéneos. Entretanto, um deles, a *testosterona*, é tão mais abundante e potente que os outros que pode ser considerada como sendo a hormona significativa, responsável pelos efeitos hormonais masculinos.

A testosterona é produzida nos testículos, nas células intersticiais de Leydig, sendo responsável pelas características distintas do corpo masculino, logo desde o desenvolvimento fetal. Nesta altura, a testosterona é responsável pela formação do pénis, do escroto, da próstata, das vesículas seminais e dos vasos deferentes. Apesar desta hormona ser produzida durante o período do desenvolvimento fetal e durante dez

ou mais semanas após o nascimento, daí em diante, mais nenhuma testosterona é produzida durante a infância até à puberdade. Aí, a testosterona faz com que se desenvolvam os caracteres sexuais masculinos (como o crescimento dos pêlos, a transformação da voz, o desenvolvimento muscular e ósseo, etc). Assim sendo, a produção de testosterona aumenta rapidamente com o início da puberdade e perdura pela maior parte do resto da vida, diminuindo de modo acentuado depois dos 50 anos e chegando, talvez, a um terço do valor máximo por volta dos 80 anos.

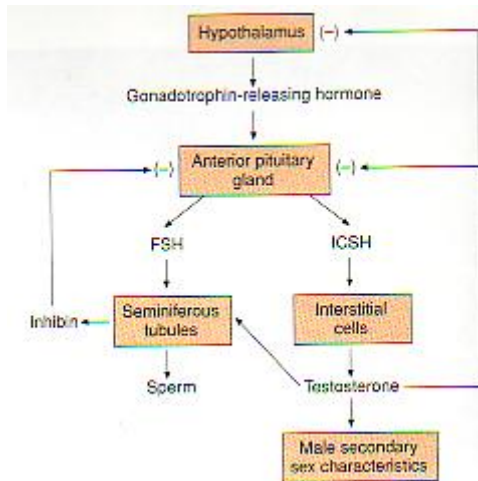


Figura II. 4 Controlo da secreção da testosterona pelo hipotálamo e hipófise anterior. (in Powers & Howley, 2001)

A produção de testosterona é estimulada pela hormona luteínica (LH), que é segregada pela hipófise anterior, que por sua vez é estimulada pela hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH) produzida no hipotálamo. A quantidade de testosterona segregada varia de modo aproximadamente proporcional à quantidade disponível de LH. Sempre que a produção de testosterona se torna demasiada, esta hormona causa um efeito inibidor directo sobre o hipotálamo, diminuindo a segregação de GnRH, decrescendo então a segregação de LH

pela hipófise anterior. O resultado deste processo tem como consequência a diminuição da produção de testosterona pelos testículos (Guyton & Hall, 1997).

A taxa de secreção diária de testosterona é de 4 a 9 mg em homens adultos, e pequenas quantidades desta hormona são também segregadas na mulher, tanto no ovário como nas supra-renais. A secreção de testosterona mantém um ritmo circadiano, sendo as concentrações médias da hormona menores pela manhã do que à tarde (Gallejo, 1992).

2.COMPORTAMENTO DAS HORMONAS EM EXERCÍCIO GENÉRICO

2.1 CORTISOL E EXERCÍCIO FÍSICO

O cortisol assume um importante papel durante o exercício físico, já que é responsável pela manutenção dos níveis de glicose no sangue, durante o exercício físico, e até mesmo durante o jejum prolongado, através de mecanismos variados: promove a inibição da síntese proteica, formando aminoácidos que serão usados pelo fígado para formar glicose; estimula a mobilização de ácidos gordos livres do tecido adiposo; estimula enzimas hepáticas envolvidas nas vias metabólicas, que levam à síntese de glicose; e por último, impede a entrada de glicose nos tecidos, para que sejam usados mais ácidos gordos para a produção de energia. (Powers & Howley, 2001)

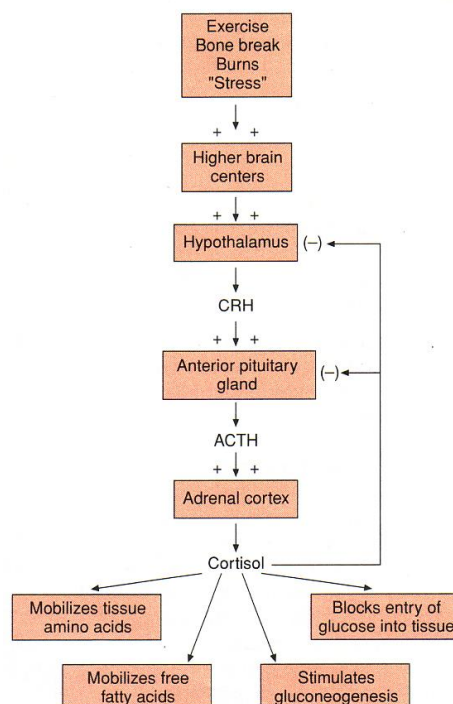


Figura II. 5 Controlo da secreção do cortisol.
(in Powers & Howley, 2001)

2.1.1 EFEITOS AGUDOS DO CORTISOL EM RESPOSTA AO EXERCÍCIO FÍSICO

Durante o exercício físico, as variações do cortisol são consequência de diversos efeitos, por vezes opostos, tais como o aumento da destruição periférica de cortisol, a diminuição da taxa de metabolização hepático ou do aumento da secreção de ACTH, derivadas na sua maioria da influência de mecanismos relacionados com o stress. Este quadro configura uma grande variabilidade na resposta do cortisol ao exercício físico.

Um aumento da secreção de cortisol é geralmente uma resposta ao stress. Por essa razão, em exercício moderado onde o stress não é alto, não são detectadas mudanças nos níveis de cortisol. Por outro lado, durante o exercício exaustivo, onde o stress é maximal, espera-se que os níveis de cortisol aumentem. (Fox's, 1996)

Se o exercício for leve ou moderado, os níveis de cortisol no sangue podem não se alterar ou ter um pequeno decréscimo (Fox's, 1996). O mesmo foi confirmado por Ramel et al (2003) que investigou os efeitos de um exercício de resistência nos parâmetros hormonais (cortisol e noradrenalina), em 17 participantes com idades médias compreendidas entre os 29 anos. Neste exercício, foram retiradas amostras de sangue antes, durante, imediatamente depois, 30 minutos, 1h, e 2h depois do fim do exercício. A resposta do cortisol ao exercício foi inconstante entre os participantes, porém, a concentração média do cortisol não foi significativamente afectada durante o exercício ou a recuperação, embora tenha sido observado um decréscimo ao longo de todos os momentos estudados.

No entanto, se o exercício for prolongado até à exaustão, verifica-se um aumento nos níveis de cortisol. (Fox's, 1996)

Durante o treino físico os níveis de cortisol aumentam e retornam aos seus valores de repouso mal acabe o exercício (Gallejo, 1992). Resultado oposto foi encontrado por Bonifazi et al (1994), ao investigar 8 nadadores em 3 sessões de treino ao longo de uma época, onde realizavam uma tarefa de 15x200m (com 20 segundos de intervalo), concluindo que as concentrações do cortisol aumentaram após o exercício, e seguidamente voltaram a diminuir durante a recuperação, porém, os valores mantiveram-se mais elevados do que aqueles registados no momento antes do exercício.

Segundo Wilmore & Costill (1994), os níveis plasmáticos de cortisol atingem o seu pico após 30 a 45 minutos de exercício, diminuindo depois para níveis normais. Lac (1997) confirmou o mesmo padrão num estudo com 9 estudantes de Educação Física (5 rapazes e 4 raparigas), com idades compreendida entre os 19 e os 23 anos e praticantes

de actividade física regular (6 a 12h por semana), concluindo que os níveis de cortisol salivar apresentam um aumento significativo a partir do começo de um exercício sub-máximo (70% do VO₂ máx), realizado num cicloergómetro com carga variável de modo a manter 80% da frequência cardíaca máxima. Os valores encontrados no momento pré-exercício não apresentaram diferenças significativas para os valores de referência (obtidos às 10h da manhã embora inferiores aos obtidos às 8h). Os níveis de cortisol apresentaram um aumento significativo a partir do começo do exercício e, ao contrário de tarefas onde a carga aplicada é constante, a concentração não aumentou, atingindo um platô, com concentrações duas vezes superiores às de referência. Imediatamente após o término do exercício, ocorreu um novo aumento significativo dos níveis de cortisol e passadas 1h30, os valores sofreram uma diminuição para os níveis de referência.

Esta tendência foi igualmente verificada por Hoogeveen (1996), ao estudar o comportamento do cortisol, em 10 ciclistas profissionais, antes e depois de um teste sub-máximo, confirmando um aumento nos níveis de cortisol. Pagano et al (2005), verificou um mecanismo semelhante ao investigar 10 jogadores de futsal, em 4 jogos de duração de 60 minutos, com 10 minutos de intervalo. Nesse estudo, as concentrações de cortisol salivar, na manhã seguinte ao jogo, encontram-se superiores às registadas na manhã da realização dos jogos.

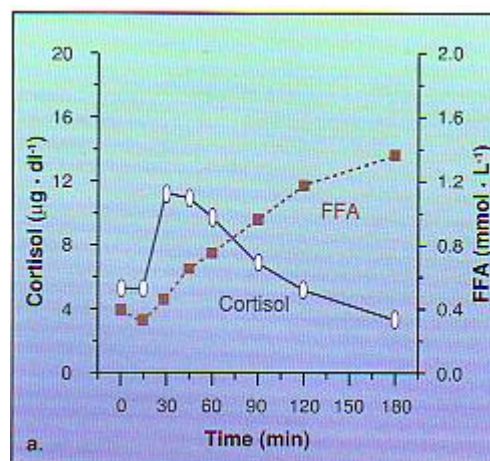


Figura II. 6 Variações na concentração plasmática de cortisol (*in* Wilmore & Costill, 1994).

2.1.2 EFEITOS CRÔNICOS DO CORTISOL EM RESPOSTA AO EXERCÍCIO FÍSICO

De acordo com Fox's (1996), o treino físico não aparenta provocar alterações no cortisol. As mudanças na secreção do cortisol com o exercício são presumivelmente estimuladas pelo aumento da libertação de ACTH.

No entanto, Chatard et al (2002) discorda, já que mediu as concentrações salivares de cortisol em 9 atletas de elite (4 mulheres e 5 homens), num período de 37 semanas e verificou que o cortisol aumenta para todo o grupo com o aumento da distância do nado acumulada. Bonifazi (2000) também discorda, pois ao realizar um estudo com nadadores de elite, num período de 2 anos concluiu que a concentração do cortisol plasmático no final de uma época era superior aos valores iniciais, alcançando valores máximos nas competições preparatórias e decrescendo antes das competições finais. Carli et al (1983) concorda com os autores referidos anteriormente, após ter investigado durante duas épocas consecutivas 8 nadadores, concluiu que a quantidade e o tipo de treino era responsável pelas respectivas variações hormonais.

2.2 TESTOSTERONA E EXERCÍCIO FÍSICO

Os níveis de testosterona variam em resposta ao exercício, dependendo a intensidade e da duração do mesmo. Em esforços submáximos (50 a 70% VO₂ máx) e máximos (que ultrapassam os 40 minutos), não se alteram os níveis de LH, no entanto os níveis de testosterona aumentam (Gallejo, 1992). O mesmo é confirmado por, Vogel (citado em Powers & Howley, 2001) verificando em exercício prolongado submáximo, que os níveis de testosterona plasmática aumentava de 10% para 37%; por Cumming et al. (citado por Powers & Howley, 2001) confirmando que o mesmo acontece em actividade física maximal; bem como Jensen, et al. (citado em Powers & Howley, 2001) ao concluir que os níveis de testosterona aumentam também durante o treino aeróbio ou de musculação.

Porém, existem estudos que discordam destes resultados, afirmando que os aumentos das concentrações de testosterona se devem à redução do volume plasmático ou à diminuição da velocidade de inactivação e remoção da testosterona (Terjung, citado em Powers & Howley, 2001)

2.2.1 EFEITOS AGUDOS DA TESTOSTERONA EM RESPOSTA AO EXERCÍCIO FÍSICO

Bonifazi et al (1994), ao investigar 8 nadadores em 3 sessões de treino ao longo de uma época, após realizarem uma tarefa de 15x200m (com 20 segundos de intervalo), verificou que os valores de testosterona aumentaram após a tarefa, mas voltaram a diminuir para concentrações iniciais após o período de recuperação (1hora).

Em exercícios que finalizam por esgotamento, a resposta inicial do aumento hormonal segue-se por um marcado decréscimo de testosterona. Estas variações, independentemente da LH, seguem mecanismos de regulação diferentes nas células testiculares de Leydig. É possível que durante os exercícios extenuantes, a redistribuição do fluxo sanguíneo afete o fluxo testicular, sendo responsável pela redução dos níveis plasmáticos da testosterona. A redistribuição sanguínea que se faz sentir durante o exercício condiciona um decréscimo no fluxo hepático e, em consequência, uma diminuição do metabolismo hepático de androgénios (Gallejo, 1992).

2.2.2 EFEITOS CRÓNICOS DA TESTOSTERONA EM RESPOSTA AO EXERCÍCIO FÍSICO

Num estudo efectuado com ciclistas, após 6 meses de treino e competições, os níveis de testosterona salivar apresentaram um decréscimo, porém, não significativo (Calbet, 1993).

Tem sido demonstrado que o exercício físico induz a alterações na concentração plasmática de testosterona, que estão relacionadas com a intensidade e duração específicas do exercício: durante a recuperação de exercícios longos e intensos, a concentração de testosterona decresce para valores abaixo dos basais (Hackney, 1996). O mesmo é confirmado por Carli et al (1983) em actividades desportivas de resistência.

2.3 RACIO TESTOSTERONA/CORTISOL (T/C)

A testosterona e o cortisol têm efeitos opostos no metabolismo muscular, na síntese proteica, e no crescimento, o que sugere que o rácio testosterona/cortisol livres no sangue poderá ser um indicador útil em relação ao equilíbrio das adaptações

positivas e negativas ao treino físico (Aldercfrenz et al 1986). Para Fry et al (1997) e Urhausen et al (1995), este equilíbrio é considerado como uma chave da recuperação física e das melhoras das performances. Banfi (1993) concorda com os autores pois, num estudo realizado com 8 patinadores de elite ao longo de uma época, verificou que a diminuição do rácio testosterona / cortisol na ordem dos 30% está relacionada com uma recuperação incompleta do exercício realizado.

Ainda Fry et al (1997) e Urhausen et al (1995) defendem que o comportamento do ratio T/C poderá ser considerado na prevenção e diagnóstico do “overtraining” (entendido como uma redução da capacidade de desempenho provocada por inadaptação ao aumento da carga de treino), no entanto Chatard (2004) discorda, justificando-se que esta é uma medida artificial, já que a testosterona não é a única hormona anabolizante com um papel importante.

Num estudo realizado com corredores fundistas e velocistas por Simões et al (2004) conclui-se que o rácio T/C é mais influenciado pelo volume de treino do que pela velocidade, e que a maior incidência da diminuição da razão T/C foi observada entre os corredores fundistas.

Calbet (1993) realizou um estudo com ciclistas, após 6 meses de treino e competições, e verificou que os valores do rácio T/C decresceram, mas não significativamente.

3. VIAS ENERGÉTICAS

Existem vários processos de obter energia para o exercício físico, porém, aquela que neste momento nos interessa, é fundamentalmente a transformação da energia química em mecânica de forma a ser utilizada pela fibra muscular esquelética. O ATP (ácido adenosico trifosfórico) existe no interior das fibras musculares, que ao dissociar-se em ADP (ácido adenosico difosfórico) + P (fósforo) liberta energia que se constitui como a fonte directa de energia utilizável para a contracção muscular. Sempre que a fibra muscular disponha de ATP, esta pode contrair-se, contudo, as reservas deste ácido ao nível do músculo são muito limitadas, o que determina a necessidade de se assegurar a ressíntese de ATP (Castelo, 1996).

O ser humano possui metabolismos encarregues de fornecer energia para a contracção muscular: i) anaeróbio aláctico, ii) anaeróbio láctico e, iii) aeróbio. Os dois

primeiros não requerem a presença do oxigénio, daí a serem considerados anaeróbios, e o último necessita da presença de oxigénio, e por isso é considerado aeróbio.

Segundo Maglischo (2003), os sistemas de fornecimento de energia não existem separadamente, e é o contributo de todas que permite a produção de energia para a resposta muscular.

3.1 SISTEMA ANAERÓBIO ALÁCTICO

As células musculares têm a capacidade de armazenar ATP, todavia, esta constitui-se como uma pequena reserva que se esgota rapidamente. Para além do ATP, a célula muscular também armazena um composto denominado de fosfocreatina (PC), cuja função principal é o de contribuir para regenerar o ATP e permitir, com efeito, a continuidade da contracção muscular. Este processo de produção de energia, embora muito potente, esgota-se rapidamente e só poderá ser utilizado durante 8 a 12 segundos. Neste contexto, quando um determinado exercício é caracterizado por uma intensidade máxima (98 a 100%) e de curta duração (não superior a 15 segundos), é este sistema energético que é preferencialmente utilizado.

Esta fonte energética é denominada de anaeróbia, porque não utiliza o oxigénio, e aláctica porque não há produção de ácido láctico (Castelo, 1996).

3.2 SISTEMA ANAERÓBIO LÁCTICO

Para além das reservas de ATP e CP, as células musculares contêm igualmente reservas de glicogénio, que têm por objectivo produzir energia para a ressíntese das reservas de ATP e CP. Neste contexto, quando o exercício é caracterizado por uma intensidade próximo do máximo (90 a 98%), e uma duração entre os 30 segundo e os 2 minutos, é este o sistema energético que é preferencialmente utilizado.

O factor limitativo na utilização deste sistema energético é a acumulação do ácido láctico, e a capacidade do praticante em lhe resistir, daí que, praticantes treinados poderão aumentar a duração do exercício, nas condições indicadas, para próximo de 3 minutos.

Este processo de produção de energia é denominado de anaeróbio láctico porque induz à produção e acumulação de ácido láctico (Castelo, 1996).

3.3 SISTEMA AERÓBIO

Este processo de produção de energia utiliza como substratos energéticos não só os glúcidos (glicose) como também os lípidos que se encontram armazenados. Quando o exercício é caracterizado por uma intensidade submáxima (60 a 70%) e uma longa duração, este é o sistema energético utilizado.

Em termos bioquímicos esta fonte é praticamente inesgotável, podendo ser utilizada sempre que exista oxigénio e substratos passíveis de oxidação. Nesse caso o factor limitativo para a utilização desta fonte energética, e consequente trabalho muscular, situa-se ao nível das grandes funções orgânicas, particularmente aquelas que condicionam o consumo de oxigénio (captação pelos pulmões, fixação pelos alvéolos/capilares, transporte pelo sistema cardiovascular, e utilização ao nível da célula muscular) (Castelo, 1996).

Quadro II. 1 Sistemas de produção de ATP (*Adaptado de Fox, 1996*)

Sistemas	Substratos energéticos	O ₂	Velocidade	Produção de ATP	Potência Máxima de ATP	Duração	Intensidade do exercício
Anaeróbio Aláctico	Fosfocreatina	Não	Imediata	Pouca Limitada	3,6 mol/min	Até 15''	98 a 100%
Anaeróbio Láctico	Glicogénio (glicose)	Não	Rápida	Pouca Limitada	1,6 mol/min	Entre 30'' a 2'	90 a 98%
Aeróbio	Glicogénio, Gorduras, Proteínas	Sim	Lenta	Muito Ilimitada	1,1 mol/min	A partir dos 2'	60 a 70%

4. IMPORTÂNCIA DO CONSUMO MÁXIMO DE OXIGÉNIO (VO₂ MÁX)

Tem sido constantemente demonstrado que a actividade física aeróbia, na sua relação com a condição cardiorespiratória, é um elemento chave para a condição física relacionada com a saúde em geral e com a saúde cardiovascular em particular (Power e col, 2001). A condição cardiorespiratória possui dois factores que se relacionam directamente com a saúde cardiovascular, um é o VO₂ max e o outro a capacidade de

realizar esforços submáximos prolongados. No entanto, só o $\dot{V}O_2$ max é considerado uma medida objectiva, sendo usado como referência critério, quase exclusiva, em estudos que impliquem exercício, aptidão física e saúde cardiovascular (Skinner e col., 1993).

O consumo máximo de oxigénio ($\dot{V}O_2$ máx) refere-se à quantidade máxima de oxigénio que uma pessoa consegue captar, transportar e utilizar durante um minuto de exercício. Isso acontece no decurso de um esforço de intensidade máxima com características gerais, isto é, quando o exercício solicita pelo menos dois terços da massa muscular total do sujeito. É normalmente expresso de acordo com o número de mililitros de oxigénio consumido por cada quilo de peso durante cada minuto do exercício ($\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). A quantidade de oxigénio utilizado pelos músculos em cada minuto é directamente relacionada com a intensidade do exercício até que seja atingido um patamar máximo. (Maglischo, 2003)

À medida que a intensidade do esforço aumenta, o consumo de oxigénio sobe paralelamente até um certo valor. Esse valor é possível calcular durante intervalos repetidos de exercício, onde a velocidade vai aumentando progressivamente até ao indivíduo atingir um “plateau”, ou seja, o aumento da velocidade não causa um aumento no consumo do oxigénio. Quando este “plateau” é alcançado, diz-se que o indivíduo atingiu a sua capacidade máxima de consumo de oxigénio. (Maglischo 2003).

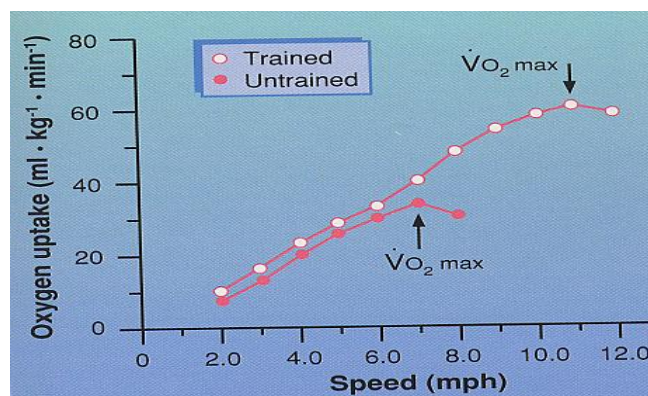


Figura II. 7 $\dot{V}O_2$ máx ou consumo máximo de oxigénio em atletas e não atletas. (in Wilmore & Costill, 1994)

Após atingirem o $\dot{V}O_2$ máx, os indivíduos continuam a aumentar a sua velocidade, devido ao contributo do seu sistema anaeróbio. Este metabolismo possibilita, por um curto período de tempo, que continue a ser fornecida energia aos

músculos, uma vez que o oxigénio disponível não é o bastante para metabolizar as substâncias químicas resultantes desse processo. (Maglischo 2003).

Em média, os valores relativos do $\text{VO}_2\text{máx}$ para mulheres e homens que não praticam actividade física são 40 e 46 $\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente. Van Handel et al (1988, citado por Maglischo 2003) testou o $\text{VO}_2\text{máx}$ de atletas nadadores femininos, onde registou os valores médios de 66 $\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, e masculinos que apresentaram valores médios de 80 $\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. O maior valor registado por atletas do sexo feminino e masculino foram, respectivamente, 74 e 94 $\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (Wilmore e Costill, 1988, citados em Maglischo, 2003).

Existem critérios normalmente utilizados para a garantia da obtenção do $\text{VO}_2\text{máx}$, sendo eles:

- Valor do consumo a partir do qual um aumento da intensidade do esforço provoca uma estabilização ou mesmo uma ligeira queda do consumo de oxigénio;
- Exaustão;
- Obtenção da frequência cardíaca máxima, determinada previamente;
- Quociente respiratório (QR) superior a 1;
- Lactatémia superior a 8 mmol/L (Adams, 2002).

O $\text{VO}_2\text{máx}$ pode ser medido de forma indirecta ou directa. Na medida directa são utilizadas provas máximas e a determinação do $\text{VO}_2\text{máx}$ faz-se directamente através da análise de gases expirados que pode funcionar em sistema aberto ou fechado. Estes métodos, embora desejáveis pelo rigor dos dados obtidos tornam-se impraticáveis quando se pretende avaliar amostras elevadas ou situações específicas de exercício. Assim, alguns investigadores desenvolveram metodologias para estimar o $\text{VO}_2\text{máx}$ de forma indirecta recorrendo a protocolos diversos (Luc Léger e outros). Estes métodos baseiam-se no facto de existir uma correlação directa e significativa entre o valor do $\text{VO}_2\text{máx}$ e a intensidade da carga.

Os testes de terreno são relativamente fáceis de serem aplicados e representam mais uma opção para estimar/controlar a condição funcional aeróbia de indivíduos saudáveis. Estes protocolos apresentam normalmente elevada correlação com resultados obtidos em laboratórios. Em geral, tais testes envolvem esforço de carácter máximo e como não são monitorizados durante a sua aplicação, devem ser preconizados para indivíduos sadios e jovens.

Entre os testes de terreno que se destinam para estimar o VO_2 máx, encontra-se o teste de Lúç-Léger. (Monteiro, Wallace & Farinatti, Paulo, 1992)

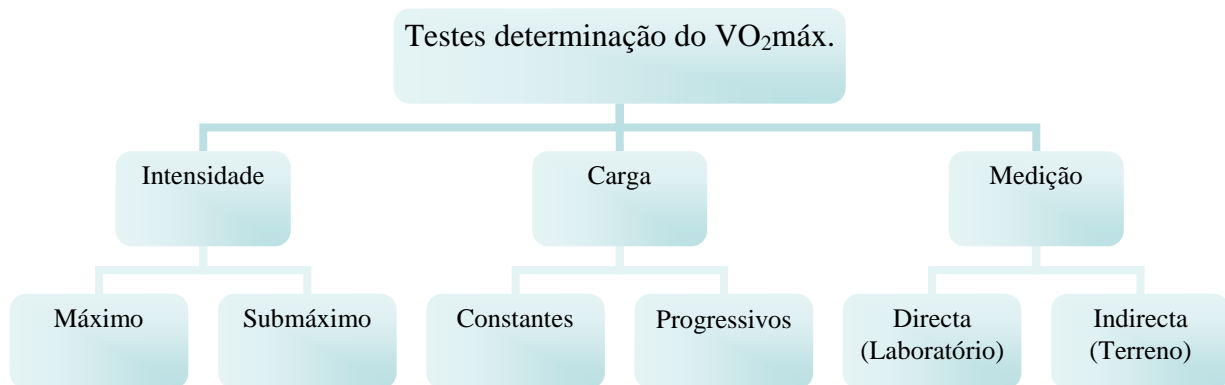


Figura II. 8 Testes para a determinação do VO_2 max.

4.1 TESTE DE LUC-LÉGER

O *Lúç-Léger* é caracterizado como um teste do tipo indirecto, máximo, contínuo, progressivo por patamares e sem intervalos, concebido por Luc Léger em 1980.

Este teste integra nalgumas baterias de testes de aptidão física, nomeadamente a EUROFIT (Conselho da Europa, Comité para o Desenvolvimento do Desporto, 1988) e a Prudential Fitnessgram USA (Cooper Institute for Aerobics Reseach, 1994), tendo sido alterado ao longo dos tempos, e tendo numerosas versões por todo o mundo.

As suas características tornam-no ideal para ser utilizado em meio escolar pois, entre outras vantagens, aplica-se num espaço reduzido (vinte e dois metros, onde vinte são para a realização da prova, e um metro de cada lado para as mudanças de direcção dos participantes), não necessita de aparelhagem sofisticada (apenas de uma cassette áudio gravada com "bips" que permitem a cadência do exercício) e permite testar vários sujeitos simultaneamente (sendo aconselhável que os mesmos estejam separados por cerca de um metro).

A tarefa a realizar consiste em correr, o máximo de tempo possível, em regime de vaivém, num corredor com o comprimento de vinte metros. O teste inicia-se com uma velocidade de 8,5 km/h, e é constituído por patamares de um minuto, com o

aumento da velocidade e conseqüentemente com o aumento do número de percursos em cada patamar. A velocidade é imposta por sinais sonoros, provenientes de um suporte áudio com o protocolo do teste. A chegada do sujeito, a um ou outro lado do corredor, deverá coincidir com o sinal sonoro. O intervalo entre sinais sonoros diminui a cada minuto que passa e o sujeito é obrigado a aumentar, ligeiramente, a velocidade (0,5 km/h por patamar) para continuar a chegar a tempo aos extremos do corredor. O teste termina com a desistência do sujeito ou com a sua incapacidade para seguir o ritmo imposto. No final do teste os participantes deverão realizar uma recuperação activa.

Em ficha própria, deve ser controlado e registado o número de percursos completos realizado por cada participante, excluindo o percurso no qual foi interrompido o teste. Depois de reunido o número de percursos realizado por cada sujeito, procede-se à determinação do patamar atingido por cada um deles e conseqüente cálculo da velocidade atingida usando a fórmula:

$$V_{atingida} = 8 + (0,5 \times P),$$

em que a velocidade é dada em km.h^{-1} e P corresponde ao patamar atingido. De seguida é efectuado o cálculo do VO_2 máx de cada indivíduo através da equação:

$$\text{VO}_2 \text{ máx (ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}) = 31,025 + (3,238 \times V_{atingida}) - (3,248 \times Idade) + 0,1536 (V_{atingida} \times Idade)$$

em que a velocidade é dada em km.h^{-1} e a idade em anos.

4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL AERÓBIO (VO_2 MÁX) E DO COMPORTAMENTO DO CORTISOL

Powers et Howley (2001), afirmam que quando a intensidade do exercício físico excede 60% do VO_2 máx a concentração do cortisol plasmático aumenta, e para valores inferiores a essa percentagem a concentração diminui. Esta situação ocorre porque durante o exercício físico de baixa intensidade o cortisol é removido mais rápido do que o córtex adrenal consegue secretá-lo, e em exercícios de elevada intensidade, a taxa de remoção do cortisol é inferior à taxa de secreção.

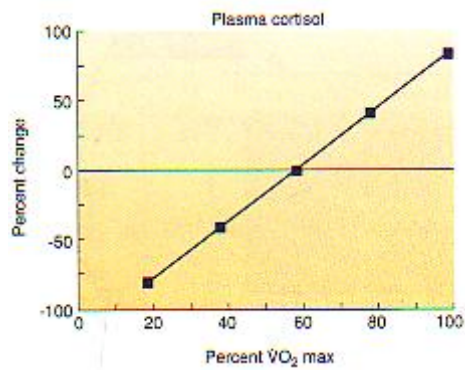


Figura II. 9 Variação da percentagem da concentração do cortisol plasmático com o aumento da intensidade do exercício.
(in Powers et Howley, 2001)

Davies & Few (1973) estudaram uns indivíduos que realizaram uma série de exercícios durante uma hora, onde as suas intensidades eram constantes e variavam entre 40 a 80% do VO₂máx. Os exercícios realizados a 40% do VO₂máx resultaram num decréscimo do cortisol plasmático com o passar do tempo, enquanto a resposta do cortisol foi consideravelmente elevada para exercícios a 80% do VO₂máx.

A premissa anterior é válida apenas em certos limites, já que Bonen (1976) mostrou que a excreção urinária de cortisol não se alterava para um exercício com intensidade de 76% do VO₂máx durante 10 minutos, mas no entanto, a mesma aumentou para o dobro quando a duração do exercício foi alargada para 30 minutos.

CAPÍTULO III

METODOLOGIA

Este capítulo procurará descrever todos os procedimentos que foram utilizados na realização deste estudo. Serão apresentados, a caracterização da amostra, os métodos e procedimentos do estudo.

1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para a realização deste estudo foi pedida a participação e colaboração de 12 atletas do sexo masculino, sendo todos eles praticantes de Natação Pura Desportiva (NDP) de elevado rendimento. A amostra é composta por indivíduos com uma média de idades igual a $17\pm 0,89$ anos, em que o mais novo tem 15 e o mais velho tem 18 anos. Estes indivíduos apresentam alguma experiência a nível competitivo, pois em média, têm $7\pm 1,16$ anos de treino ou a carga geral de treino corresponde a $1450\pm 51,47$ km.

Para a caracterizar a amostra, foram recolhidas medidas antropométricas, como a estatura, a altura sentado e a envergadura, e foram também medidas as pregas subcutâneas como indicadores da composição corporal.

Assim, os nadadores da nossa amostra apresentam uma massa corporal média de $66\pm 7,17$ Kg, uma estatura de $177\pm 7,17$ cm, uma altura sentado de $90\pm 3,20$ cm, e por fim, uma envergadura de $182\pm 8,54$ cm. Estes dados revelam-nos que os indivíduos apresentam médias ligeiramente inferiores aos nadadores portugueses de elite do sexo masculino (Rama, 1997).

No que diz respeito à composição corporal, obtida através do somatório das pregas subcutâneas, ($47,25\pm 10,36$ mm) conclui-se que a amostra é relativamente homogénea.

2. PROCEDIMENTOS NO TERRENO

Antes da realização do protocolo experimental, todos os elementos da amostra foram informados das implicações e dos procedimentos do estudo e deram o seu consentimento. Em caso de menoridade, o consentimento foi fornecido pelo encarregado de educação.

Cada indivíduo foi avaliado isoladamente e num único dia, entre as 18h e as 20h. Antes de iniciar o teste Luc-Léger, foi colocado no sujeito um cardio-frequencímetro POLAR[®] S810, para que no final do mesmo fosse possível registar a frequência cardíaca com maior precisão.

Foram recolhidas seis amostras de saliva em seis momentos diferentes. O primeiro momento precedeu o aquecimento, o segundo, terceiro e quarto momentos corresponderam, respectivamente, às recolhas efectuadas 15 minutos, 1h30min e a 2h30min após o teste. A quinta recolha foi realizada na manhã seguinte e a sexta e última recolha, 24h após a aplicação do teste. A saliva foi recolhida para uma salivete[™] (SARSTEDT[®], Portugal) que se trata de um tubo próprio para o efeito, com um rolo de algodão no seu interior, durante dois minutos. Para estas recolhas foram dadas algumas indicações aos atletas, de forma a controlar e limitar certos aspectos que interferissem com a recolha da saliva, para os resultados não fossem corrompidos (consultar protocolo em anexo).

Imediatamente após o término do teste foram também recolhidas micro amostras de sangue para a determinação dos níveis de lactato, que permitem qualificar as características do exercício realizado. O instrumento utilizado nesta recolha foi o Lactate Pro[®], que aspira automaticamente uma amostra de 5µl de sangue e no espaço de um minuto apresenta o valor da concentração de lactato sanguíneo.

3. PROCEDIMENTOS EM LABORATÓRIO

Esta fase do estudo foi concretizada no Laboratório de Biocinética da Faculdade Ciências do Desporto de Educação Física, e consistiu em analisar as salivas recolhidas da amostra, verificando os níveis de cortisol e de testosterona. O método utilizado foi ELISA competitivo (Salimetrics, USA).

3. 1 ANÁLISE DAS SALIVAS

Seguidamente serão apresentados por tópicos todos os passos que foram efectuados no laboratório de forma a analisar as salivas recolhidas dos indivíduos constituintes da amostra. Assim, teremos dois procedimentos distintos, o primeiro para analisar as concentrações do cortisol presentes na saliva da amostra, e o segundo para analisar as concentrações de testosterona salivar da amostra.

Porém, existem três passos que foram semelhantes em ambos os procedimentos. O primeiro passo consistiu em descongelar as amostras de saliva, seguidamente ordenavam-se as amostras e em último lugar, realizava-se a grelha de poços (Fig.1). Esta grelha era uma réplica da placa (Fig.2), e permitiu-nos um controlo sobre a localização das amostras e os momentos em que estas foram recolhidas. Assim, a grelha era constituída pelos standards, zeros, NSB (poços azuis que não continham anticorpos), 1 controlo H (concentração elevada) e um controlo L (concentração baixa), e por fim, as amostras correspondentes aos diferentes momentos.



Figura III. 1 Grelha dos poços



Figura III. 2 Placa dos poços

3. 1.1 DETERMINAÇÃO DO CORTISOL SALIVAR

1. Misturar as amostras, no *Minishaker Modelo MS 2 Ika*, na rotação máxima.
2. Centrifugar, durante 15 minutos, à temperatura de 4°C, a uma rotação de 3000rpm na *Labofuge 400 R Heraeus*.
3. Pipetar 25 microlitros de standards, zeros, e amostras para os poços.
4. Preparar 24 mililitros da solução diluente, juntamente com 15 microlitros de cortisol conjugado com enzima.

5. Colocar 200 microlitros da solução anterior em cada poço, com uma pipeta *Multichanel "Eppendorf Research"* com 8 pontas (tem capacidade de 30 a 300 microlitros), colocar no rotador durante 5 minutos (500rpm) e deixar incubar durante 55 minutos à temperatura ambiente.
6. Preparar a solução de lavagem, PSB (Wash Buffer Concentrate 10x, que contém albumina) + 1000ml de água pura.
7. Seguidamente batem-se os poços para retirar o líquido que têm em excesso e as bolhas de ar.
8. Lavar os poços 4 vezes, com a solução de lavagem preparada anteriormente.
9. Colocar-se nos poços 200 microlitros de substrato tetrametilbezidina, colocar no rotador durante 5 minutos (500rpm) e deixa-se repousar durante 25 minutos (sem apanhar luz, já que esta degrada o substrato e a quantidade diminui, logo já não reage tão bem com as amostras).
10. Após os 30 minutos, colocam-se 50 microlitros da STOP solution (10 minutos a dissolver em água ultra-pura) em cada poço.
11. Por último, coloca-se no aparelho *Leitor de Elisa ELx 800 (Universal Microplate Reader, Bio-tek instruments)* para obtermos a densidade óptica das amostras lidas.



Figura III. 3 Amostras de saliva



Figura III. 4 Lavagem dos poços

3. 1.2 DETERMINAÇÃO DA TESTOSTERONA SALIVAR

1. Realizar uma diluição em série (150 microlitros no 1º tubo, 100 microlitros no 2º, 100 microlitros no 3º tubo e assim sucessivamente).
2. Passar o standard pela salivete, deixar absorver e depois centrifugar durante 15 minutos na *Labofuge 400 R Heraeus*.
3. Pipetar 50 microlitros de standards e amostras para os poços.

4. Preparar 18 mililitros de solução diluente, juntamente com 7 microlitros de testosterona conjugados com enzima.
5. Colocar em cada poço 150 microlitros da solução conjugada anterior.
6. Deixar os poços repousar durante uma hora sobre o agitador de placas, a uma rotação de 500 por minuto.
7. Lavar os poços 4 vezes, com a solução de lavagem (50 mililitros de Wash Buffer Concentrate em 500 mililitros de água ultra-pura).
8. Coloca-se o substrato tetrametilbezidina nos poços, depois, durante 5 minutos coloca-se no agitador de placas, e posteriormente fica 25 minutos em repouso.
9. Após os 30 minutos, coloca-se 50 microlitros da STOP solution em cada poço.
10. Seguidamente torna a colocar-se, durante 3 minutos, no agitador de placas.
11. Por último, coloca-se no aparelho *Leitor de Elisa ELx 800 (Universal Microplate Reader, Bio-tek instruments)* para obtermos a densidade óptica das amostras lidas.

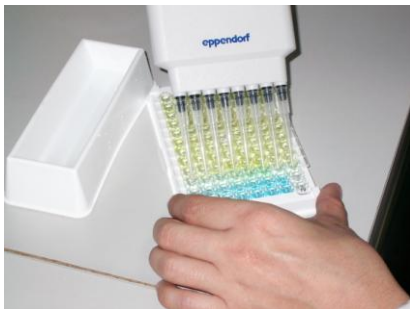


Figura III. 5 Colocação da tetrametilbezidina



Figura III. 6 Leitor de Elisa ELx 800

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa estatístico utilizado para o tratamento e análise dos dados recolhidos foi o “*Statistical Package for Social Sciences – SPSS*”, versão 12.0 para Windows.

Para a caracterização dos dados obtidos durante o teste, foi utilizada a estatística descritiva, onde foi usada a média aritmética, como medida de tendência central, e três medidas de dispersão (desvio padrão, mínimos e máximos).

Uma vez que se verificou que algumas das variáveis não respeitavam um padrão de normalidade na distribuição, padrão esse testado através do rácio, foi necessário

utilizar para a análise dos níveis de cortisol e testosterona, nos seis momentos, o Teste de Wilcoxon, um método estatístico Não-Paramétrico (Ntoumanis, 2001).

CAPÍTULO IV

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O presente capítulo irá conter a apresentação e discussão dos resultados consequentes da aplicação do teste de Luc-Léger, e da análise laboratorial das concentrações de cortisol e de testosterona presentes nas amostras da saliva, nos seis momentos que compõem o nosso estudo.

Os resultados serão apresentados por uma ordem sequencial, onde inicialmente serão apresentados os dados resultantes da aplicação do teste, em segundo lugar os parâmetros fisiológicos, e em último lugar os parâmetros hormonais (cortisol, testosterona e rácio testosterona/cortisol). Nestes últimos parâmetros serão efectuadas duas análises, a análise descritiva e inferencial, através do Wilcoxon Test, dos valores de cortisol, testosterona e do rácio testosterona/cortisol obtidos nos seis momentos.

1. TESTE DE LUC-LÉGER

Tabela IV. 1 Mínimos, máximos, médias e desvios padrão dos dados recolhidos no teste Luc-Léger (números de percursos, velocidade atingida e VO₂ máx).

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Número de Percursos	72	109	89,58	11,34
Velocidade (Km.h⁻¹)	12	14	13,08	0,56
VO₂máx (ml.kg⁻¹.min⁻¹)	48,35	56,99	52,33	2,84

Analisando os dados apresentados na tabela anterior, verificamos que o número médio de percursos efectuados pelos atletas da amostra foi $89,58 \pm 11,34$, atingindo uma velocidade média de $13,08 \pm 0,56$ Km.h⁻¹, a que corresponde um valor médio de VO₂máx estimado de $52,33 \pm 2,84$ ml.kg⁻¹.min⁻¹.

Os valores registados são superiores aos das pessoas que não praticam actividade física, no entanto são inferiores aos resultados alcançados por atletas nadadores (Van

Handel et al, 1988), que é o caso da nossa amostra. Esta situação poderá ocorrer porque estes atletas não foram testados no ambiente natural do seu treino nem no seu desporto, mas foram sim avaliados em terra com uma actividade diferente da sua.

2. PARÂMETOS FISIOLÓGICOS

Tabela IV. 2 Mínimos, máximos, médias e desvios padrão dos parâmetros fisiológicos controlados (lactatos, frequências cardíacas e VO₂ máx).

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Frequência Cardíaca (bpm)	182	207	196	7
Lactato (mmol. ⁻¹)	11	20,70	14,34	3,01

Consultando a tabela IV.2, onde se encontram registados os parâmetros fisiológicos, averiguamos que a frequência cardíaca atingida pelos indivíduos, registada através de um cardio-frequencímetro, logo após o término do teste foi em média de 196±7 bpm.

Relativamente ao lactato, que também foi medido imediatamente após o esforço, os atletas apresentam os seguintes valores: mínimo e máximo de 11 e 20,7 mmol.⁻¹, respectivamente, e médio de 14,34±3,01 mmol.⁻¹. Segundo Adams (2002), o VO₂ máx, terá sido atingido pois os resultados de lactatemia obtidos pela nossa amostra são superiores a 8 mmol.⁻¹.

O VO₂máx atinge-se com a frequência cardíaca máxima e a lactatemia pressupõe a entrada no aporte glicolítico. Isto quer dizer que, tendo em conta a duração do esforço, o VO₂máx terá sido atingido.

3. PARÂMETROS HORMONAIS

3.1 ANÁLISE DESCRITIVA

A tabela IV.3 exposta seguidamente, indica-nos as diversas concentrações de cortisol obtidas nos diferentes momentos do estudo, antes do exercício, 15 minutos após

o exercício, 1h30 após, 2h30 após, na manhã seguinte ao levantar e, finalmente, 24h após o esforço.

Tabela IV. 3 Mínimos, máximos, médias e desvios padrão dos parâmetros hormonais controlados (Concentrações salivares do **cortisol** (pg.ml^{-1}) obtidas nos diversos momentos).

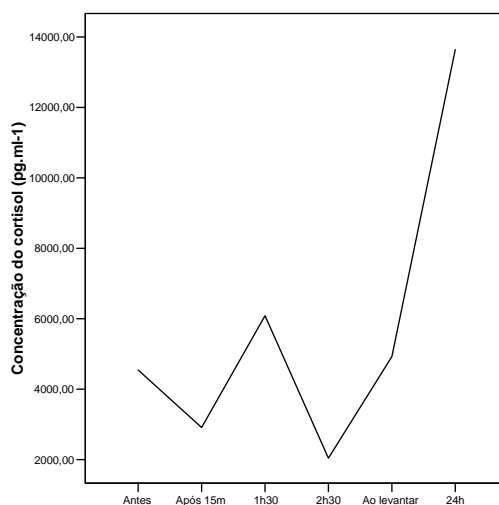
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Antes	516,57	26439,76	4271,03	7576,45
15' após	415,70	26439,76	4690,14	7320,44
1h30 após	508,80	17384,20	5884,85	5413,51
2h30 após	227,87	5303,50	2476,01	1822,70
Ao levantar	100,52	23658,62	4217,64	7449,03
24h após	1763,07	55281,87	12344,21	15460,86

O maior pico da concentração salivar de cortisol foi registado 24 horas depois da aplicação do teste Luc-Léger, com uma média de $12344,21 \pm 15460,86 \text{ pg.ml}^{-1}$. Posteriormente, foram assinalados os seguintes valores mais elevados, $5884,85 \pm 5413,51 \text{ pg.ml}^{-1}$, alcançado 1h30 minutos após o teste; e $4690,14 \pm 7320,44 \text{ pg.ml}^{-1}$ atingido logo após 15 minutos de ter terminado o exercício.

Confrontando os valores obtidos na primeira recolha de saliva, que antecedeu o teste, com os valores obtidos nos restantes momentos (após teste), constata-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre o primeiro momento e o último (24h depois da aplicação do teste), já que $Z = -1,956$; $p < .05$. Assim, a concentração média de cortisol salivar, 24h depois apresentou um aumento para o triplo em relação ao valor inicial. Este aspecto vai ao encontro do apresentado por Pagano et al (2005) embora, com maior expressão no nosso estudo.

Analisando os valores mínimos e máximos da concentração de cortisol, verificamos que existe uma grande dispersão de resultados entre os diferentes indivíduos constituintes da amostra. Visto isto, é necessário efectuar uma análise dos dados cuidada e ponderada.

Seguidamente será apresentado o gráfico da variação da concentração do cortisol no seis momentos descritos anteriormente, afim de melhor apreciar as oscilações desta hormona.

Gráfico IV. 1 Variação da concentração salivar do cortisol nos diversos momentos do estudo.

Examinando o gráfico apresentado, apuramos que imediatamente após a aplicação do teste se verifica um decréscimo na concentração salivar de cortisol. Tal facto foi contrariado por Ramel et al (2003) e Lac (1997), que verificaram um aumento dos valores imediatamente após o exercício.

Uma hora em meia depois do esforço, os níveis de cortisol aumentam um pouco para além daqueles que foram registados inicialmente. Posteriormente, passadas 2h30m, a concentração de cortisol sofre um decréscimo até um valor nunca antes registado. Na manhã seguinte, ao levantar, são retomadas as concentrações de cortisol salivar, semelhantes às assinaladas ao momento antecedente à aplicação do teste.

Por fim, e decorridas 24h, a concentração salivar de cortisol atinge o seu máximo, registando valores três vezes superiores aos iniciais, revelando-nos que se tratou de um teste exaustivo, onde o stress foi maximal (Fox's 1996). Assim sendo, as concentrações salivares do cortisol aumentaram após a aplicação do teste, padrão corroborado em estudos realizados por Bonifazi et al (1994), Hoogeveen (1996), Pagano (2005), Power et Howley (2001), e por Davies et Few (1973).

Estes resultados sugerem que 24h após a aplicação do Luc-Léger, o organismo continua a mobilizar os ácidos gordos livres do tecido adiposo e os aminoácidos para a produção de energia (fontes alternativas), já que o glicogénio muscular foi praticamente todo degradado devido à intensidade e duração do exercício físico. Nestas situações, há que ter em atenção à recuperação dos atletas, pois a estabilização do glicogénio

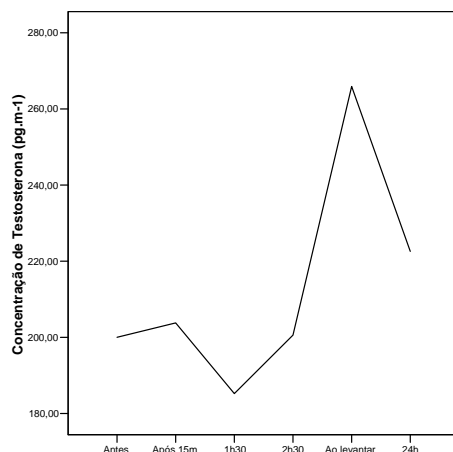
muscular só ocorrerá dentro de dias, e para tal é necessário que o atleta faça uma dieta rica em hidratos de carbono para que o processo seja mais rápido. Durante este período, é extremamente importante que o treinador tenha atenção e cuidado com as cargas de treino que aplica aos seus atletas, já que eles se apresentam com um deficit de reservas energéticas, não devendo participar em outros exercícios exaustivos.

Tabela IV. 4 Mínimos, máximos, médias e desvios padrão dos parâmetros hormonais controlados (Concentrações salivares da **testosterona** (pg.ml^{-1}) obtidas nos diversos momentos do estudo).

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Antes	139,04	263,52	195,92	40,83
15' após	158,00	312,51	216,81	46,02
1h30 após	149,98	231,89	183,66	25,83
2h30 após	87,41	314,00	189,06	63,73
Ao levantar	190,96	341,94	267,76	40,18
24h após	156,51	277,62	222,07	39,95

Ao observarmos a tabela IV.4 apuramos que as concentrações salivar mais elevadas de testosterona se verificam na manhã do dia seguinte, apresentando valores médios de $267,76 \pm 40,18 \text{ pg.ml}^{-1}$; 24h depois da aplicação do teste de Luc-Léger, registando valores médios de $222,07 \pm 39,95 \text{ pg.ml}^{-1}$; e ainda após terem decorridos 15 minutos desde o término do exercício físico, com valores médios de $216,81 \pm 46,02 \text{ pg.ml}^{-1}$. Os valores mais baixos foram encontrados 1h30 e 2h30 após o teste, com valores médios para a concentração salivar de testosterona compreendidos entre $183,66 \pm 25,83 \text{ pg.ml}^{-1}$ e $189,06 \pm 63,73 \text{ pg.ml}^{-1}$, respectivamente.

Confrontando os valores obtidos na primeira recolha de saliva, que antecedeu o teste, com os valores obtidos nos restantes momentos (após teste), constata-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre o primeiro momento e o penúltimo (ao levantar), já que $Z = -2,667$; $p < .05$; e entre as 2h30 após o exercício e no dia seguinte ao levantar ($Z = -2,589$; $p < .05$).

Gráfico IV. 2 Variação da concentração salivar de testosterona nos diversos momentos do estudo.

O gráfico IV.2 mostra as variações da concentração salivar de testosterona nos diversos momentos deste estudo.

Assim, constatamos que após 15 minutos da aplicação do teste a concentração de testosterona aumenta ligeiramente em relação à concentração registada antes do teste. Decorrida 1h30 após o esforço, os níveis de testosterona salivar diminuem para valores médios não antes registados. Estas variações são também constatadas por Gallejo (1992).

Duas horas e meia depois, os valores voltam a sofrer um aumento para concentrações semelhantes às apresentadas antes do teste. Na manhã seguinte, ao levantar, a concentração salivar de testosterona atinge o seu auge, alcançando desta vez, os maiores valores médios registados, o que contraria Gallejo (2002), que diz que os valores mais altos de testosterona se apresentam no período da tarde.

Vinte e quatro horas após a aplicação do teste, verifica-se novamente um decréscimo na concentração média, porém, com valores superiores aos registados antes do esforço. Este padrão, o decréscimo dos níveis de testosterona, ocorreu também num estudo levado a cabo por Bonifazi (1994), no entanto, para ele os valores da concentração de testosterona decresceram para os níveis de referência após uma hora de recuperação, o que não ocorreu no nosso estudo.

Os resultados obtidos no nosso estudo, nomeadamente o aumento da concentração de testosterona após o exercício físico, vão de encontro aos resultados apresentados por Vogel (citado por Powers e Howley, 2001), Cumming et al (citado por Powers e Howley, 2001), Jensen et al. (citado por Powers e Howley, 2001) para exercícios submáximos e máximos, e aeróbios, respectivamente. Terjung (citado por Powers e Howley, 2001), discorda destes resultados, afirmando que o aumento da

concentração de testosterona se deve à redução do volume plasmático ou à diminuição da velocidade de inativação e remoção da testosterona, no entanto, como o nosso estudo não se encontra sujeito às variações do volume plasmático, já que o fluido corporal utilizado por nós foi a saliva, estas ideias vão um pouco contra o nosso estudo.

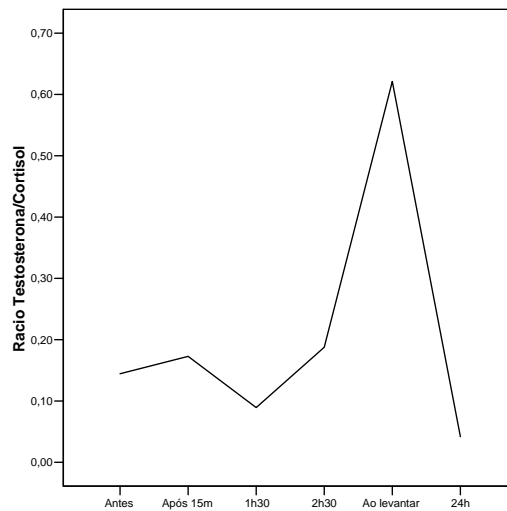
Tabela IV. 5 Mínimos, máximos, médias e desvios padrão dos parâmetros hormonais controlados (Rácio testosterona/cortisol obtido nos diversos momentos do estudo).

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Rácio antes	0,01	0,31	0,14	0,10
Rácio 15' após	0,01	0,60	0,18	0,18
Rácio 1h30 após	0,01	0,29	0,09	0,10
Rácio 2h30 após	0,02	0,59	0,16	0,16
Rácio ao levantar	0,01	2,80	0,59	0,80
Rácio 24h após	0,00	0,13	0,04	0,04

Verificando os valores apresentados na tabela anterior, apuramos que a razão entre as hormonas testosterona e cortisol é superior na manhã seguinte após a aplicação do teste, com um valor médio de $0,59 \pm 0,80$. Os valores médios do rácio, seguidamente mais elevados, registaram-se após 15 minutos do término do esforço, $0,18 \pm 0,18$, e 2h30 depois, com um valor médio de $0,16 \pm 0,16$.

O mais baixo valor do rácio testosterona/cortisol foi registado 24h após a aplicação do teste Lúç-Léger, com uma média de $0,04 \pm 0,04$.

Gráfico IV. 3 Variação da concentração salivar do rácio testosterona/cortisol nos diversos momentos do estudo.



Através da análise do gráfico do rácio testosterona/cortisol verificamos que imediatamente após o término do exercício físico, os valores do rácio aumentaram ligeiramente, mas voltaram a decrescer passadas 1h30. Duas horas e meia depois, o rácio T/C voltou a aumentar para níveis semelhantes aos registados imediatamente após o exercício, e ao levantar, esse acréscimo triplicou. Porém, 24h depois notou-se um decréscimo estatisticamente significativo ($Z = -2,667$; $p < .05$) no rácio T/C, tal como observou Simões (2004), e Calbet (1993), apesar de no estudo deste último autor o decréscimo das concentrações não ter sido significativo.

Estes resultados sugerem que os processos anabólicos são, nessa altura, muito superiores aos catabólicos, e que através do comportamento destas hormonas, este tipo de exercício, exaustivo e máximo, provoca alterações no organismo que requerem mais do que 24h para normalizar as concentrações, voltando aos valores de referência.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Este último capítulo fará referência a todas as conclusões retiradas do nosso estudo, conseqüentes da análise dos resultados obtidos, e às sugestões que poderão ser relevantes para eventuais estudos que possam surgir nesta área.

1. CONCLUSÕES

Analisando a resposta do cortisol ao Luc-Léger, verificamos que as concentrações diminuíram imediatamente após o exercício. Porém, passadas 1h30m, os níveis salivares de cortisol voltaram a aumentar um pouco para além das concentrações de referência antes do exercício. No momento seguinte, 2h30m a seguir à aplicação do teste, as concentrações de cortisol sofreram um novo decréscimo, desta vez para valores não registados até então. No dia seguinte, pela manhã ao levantar, os atletas apresentaram valores semelhantes aos de referência. Todavia, 24h depois, registou-se o pico da concentração de cortisol verificado no nosso estudo, apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação ao momento pré-exercício. Assim sendo, a concentração do cortisol, em resposta ao exercício máximo, sofre alterações estatisticamente significativas, que se prolongam para além de 24 horas.

No que diz respeito à concentração salivar de testosterona, pode se dizer que sofreu um ligeiro incremento, imediatamente após o exercício. No momento seguinte, 1h30m depois, os valores diminuíram para registos nunca antes alcançados. Seguidamente, e após 2h30m de ter terminado o esforço, as concentrações de testosterona voltaram a subir para próximo dos valores de referência. Na manhã seguinte à da aplicação do teste, os níveis de testosterona sofreram um aumento estatisticamente significativo, quer em relação ao momento pré-exercício, quer em relação ao momento anterior. Na última recolha, 24h depois do final do teste, os valores diminuíram, não significativamente, porém, a concentração de testosterona manteve-se mais elevada que no momento pré-exercício. Podemos constatar um aumento significativo da concentração da testosterona, após a aplicação do teste Luc-Léger.

Relativamente à razão entre a testosterona e o cortisol, verifica-se um ligeiro acréscimo nos valores médios, do momento pré-exercício para o momento imediatamente após o término do teste. Seguidamente, as concentrações sofreram ligeiras oscilações, diminuindo e aumentando, 1h30m e 2h30m após o teste, respectivamente. No entanto, na manhã seguinte, os valores do rácio atingiram um pico, apesar de não ser um incremento estatisticamente significativo em relação ao momento do pré-exercício. Vinte e quatro horas depois de ter sido aplicado o teste, os valores do rácio diminuíram significativamente para registos ainda não alcançados.

Pelo comportamento destes indicadores hormonais concluímos que um exercício com as características do teste Luc Léger provoca alterações no organismo que requerem mais do que 24 horas para normalizar os valores anteriores. Assim, o conhecimento destes resultados pode ser considerado pelos treinadores para melhor planificarem as cargas de treino que aplicam aos seus atletas, após um exercício de tal magnitude.

2. SUGESTÕES

Com a intenção de dar algum contributo para futuros estudos e investigações, de modo a aprofundar o conhecimento dos efeitos do exercício físico sobre o parâmetro hormonal, serão apresentadas de seguida algumas recomendações:

- Alargar o número de elementos da amostra e utilizar indivíduos do sexo feminino;
- Utilizar um grupo de controlo, que não pratique actividade física regular, para se proceder a eventuais comparações entre os grupos;
- Recolher amostras de saliva em vários momentos do dia seguinte ao da aplicação do teste, para verificar quando os níveis de cortisol e testosterona se restabelecem;
- Realizar um controlo da dieta e do possível uso de fármacos;
- Avaliar a qualidade do sono dos indivíduos da amostra.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFIA

Adams, G. (2002). *Exercise Physiology* (4th Ed). Mcgraw Hill.

Banfi, G., Marinelli, M., Roi, G., Agape, V., (1993). Usefulness of free testosterone/cortisol ratio during a season of elite speed skating athletes. *International Journal of Sports Medicine*. **14**: 373 – 379.

Bonen, A. (1976). Effects of exercise on excretion rates of urinary free cortisol. *Journal of Applied Physiology* **40**: 155-158

Bonifazi, M (1994) Influence of training on the response to exercise of adrenocorticotropin and growth hormone plasma concentrations in human swimmers. *European Journal Applied. Physiology* (1998) **78**: 394-397

Bonifazi, M (1995) Influence of training on the response of androgen plasma concentrations to exercise in swimmers. *European Journal Applied Physiology* **70**: 109-114

Bonifazi, M., Sardella, F., Concetta, L. (2000). Preparatory versus main competitions : differences in performances, lactate responses and pre-competition plasma cortisol concentrations in elite male swimmers. *European Journal Applied Physiology* **82** : 368-373

Calbet, J, M. A Navarro, J.R. Barbany, J. Garcia Manso, M.R. Bonnin, J. Valero (1993) Salivary Steroid Changes and Physical Performance in Highly Trained Cyclists. *International Journal of Sports Medicine*. **14**: 111 – 117.

Carli, G., Marteli, G., Viti, A., Baldi, L., Bonifazi, M., Concetta, L., (1983). Modulation of hormone levels in male swimmers during training. *In Hollander, Ap., Huijing PA., Gert de Groot, Biomechanics and Medicine in Swimming. International Series on Sport Sciences Vol 14, Human Kinetics.*

Carzola, Georges (Fevrier 1993), *Testes Spécifiques d'Evaluation du Nageur*, Federation Francaise de Natation.

Castelo, J., (1996) *Metodologia do Treino Desportivo*. Edições FMH, Universidade Técnica de Lisboa.

Chatard, J. C., Atlaoui, D., Lac, G., Duclos, M., Hooper, S. E Mackinnon, L. (2002). Cortisol, DHEA, Performance an Training in Elite Swimmers. *International Journal of Sports Medicine*. **23**: 510 – 515.

Chatard, J., M. Duclos (2004) Le suivi hormonal des sportifs. *Faculté de Médecine, St-Étienne*.

Davies, C.T.M., and J. D. Few 1973 Effects of exercise on adrenocortical function. *Journal of Applied Physiology* **35**: 887-891

Farinatti, Paulo & Monteiro, Wallace (1992), *Fisiologia e Avaliação Funcional*. Editora Sprint Ltda.

Foss, Merle e Keteyian, Steven (1998) *Fox's Physiological Basic for Exercise and Sport (6ª Ed)*. McGraw-Hill.

Fox's (1996) *Human Physiology (5ª Ed)*. Boston: Wm.C. Brown Publishers

Fry, A. C. e Kraemer, J. (1997). Resistance Exercise Overtraining and Overreaching. *Sports Medicine*. **23** (2): 106 – 129.

Gallego, Javier Jusalez (1992), *Fisiologia de la Actividad Física y del Deporte. (1ª Ed)* McGraw-Hill-Interamericana de España.

Guyton & Hall (1998), *Human Physiology and Mechanisms of Disease (6ª Ed)*. Editora Guanabara Koogan S.A..

Hackney, AC (1989) Endurance training and testosterone levels. *Sports Medicine* **8**: 117-127

Hoogeveen, A.R. e Zonderland, M.L. (1996). Relationships Between Testosterone, Cortisol and Performance in Professional Cyclists. *International Journal of Sports Medicine*. **17**: 423 – 428.

Lac, D., Pantelidis, D. e Robert, A. (1997). Salivary cortisol response to a 30mn submaximal test adjusted to a constant herat rate. *J Sports Med Phys Fitness*. **37**: 56 – 60.

Léger, L. (1996). *Aerobic performance*. In D. Docherty (Ed.), *Measuerement in Pediatric Exercise Science* (pp. 183-223). Champaign: Human Kinetics Publishers.

Maglisho, E. (2003). *Swimming Fastest – The essential reference on technique, training, and program design*. Champaign: Human Kinetics.

Obminski, Z., Stupnicki, R., (1997). Comparison of the testosterone-to-cortisol ratio values obtained from hormonal assays in saliva and serum. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. **37**: 50-55

Oliveira, J. (1998). *Validação Directa do Teste Vaivém em 20 metros, de Luc-Léger, em Adolescentes Portugueses*. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Motricidade Humana.

Pagano, R., Tessitore A., Benvenuti C., Meeusen R., Capranica (2005). Physiological, hormonal, and match analysis aspects of futsal matches. *Medicine & Science in Sports and Exercise*. **37** (5 suplement: S86).

Powers, S. & Howley, E., (2001) *Exercise Physiology: Theory and Application to Fitness and Performance (4ª Ed)*. McGraw-Hill Companies, Inc.

Rama, L. (1997). *Estudo comparativo das repercussões fisiológicas e da percepção subjectiva de esforço, como resposta a diferentes estimulações tipo, em treino de Natação Desportiva*. Tese de Mestrado em Treino de Alto Rendimento. Lisboa: FMH – UTL.

Ramel, A., K. Wagner, I. Elmadfa (2003). Acute impact of submaximal resistance exercise on immunological and hormonal parameters in young men. *Journal of Sports Sciences*. 21: 1001-1008

Simões, H., Marcon, F., Oliveira, F., Campbell, C., Baldisser, V., Rosa, L., (2004). Resposta da razão testosterona/cortisol durante o treinamento de corredores velocistas e fundistas. *Revista brasileira de Educação Física e Esporte*. **18**: 31-36.

Skinner, J. S. (1993). *Exercise testing and exercise prescription for special cases*. Philadelphia/London : Lea & Febiger

Urhausen A, Kindermann W (2002). Diagnosis of overtraining: what tools do we have? *Sports Medicine* **32**: 95-102

Wilmore, Jack & Costill, David (1994), *Physiology of Sport and Exercise*. Human Kinetics.

ANEXOS

Anexo 1

Tabela do Atleta para o Teste de Luc-Léger

Teste Luc-Léger

Nome _____ Turma _____

Data _____ / _____ / _____ Idade _____

Numero de Percursos

Nível (20 metros)

1	1	2	3	4	5	6	7						
2	8	9	10	11	12	13	14	15					
3	16	17	18	19	20	21	22	23					
4	24	25	26	27	28	29	30	31	32				
5	33	34	35	36	37	38	39	40	41				
6	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51			
7	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61			
8	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72		
9	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83		
10	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94		
11	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	
12	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	
13	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131
14	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
15	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157

Anexo 2

Protocolo de Recolha das Amostras de Saliva

PROTOCOLO DE RECOLHA DAS AMOSTRA DE SALIVA

As instruções em seguida apresentadas deverão ser cumpridas de forma a assegurar a fiabilidade dos dados recolhidos.

Em cada um dos dias de realização do estudo as recolhas de amostra de saliva serão realizadas em 6 momentos diferentes:

IDENTIFICAÇÃO DO MOMENTO	HORAS
A	19,00 horas
B	20,30 horas
C	21,30 horas
D	22,30 horas
E	Ao levantar (8-9 horas)
F	19,00 horas

Atenção:

- Antes de realizar a recolha das amostras de saliva os indivíduos não deverão ingerir alimentos, mastigar pastilhas elásticas ou reбуçados no período de 30 – 45 minutos que antecedem a recolha.
- Não se deverão lavar os dentes com pasta dentífrica antes das recolhas, sendo apenas permitido bocejar a boca com água.
- O tempo de recolha das amostra, onde cada indivíduo deverá mastigar o algodão, deverá ser de rigorosamente 2 minutos. Após o qual será colocado no recipiente próprio (tubo ensaio) e ir directamente para o congelador, mantendo-se lá até à sua recolha por parte dos investigadores.

A recolha das amostras no domicílio dos elementos da amostra será previamente combinada.

Em caso de qualquer dúvida, deverá contactar o investigador.

Contacto:

Obrigado, pela tua colaboração

Anexo 3

Dados para caracterização da Amostra

Tabela 1 – Idade decimal, Massa, Estatura, IMC, Altura Sentado, Envergadura, Σ Pregas, Anos de treino e Volume Médio Anual

Sujeitos	Idade Decimal (anos)	Massa (Kg)	Estatura (cm)	IMC	Altura Sentado (cm)	Envergadura (cm)	Σ Pregas	Anos de treino	Volume Médio Anual (Km)
01	15,79	55,20	164,50	20,40	84,00	171,00	44	8	1400
02	15,33	65,00	182,50	19,52	92,20	193,00	45	8	1400
03	16,93	58,00	174,00	19,16	87,00	184,00	41	7	1400
04	16,48	79,60	191,60	21,68	95,10	194,00	44	6	1400
05	17,64	59,40	177,40	18,87	91,50	190,00	32	6	1400
06	18,64	69,40	171,50	23,60	88,40	173,00	57	5	1400
07	17,44	59,80	172,60	20,07	91,50	174,00	59	8	1500
08	17,08	68,00	173,70	22,54	91,20	175,00	50	8	1500
09	17,65	72,00	183,00	21,50	95,00	190,00	41	9	1500
10	16,60	72,80	179,60	22,57	89,60	181,00	49	7	1500
11	17,50	68,20	182,60	20,45	92,50	187,00	36	7	1500
12	17,30	70,00	172,30	23,58	92,40	174,00	69	6	1500

Anexo 4

Resultados do Teste Luc-Léger

Tabela 2 – Resultados obtidos no Luc-Léger

Indivíduos	Lactato	FC	Percursos	Patamares	Velocidade	Vo2max
1	11,8	196	102	11	13,5	56,2
2	20,7	202	72	8	12	48,35
3	4,9	205	95	11	13,5	54,86
4	15	200	90	10	13	52,5
5	12,2	207	109	12	14	56,99
6	11,8	192	98	11	13,5	52,84
7	14,4	197	96	11	13,5	54,26
8	11	190	84	10	13	51,75
9	16,6	196	86	10	13	51,03
10	17,9	182	79	9	12,5	49,46
11	13,7	201	91	10	13	51,23
12	12,6	191	73	9	12,5	48,53

Anexo 5

Kit Salimetrics (USA) - Cortisol (Amostra e Controle)



101 Innovation Blvd., Suite 302
State College, PA 16803 USA
(T) 814-234-7748, (F) 814-234-1608
800-790-2258 (USA & Canada only)
www.salimetrics.com

techservices@salimetrics.com

EXPANDED RANGE
High Sensitivity

SALIVARY CORTISOL ENZYME IMMUNOASSAY KIT

Catalog No. 1-30021-3012, 96-Well Kit

For Research Use

Intended Use

Salimetrics HS-Cortisol kit is a competitive immunoassay specifically designed for the quantitative measurement of salivary cortisol. It is not intended for use with serum/plasma or for diagnostic use. It is intended only for research use with saliva. Please read the complete kit insert before performing this assay. For further information about this kit, its application, or the procedures in this insert, please contact the technical service team at Salimetrics.

Introduction

Historically, the immunodiagnostic community's approach to the application of immunoassay techniques in the measurement of biomarkers in saliva has been problematic. This assay kit was designed to address those problems. First, prior to the late 1990s the majority of available immunoassays for saliva cortisol were modifications of protocols developed for the use with serum/plasma. The standards used in those assay kits were suspended in a human serum matrix. Given that the composition of serum is markedly different from saliva, those standards are likely to produce results that are influenced by matrix differences. To ensure the most accurate results, this salivary immunoassay uses a matrix that matches saliva. Second, the level of cortisol in saliva is significantly lower than levels in the general circulation. The use of a standard curve developed to capture the range of values expected in serum/plasma samples is often not sensitive enough to capture the complete range of individual differences in the level expected in saliva. This assay was designed to capture the full range of salivary cortisol levels (0.003 to 3.0 µg/dL) while using only 25 µL of saliva per test. Third, the pH of saliva is easily lowered or raised by the consumption of food or drink. Performance of immunoassays becomes compromised as the pH of samples to be tested drops below 4 (1). This results in artificially inflated levels. This assay system is designed to be resilient to the effects of interference caused by collection techniques that affect pH. In addition, a built-in pH indicator warns the user of acidic or basic samples.

Test Principle

A microtitre plate is coated with monoclonal antibodies to cortisol. Cortisol in standards and unknowns compete with cortisol linked to horseradish peroxidase for the antibody binding sites. After incubation, unbound components are washed away. Bound cortisol peroxidase is measured by the reaction of the peroxidase enzyme on the substrate tetramethylbenzidine (TMB). This reaction produces a blue color. A yellow color is formed after stopping the reaction with sulfuric acid. Optical density is read on a standard plate reader at 450 nm. The amount of cortisol peroxidase detected is inversely proportional to the amount of cortisol present (2).

Special Feature

A pH indicator in the assay diluent alerts the user to samples with high or low pH values. Acidic samples will turn the diluent yellow. Alkaline samples will turn the diluent purple. Dark yellow or purple wells indicate that a pH value for that sample should be obtained using pH strips. Cortisol values from samples with a pH ≤ 3.5 or ≥ 9.0 may be artificially inflated or lowered (1).

Precautions

1. Stop Solution is a solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care.
2. This kit uses break-apart microtitre strips. Unused wells must be stored at 2-8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.

3. Do not mix components from different lots of kits.
4. When using a multichannel pipette, reagents should be added to duplicate wells at the same time. Follow the same sequence when adding additional reagents so that incubation time with reagents is the same for all wells.
5. See "Material Safety Data" at the end of procedure.
6. As for all quantitative assays for salivary analytes, we recommend that samples be screened for possible blood contamination (3,4). This can be efficiently and economically accomplished using Salimetrics Blood Contamination EIA Kit (Cat No: 1-13021-1312). Do not use dipsticks, which result in false positive values due to salivary enzymes.
7. Routine calibration of pipettes is critical for the best possible assay performance.
8. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible (without interruption) across the plate.
9. When running multiple plates, or multiple sets of strips, a standard curve should be run with each individual plate and/or strips.
10. The temperature of the laboratory may affect assays. Salimetrics' kits have been validated at 68-74°F (20-23.3°C). Higher or lower temperatures will cause an increase or decrease in OD values, respectively. Salimetrics cannot guarantee test results outside of this temperature range.

Storage All components of this kit are stable at 2-8°C until the kit's expiration date.

Reagents and Reagent Preparation

1. **Anti-Cortisol Coated Plate:** A ready-to-use 96-well microtitre plate pre-coated with monoclonal anti-cortisol antibodies in a resealable foil pouch.
2. **Cortisol Standards:** Six vials, 500 µL each, labeled A-F, containing cortisol concentrations of 3,000, 1,000, 0.333, 0.111, 0.037, and 0.012 µg/dL in a synthetic saliva matrix with a non-mercury preservative. (Values in nmol/L are 82.77, 27.59, 9.19, 3.06, 1.02, and 0.33 nmol/L respectively.)
3. **Wash Buffer:** 100 mL of a 10X phosphate buffered solution containing detergents and a non-mercury preservative. Dilute the wash buffer concentrate 10-fold with room temperature deionized water (100 mL of 10X wash buffer to 900 mL of deionized H₂O). (NOTE: If precipitate has formed in the concentrated wash buffer, it may be heated to 60°C for 15 minutes. Cool to room temperature before use in assay.)
4. **Assay Diluent:** 63 mL of a phosphate buffered solution containing a pH indicator and a non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate:** 40 µL of a solution of cortisol labeled with horseradish peroxidase. Dilute prior to use with assay diluent.
6. **Tetramethylbenzidine (TMB):** 25 mL of a non-toxic ready to use solution.
7. **Stop Solution:** 12.5 mL of a solution of sulfuric acid in distilled water (US customers only). Stop solution is provided in powdered form to customers outside the US. Reconstitute the powdered stop solution with 12.5 mL of deionized water. Let sit for 10 minutes before use.
8. **Non-specific Binding Wells:** These wells do not contain anti-cortisol antibody. In order to support multiple-use, a strip of NSB wells is included. They are located in the foil pouch. Wells may be broken off and inserted where needed.

Note: The quantity of reagent provided with break-apart kits is sufficient for three individual runs. The volume of diluent and conjugate used for assays using less than a full plate should be scaled down accordingly, keeping the same dilution ratio.

Materials Needed But Not Supplied

- Precision pipette to deliver 15 and 25 µL
- Precision multichannel pipette to deliver 50 µL, and 200 µL
- Vortex
- Plate rotator (if unavailable, tap to mix)
- Plate reader with a 450 nm filter
- Log-linear graph paper or computer software for data reduction
- Deionized water
- Reagent reservoirs
- One disposable tube capable of holding 2.4 mL
- Pipette tips
- Serological pipette to deliver up to 2.4 mL

Precision:

1. The intra-assay precision was determined from the mean of 10 replicates each.

Sample	N	Mean (ug/dL)	Standard Deviation (ug/dL)	Coefficient of Variation (%)
H	10	0.897	0.01	3.88
M	10	0.51	0.03	6.22
L	10	0.14	0.01	7.12

2. The inter-assay precision was determined from the mean of average duplicates for ten separate runs.

Sample	N	Mean (ug/dL)	Standard Deviation (ug/dL)	Coefficient of Variation (%)
H	10	0.538	0.04	6.69
L	10	0.129	0.01	6.88

Linearity of Dilution: Three saliva samples were diluted with PBS and assayed.

Sample	Dilution Factor	Expected (ug/dL)	Observed (ug/dL)	Recovery (%)
1			0.513	
	1:2	0.256	0.271	105.8%
	1:4	0.128	0.134	104.7%
	1:8	0.064	0.057	89%
	1:16	0.032	0.036	112.5%
	1:32	0.016	0.015	93.8%
2			0.141	
	1:2	0.071	0.068	95.8%
	1:4	0.035	0.035	100%
	1:8	0.018	0.020	111.1%
3			0.387	
	1:2	0.193	0.199	103.1%
	1:4	0.097	0.100	103.1%
	1:8	0.048	0.054	112.5%
	1:16	0.024	0.023	95.8%
	1:32	0.012	0.011	91.7%

Sensitivity: The lower limit of sensitivity was determined by interpolating the mean minus 2SD for 10 sets of duplicates at 0 ug/dL standard. The minimal concentration of cortisol that can be distinguished from 0 is <0.007 ug/dL.

Correlation with Serum: The correlation between serum and saliva cortisol was determined by assaying 19 matched samples using the Diagnostic Products Corporation serum Coat-a-Count Cortisol RIA and the Salimetrics HS Salivary Cortisol EIA.

The correlation between saliva and serum was highly significant, $r(17) = 0.960$, $p < 0.0001$.

Normal Ranges: Refer to the Cortisol Diagnostic Kit Insert, #1-1102 on our web site.

Method Comparison: The correlation between the Salimetrics EIA and DPC's RIA Coat-a-Count Cortisol saliva modification was evaluated by assaying 72 common samples. The EIA-RIA results were highly correlated, $r(72) = 0.956$, $p < 0.0001$.

Means: DPC RIA Cortisol = 0.309 $\mu\text{g/dL}$

Salimetrics EIA Cortisol = 0.322 $\mu\text{g/dL}$

Seller's Limited Warranty

"Seller warrants that all goods sold hereunder will be free from defects in material and workmanship. Upon prompt notice by Buyer of any claimed defect, which notice must be sent within thirty (30) days from date such defect is first discovered and within three months from the date of shipment, Seller shall, at its option, either repair or replace the product that is proved to Seller's satisfaction to be defective. This warranty does not cover any damage due to accident, misuse, negligence, or abnormal use.

It is expressly agreed that this limited warranty shall be in lieu of all warranties of fitness and in lieu of the warranty of merchantability. Seller shall not be liable for any incidental or consequential damages that arise out of the installation, use or operation of Seller's product or out of the breach of any express or implied warranties."

Procedure

Bring all reagents to room temperature.

Step 1: Determine your plate layout. Here is a suggested layout.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.80 Std	1.80 Std	Control H	Control H								
B	.600 Std	.600 Std	Control L	Control L								
C	.200 Std	.200 Std	Sample 1	Sample 1								
D	.067 Std	.067 Std	Sample 2	Sample 2								
E	.022 Std	.022 Std	Sample 3	Sample 3								
F	.007 Std	.007 Std	Sample 4	Sample 4								
G	Zero	Zero	Sample 5	Sample 5								
H	Nsb	Nsb	Sample 6	Sample 6								

Step 2: Keep the desired number of strips in the strip holder and place the remaining strips back in the foil pouch. If you choose to place non-specific binding wells in H-1, 2, remove strips 1 and 2 from the strip holder and break off the bottom wells. Place the strips back into the strip holder leaving H-1, 2 blank. Break off 2 NSB wells from the strip of NSBs included in the foil pouch. Place in H-1, 2. Alternatively, NSBs may be placed wherever you choose on the plate. Reseal the zip-lock and refrigerate the pouch at 2-8°C.

Caution: Extra NSB wells should not be used for determination of standards or unknowns.

Step 3:

- Pipette 24 mLs of assay diluent into a disposable tube. Set aside for Step 5.

Step 4:

- Pipette 25 µL of standards and unknowns into appropriate wells. Standards and samples should be assayed in duplicate.
- Pipette 25 µL of assay diluent into 2 wells to serve as the zero.
- Pipette 25 µL of assay diluent into each NSB well.

Step 5: Make a 1:1,600 dilution of the conjugate, by adding 15 µL of the conjugate to the 24 mL of assay diluent prepared in Step 3, (full plate only). Immediately mix the diluted conjugate solution and pipette 200 µL into each well using a multichannel pipette.

Step 6: Mix plate on rotator for 5 minutes at 500 rpm (or tap to mix) and incubate at room temperature for an additional 55 minutes.

Step 7: Wash the plate 4 times with 1X wash buffer. A plate washer is recommended. However, washing may be done by gently squirting wash buffer into each well with a squirt bottle or by pipetting 300µL of wash buffer into each well, and then discarding the liquid by inverting the plate over a sink. After each wash, the plate should be thoroughly blotted on paper towels before being turned upright. *If using a plate washer, blotting is still recommended after the last wash.*

Step 8: Add 200 µL of TMB solution to each well with a multichannel pipette.

Step 9: Mix on a plate rotator for 5 minutes at 500 rpm (or tap to mix) and incubate the plate in the dark at room temperature for an additional 25 minutes.

Step 10: Add 50 µL of stop solution with a multichannel pipette.

Step 11:

- Mix on a plate rotator for 3 minutes at 500 rpm (or tap to mix). **Caution:** *DO NOT* mix at speeds over 600 rpms. Wells are very full!
- Wipe off bottom of plate with a water-moistened lint-free cloth and wipe dry.
- Read in a plate reader at 450 nm. Read plate within 10 minutes of adding stop solution (correction at 492 to 620 is desirable).

Calculations

1. Compute the average Optical Density (OD) for all duplicate wells.
2. Subtract the average OD for the NSB wells from the average OD of the zero, standards, and unknowns.
3. Calculate the percent bound (B/B0) for each standard and unknown by dividing the average OD (B) by the average OD for the zero (B0).
4. If calculating the results by hand, plot B/B0 on the vertical axis against the log of the concentration on the horizontal axis for each standard and draw a straight line through the points. Determine the concentrations of the unknowns by interpolation.
5. If using software capable of logistics, use a 4 parameter sigmoid minus curve fit. Otherwise, use log-linear regression.

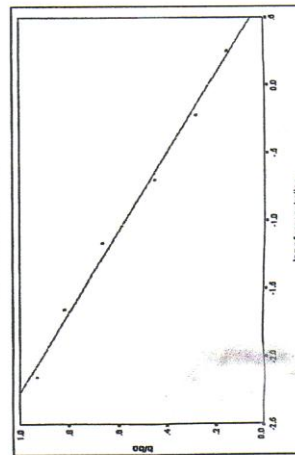
Typical Results

The following charts and graphs are for illustration only and **SHOULD NOT** be used to calculate results from another assay.

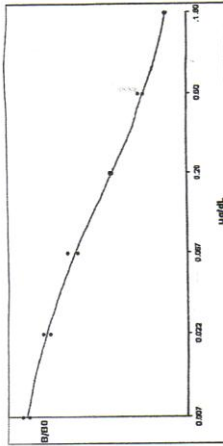
Well	Sample	Average OD	B	B/B0	Cortisol ug/dL
A1,A2	S1	0.229	0.205	0.1207	1.613
B1,B2	S2	0.419	0.395	0.2326	0.757
C1,C2	S3	0.737	0.713	0.4199	0.214
D1,D2	S4	1.090	1.066	0.6278	0.052
E1,E2	S5	1.330	1.306	0.7691	0.020
F1,F2	S6	1.561	1.537	0.9052	0.008
G1,G2	B0	1.722	1.698	NA	NA
H1,H2	NSB	0.024	NA	NA	NA

Example: Standard Curves

Log-Linear Regression



CORTISOL 4-PARAMETER SIGMOID MINUS CURVE FIT



Material Safety Data*

Hazardous Ingredients

Stop Solution is a solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care. We recommend the procedures listed below for all kit reagents.

Handling

Follow good laboratory procedures when handling kit reagents. Laboratory coats, gloves, and safety goggles are recommended. Wipe up spills using standard absorbent materials while wearing protective clothing. Follow local regulations for disposal.

Emergency Exposure Measures

In case of contact, immediately wash skin or flush eyes with water for 15 minutes. Remove contaminated clothing. If inhaled, remove individual to fresh air. If individual experiences difficulty breathing, give oxygen and call a physician.

*The above information is believed to be accurate but is not all-inclusive. This information should only be used as a guide. Salimetrics shall not be liable for accidents or damage resulting from contact with reagents.

References

1. Schwartz, E.B., Granger, D.A., Suman, E.J., Kumar, M.R., & Laird, B. (1998). Assessing salivary cortisol in studies of child development. *Child Development*, 69, 1503-1513.
2. Chard, T. (1990). *An Introduction to radioimmunoassay and related techniques*. Amsterdam: Elsevier.
3. Kivlighan, K. T., Granger, D. A., Schwartz, E. B., Nelson, V., & Curran, M. (2004). Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Hormones and Behavior*, 46, 39-46.
4. Schwartz, E., & Granger, D. A. (2004). Transferrin enzyme immunoassay for quantitative monitoring of blood contamination in saliva. *Clinical Chemistry*, 50, 654-656.
5. Clements, A. D., & Parker, C. R. (1998). The relationship between salivary cortisol concentrations in frozen versus mailed samples. *Psychoneuroendocrinology*, 23, 613-616.
6. Kirschbaum, C., Reut, G.F., & Hellhammer, D.H. (1992). *Assessment of hormones and drugs in saliva in biobehavioral research*. Kirkland, WA: Hogrefe & Huber.

HS Cortisol EIA Assay Performance Characteristics

Recovery: Two saliva samples containing different levels of endogenous cortisol were spiked with known quantities of cortisol and assayed.

Sample	Endogenous (ug/dL)	Added (ug/dL)	Expected (ug/dL)	Observed (ug/dL)	Recovery (%)
1	0.41	0.54	0.95	0.825	86.8%
		0.04	0.450	0.390	86.7%
2	0.111	0.54	0.651	0.614	94.3%
		0.04	0.151	0.136	90.1%

SALIMETRICS
 101 Innovation Blvd, Suite 302
 State College, PA 16803 USA
 (T) 814-234-7748 (F) 814-234-1608
 800-790-2258 (USA & Canada only)
 www.salimetrics.com
 techservices@salimetrics.com

**EXPANDED RANGE
 High Sensitivity
 SALIVARY CORTISOL ENZYME IMMUNOASSAY KIT**
 Catalog No. 1-3002/1-3012, 96-Well Kit
 For Research Use

Intended Use

Salimetrics HS-Cortisol kit is a competitive immunoassay specifically designed for the quantitative measurement of salivary cortisol. It is not intended for use with serum/plasma or for diagnostic use. It is intended only for research use with saliva. Please read the complete kit insert before performing this assay. For further information about this kit, its application, or the procedures in this insert, please contact the technical service team at Salimetrics.

Introduction

Historically, the immunodiagnostic community's approach to the application of immunoassay techniques in the measurement of biomarkers in saliva has been problematic. This assay kit was designed to address those problems. First, prior to the late 1990s the majority of available immunoassays for saliva cortisol were modifications of protocols developed for the use with serum/plasma. The standards used in these assay kits were suspended in a human serum matrix. Given that the composition of serum is markedly different from saliva, those standards are likely to produce results that are influenced by matrix differences. To ensure the most accurate results, this salivary immunoassay uses a matrix that matches saliva. Second, the level of cortisol in saliva is significantly lower than levels in the general circulation. The use of a standard curve developed to capture the range of values expected in serum/plasma samples is often not sensitive enough to capture the complete range of individual differences in the level expected in saliva. This assay was designed to capture the full range of salivary cortisol levels (0.003 to 3.0 µg/dL) while using only 25 µL of saliva per test. Third, the pH of saliva is easily lowered or raised by the consumption of food or drink. Performance of immunoassays becomes compromised as the pH of samples to be tested drops below 4 (1). This results in artificially inflated levels. This assay system is designed to be resilient to the effects of interference caused by collection techniques that affect pH. In addition, a built-in pH indicator warns the user of acidic or basic samples.

Test Principle

A microtitre plate is coated with monoclonal antibodies to cortisol. Cortisol in standards and unknowns compete with cortisol linked to horseradish peroxidase for the antibody binding sites. After incubation, unbound components are washed away. Bound cortisol peroxidase is measured by the reaction of the peroxidase enzyme on the substrate tetramethylbenzidine (TMB). This reaction produces a blue color. A yellow color is formed after stopping the reaction with sulfuric acid. Optical density is read on a standard plate reader at 450 nm. The amount of cortisol peroxidase detected is inversely proportional to the amount of cortisol present (2).

Special Feature

A pH indicator in the assay diluent alerts the user to samples with high or low pH values. Acidic samples will turn the diluent yellow. Alkaline samples will turn the diluent purple. Dark yellow or purple wells indicate that a pH value for that sample should be obtained using pH strips. Cortisol values from samples with a pH ≤ 3.5 or ≥ 9.0 may be artificially inflated or lowered (1).

Precautions

1. Stop Solution is a solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care.
2. This kit uses break-apart microtitre strips. Unused wells must be stored at 2-8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.

3. Do not mix components from different lots of kits.
4. When using a multichannel pipette, reagents should be added to duplicate wells at the same time. Follow the same sequence when adding additional reagents so that incubation time with reagents is the same for all wells.
5. See 'Material Safety Data' at the end of procedure.
6. As for all quantitative assays for salivary analytes, we recommend that samples be screened for possible blood contamination (3,4). This can be efficiently and economically accomplished using Salimetrics Blood Contamination ELA Kit (Cat No. 1-1302/1-1312). Do not use using Salimetrics Blood Contamination ELA Kit (Cat No. 1-1302/1-1312). Do not use if dipsticks, which result in false positive values due to salivary enzymes.
7. Routine calibration of pipettes is critical for the best possible assay performance.
8. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible (without interruption) across the plate.
9. When running multiple plates, or multiple sets of strips, a standard curve should be run with each individual plate and/or strips.
10. The temperature of the laboratory may affect assays. Salimetrics' kits have been validated at 68-74°F (20-23.3°C). Higher or lower temperatures will cause an increase or decrease in OD values, respectively. Salimetrics cannot guarantee test results outside of this temperature range.

Storage All components of this kit are stable at 2-8°C until the kit's expiration date.

Reagents and Reagent Preparation

1. **Anti-Cortisol Coated Plate:** A ready-to-use 96-well microtitre plate pre-coated with monoclonal anti-cortisol antibodies in a resealable foil pouch.
2. **Cortisol Standards:** Six vials, 500 µL each, labeled A-F, containing cortisol concentrations of 3,000, 1,000, 0.333, 0.111, 0.037, and 0.012 µg/dL, in a synthetic saliva matrix with a non-mercury preservative. (Values in nmol/L are 82.77, 27.59, 9.19, 3.06, 1.02, and 0.33 nmol/L respectively).
3. **Wash Buffer:** 100 mL of a 10X phosphate buffered solution containing detergents and a non-mercury preservative. Dilute the wash buffer concentrate 10-fold with room temperature deionized water (100 mL of 10X wash buffer to 900 mL of deionized H₂O). (NOTE: If precipitate has formed in the concentrated wash buffer, it may be heated to 60°C for 15 minutes. Cool to room temperature before use in assay.)
4. **Assay Diluent:** 63 mL of a phosphate buffered solution containing a pH indicator and a non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate:** 40 µL of a solution of cortisol labeled with horseradish peroxidase. Dilute prior to use with assay diluent.
6. **Tetramethylbenzidine (TMB):** 25 mL of a non-toxic ready to use solution.
7. **Stop Solution:** 12.5 mL of a solution of sulfuric acid in distilled water (US customers only). Stop solution is provided in powdered form to customers outside the US. Reconstitute the powdered stop solution with 12.5 mL of deionized water. Let sit for 10 minutes before use.
8. **Non-specific Binding Wells:** These wells do not contain anti-cortisol antibody. In order to support multiple-use, a strip of NSB wells is included. They are located in the foil pouch. Wells may be broken off and inserted where needed.

Note: The quantity of reagent provided with break-apart kits is sufficient for three individual runs. The volume of diluent and conjugate used for assays using less than a full plate should be scaled down accordingly, keeping the same dilution ratio.

Materials Needed But Not Supplied

- Precision pipette to deliver 15 and 25 µL
- Precision multichannel pipette to deliver 50 µL, and 200 µL
- Vortex
- Plate rotator (if unavailable, tap to mix)
- Plate reader with a 450 nm filter
- Log-linear graph paper or computer software for data reduction
- Deionized water
- Reagent reservoirs
- One disposable tube capable of holding 24 mL
- Pipette tips
- Serological pipette to deliver up to 24 mL

Specimen Collection

The preferred saliva collection method (5,6) is to use plain (non-citric acid) cotton Salivettes (Sarstedt). Samples may also be collected using Sorbettes (for infants) or cotton ropes, or by passive drool. For accurate results collection devices should be completely saturated before removal. Do not add sodium azide to saliva samples as a preservative. Freeze at -20°C or lower for long-term storage. Contact the technical service team at salimetrics for more detailed information on specimen collection.

Saliva samples should be frozen prior to assay to precipitate the mucins. On day of assay, thaw completely, vortex, and centrifuge at $1500 \times g$ (@3000 rpm) for 15 minutes. Pipette clear sample into appropriate wells. Particulate matter may interfere with antibody binding, leading to falsely elevated results. Do not assay samples that are visibly contaminated with blood.

Procedure

Bring all reagents to room temperature.

Step 1: Determine your plate layout. Here is a suggested layout.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,000 Std	3,000 Std	Control H	Control H								
B	1,000 Std	1,000 Std	Control L	Control L								
C	0.333 Std	0.333 Std	Sample 1	Sample 1								
D	0.111 Std	0.111 Std	Sample 2	Sample 2								
E	0.037 Std	0.037 Std	Sample 3	Sample 3								
F	0.012 Std	0.012 Std	Sample 4	Sample 4								
G	Zero	Zero	Sample 5	Sample 5								
H	NSB	NSB	Sample 6	Sample 6								

Step 2: Keep the desired number of strips in the strip holder and place the remaining strips back in the foil pouch. If you choose to place non-specific binding wells in H-1, 2, remove strips 1 and 2 from the strip holder and break off the bottom wells. Place the strips back into the strip holder leaving H-1, 2 blank. Break off 2 NSB wells from the strip of NSBs included in the foil pouch. Place in H-1, 2. Alternatively, NSBs may be placed wherever you choose on the plate. Reseal the zip-lock and refrigerate the pouch at $2-8^{\circ}\text{C}$.

Caution: Extra NSB wells should not be used for determination of standards or unknowns.

Step 3:

- Pipette 24 mL of assay diluent into a disposable tube. Set aside for Step 5.

Step 4:

- Pipette 25 μL of standards and unknowns into appropriate wells. Standards and samples should be assayed in duplicate.
- Pipette 25 μL of assay diluent into 2 wells to serve as the zero.
- Pipette 25 μL of assay diluent into each NSB well.

Step 5: Make a 1:1600 dilution of the conjugate, by adding 15 μL of the conjugate to the 24 mL of assay diluent prepared in Step 3, (full plate only). Immediately mix the diluted conjugate solution and pipette 200 μL into each well using a multichannel pipette.

Step 6: Mix plate on rotator for 5 minutes at 500 rpm (or tap to mix) and incubate at room temperature for an additional 55 minutes.

Step 7: Wash the plate 4 times with 1X wash buffer. A plate washer is recommended. However, washing may be done by gently squirting wash buffer into each well with a squirt bottle or by pipetting 300 μL of wash buffer into each well, and then discarding the liquid by inverting the plate over a sink. After each wash, the plate should be thoroughly blotted on paper towels before being turned upright. *If using a plate washer, blotting is still recommended after the last wash.*

Step 8: Add 200 μL of TMB solution to each well with a multichannel pipette.

Step 9: Mix on a plate rotator for 5 minutes at 500 rpm (or tap to mix) and incubate the plate in the dark at room temperature for an additional 25 minutes.

Step 10: Add 50 μL of stop solution with a multichannel pipette.

- Step 11:**
- Mix on a plate rotator for 3 minutes at 500 rpm (or tap to mix). **Caution: *DO NOT* mix at speeds over 600 rpm.**
 - Wipe off bottom of plate with a water-moistened lint-free cloth and wipe dry.
 - Read in a plate reader at 450 nm. Read plate within 10 minutes of adding stop solution (correction at 492 to 620 is desirable).

Calculations

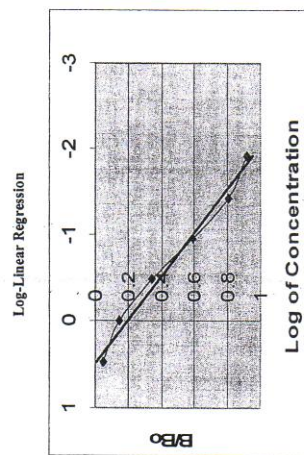
- Compute the average optical density (OD) for all duplicate wells.
- Subtract the average OD for the NSB wells from the average OD of the zero, standards, and unknowns.
- Calculate the percent bound (B/Bo) for each standard and unknown by dividing the average OD (B) by the average OD for the zero (Bo).
- If calculating the results by hand, plot B/Bo on the vertical axis against the log of the concentration on the horizontal axis for each standard and draw a straight line through the points. Determine the concentrations of the unknowns by interpolation.
- If using software capable of logistics, use a 4-parameter sigmoid minus curve fit. Otherwise, use log-linear regression.

Typical Results

The following charts and graphs are for illustration only and **SHOULD NOT** be used to calculate results from another assay.

Well	Sample	Average OD	B	B/Bo	Cortisol (µg/dL)
A1,A2	S1	0.094	0.071	0.048	3.000
B1,B2	S2	0.236	0.213	0.145	1.000
C1,C2	S3	0.524	0.501	0.340	0.333
D1,D2	S4	0.897	0.874	0.593	0.111
E1,E2	S5	1.219	1.196	0.812	0.037
F1,F2	Bo	1.379	1.356	0.921	0.012
G1,G2	NSB	1.496	1.473	NA	NA
H1,H2	NSB	0.023	NA	NA	NA

Example: Standard Curves



Cortisol 4-Parameter Sigmoid Minus Curve Fit



Material Safety Data*

Hazardous Ingredients

Stop Solution is a solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care. We recommend the procedures listed below for all kit reagents.

Handling

Follow good laboratory procedures when handling kit reagents. Laboratory coats, gloves, and safety goggles are recommended. Wipe up spills using standard absorbent materials while wearing protective clothing. Follow local regulations for disposal.

Emergency Exposure Measures

In case of contact, immediately wash skin or flush eyes with water for 15 minutes. Remove contaminated clothing. If inhaled, remove individual to fresh air. If individual experiences difficulty breathing, give oxygen and call a physician.

*The above information is believed to be accurate but is not all-inclusive. This information should only be used as a guide. Salimetrics shall not be liable for accidents or damage resulting from contact with reagents.

HS Cortisol EIA Assay Performance Characteristics

Recovery: Six saliva samples containing different levels of endogenous cortisol were spiked with known quantities of cortisol and assayed.

Sample	Endogenous (µg/dL)	Added (µg/dL)	Expected (µg/dL)	Observed (µg/dL)	Recovery (%)
1	0.088	2.000	2.088	2.176	104.2
2	0.077	0.300	0.377	0.380	100.8
3	0.062	0.011	0.073	0.071	97.3
4	0.066	2.500	2.566	2.723	106.1
5	0.210	0.330	0.510	0.508	99.6
6	0.086	0.011	0.097	0.094	96.9

Precision:

- The intra-assay precision was determined from the mean of 14 (low) and 18 (high) replicates each.

Sample	N	Mean (µg/dL)	Standard Deviation (µg/dL)	Coefficient of Variation (%)
Level 1	18	0.999	0.033	3.35
Level 2	14	0.097	0.004	3.65

2. The inter-assay precision was determined from the mean of average duplicates for 12 separate runs.

Sample	N	Mean (µg/dL)	Standard Deviation (µg/dL)	Coefficient of Variation (%)
Level 1	12	1.020	0.038	3.75
Level 2	12	0.101	0.006	6.41

Linearity of Dilution: Two saliva samples were diluted with PBS and assayed.

Sample	Dilution Factor	Expected (µg/dL)	Observed (µg/dL)	Recovery (%)
1			2.176	
	1:2	1.088	1.065	97.9
	1:4	0.544	0.503	92.5
	1:8	0.272	0.233	85.7
	1:16	0.136	0.109	80.1
2			0.508	
	1:2	0.254	0.247	97.2
	1:4	0.127	0.118	92.9
	1:8	0.064	0.058	90.6
	1:16	0.032	0.031	96.9

Sensitivity: The lower limit of sensitivity was determined by interpolating the mean minus 2 SD for 10 sets of duplicates at 0 µg/dL standard. The minimal concentration of cortisol that can be distinguished from 0 is < 0.003 µg/dL.

Correlation with Serum: The correlation between serum and saliva cortisol was determined by assaying 49 matched samples using the Diagnostic Systems Laboratories' serum Cortisol EIA and the Salimetrics ER HS Salivary Cortisol EIA.

The correlation between saliva and serum was highly significant, $r(47) = 0.91$, $p < 0.0001$.

References

- Schwartz, E.B., Granger, D.A., Susman, E.J., Gunnar, M.R., & Laird, B. (1998). Assessing salivary cortisol in studies of child development. *Child Development*, 69, 1503-1513.
- Chard, T. (1990). *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*. Amsterdam: Elsevier.
- Kivlighan, K. T., Granger, D. A., Schwartz, E. B., Nelson, V., & Curran, M. (2004). Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Hormones and Behavior*, 46, 39-46.
- Schwartz, E., & Granger, D. A. (2004). Transferrin enzyme immunoassay for quantitative monitoring of blood contamination in saliva. *Clinical Chemistry*, 50, 654-656.
- Clements, A.D., & Parker, C.R. (1998). The relationship between salivary cortisol concentrations in frozen versus mailed samples. *Psychoneuroendocrinology*, 23, 613-616.
- Kirschbaum, C., Read, G.F., & Hellhammer, D.H. (1992). *Assessment of hormones and drugs in saliva in biobehavioral research*. Kirkland, WA: Hogefe & Huber.

Seller's Limited Warranty

"Seller warrants that all goods sold hereunder will be free from defects in material and workmanship. Upon prompt notice by Buyer of any claimed defect, which notice must be sent within thirty (30) days from date such defect is first discovered and within three months from the date of shipment, Seller shall, at its option, either repair or replace the product that is proved to Seller's satisfaction to be defective. All claims should be submitted in writing. This warranty does not cover any damage due to accident, misuse, negligence, or abnormal use. Liability in all cases, will be limited to the purchased cost of the kit.

It is expressly agreed that this limited warranty shall be in lieu of all warranties of fitness and in lieu of the warranty of merchantability. Seller shall not be liable for any incidental or consequential damages that arise out of the installation, use or operation of Seller's product or out of the breach of any express or implied warranties."

Anexo 6

Kit Salimetrics (USA) - Testosterona



101 Innovation Blvd., Suite 302
State College, PA 16803 USA
(T) 814-234-7748, (F) 814-234-1608
800-790-2258 (USA & Canada only)

www.salimetrics.com
techservices@salimetrics.com

SALIVARY TESTOSTERONE ENZYME IMMUNOASSAY KIT

Catalog No. 1-1402/1-1412, 96-Well Kit

For *in vitro* Research Use

Intended Use

Salimetrics' testosterone kit is a competitive immunoassay specifically designed for the quantitative measurement of salivary testosterone. It is **not intended for use with serum/plasma or for diagnostic use.** It is intended for research use with saliva. Please read the complete kit insert before performing this assay. For further information about this kit, its application, or the procedures in this insert, contact the technical service team at Salimetrics.

Introduction

Measurement of hormones in saliva has excited interest because of numerous potential applications in developmental and health-oriented behavioral studies (1). Although salivary assays for some hormones (e.g., cortisol) are widely available and used, the availability and use of salivary testosterone has been more restricted. A recent paper (2) reveals a need for a salivary testosterone. This assay kit fills that need with a protocol that the research community can use to improve the next generation of their studies. It has been designed to specifically address the following five issues. First, all available immunoassays for salivary testosterone are modifications of protocols developed for the use with serum/plasma. The standards used in those assay kits are suspended in a human serum matrix. Given that the composition of serum is markedly different from saliva, these standards are likely to produce results that are influenced by matrix differences. To ensure the most accurate results, this salivary immunoassay is designed using a matrix that matches saliva. Second, the level of testosterone in saliva (pg/mL) is significantly lower than levels in the general circulation (ng/mL). The use of a standard curve developed to capture the range of values expected in serum/plasma samples is often not sensitive enough to capture individual differences in the level expected in saliva. This assay has been designed to do so. Third, the test volume of published modified serum immunoassays for use with salivary testosterone ranges from 200 μ L to 1 mL per test. The current protocol uses only 50 μ L of saliva per test. Fourth, no separation or extractions are necessary. Fifth, the pH of saliva is easily lowered or raised by the consumption of food or drink. Immunoassay performance can be compromised as the pH of samples to be tested drops below 4 (3). This assay system is designed to be very sensitive to the effects of interference caused by collection techniques that affect pH.

Test Principle

A microtitre plate is coated with rabbit antibodies to testosterone. Testosterone in standards and unknowns compete with testosterone linked to horseradish peroxidase for the antibody binding sites. After incubation, unbound components are washed away. Bound testosterone peroxidase is measured by the reaction of the peroxidase enzyme on the substrate tetramethylbenzidine (TMB). This reaction produces a blue color. A yellow color is formed after stopping the reaction with 2 molar sulfuric acid. Optical Density is read on a standard plate reader at 450 nm. The amount of testosterone peroxidase detected is inversely proportional to the amount of testosterone present (4).

Revision Date: 10-14-05

Special Feature

As in all Salimetrics assays for use with saliva, a pH indicator in the assay diluent alerts the user to samples with high or low pH values. Acidic samples will turn the diluent yellow. Alkaline samples will turn the diluent purple. Dark yellow or purple wells indicate that a pH value for that sample should be obtained using a pH strip/ometer. Testosterone values from samples with a pH ≤ 4.0 or ≥ 9.0 may be artificially inflated or lowered (5).

Precautions

1. Stop Solution is a 2 molar solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care.
2. This kit uses break-apart microtitre strips. Unused wells must be stored at 2-8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
3. Do not mix components from different lots of kits.
4. When using a multichannel pipette, reagents should be added to duplicate wells at the same time. Follow the same sequence when adding additional reagents so that incubation time with reagents is the same for all wells.
5. See 'Material Safety' Data at the end of procedure.
6. We recommend that samples be screened for possible blood contamination (5,6) using a reliable screening tool such as the Salimetrics Blood Contamination EIA Kit (Cat No: 1-1302/1-1312). Do not use dipsticks, which result in false positive values due to salivary enzymes.
7. Routine calibration of pipettes is critical for the best possible assay performance.
8. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible (without interruption) across the plate.
9. When running multiple plates, or multiple sets of strips, a standard curve should be run with each individual plate and/or strips.
10. The temperature of the laboratory may affect assays. Salimetrics' kits have been validated at 68-74°F (20-23.3°C). Higher or lower temperatures will cause an increase or decrease in OD values, respectively. Salimetrics cannot guarantee test results outside of this temperature range.

Storage. All components of this kit are stable at 2-8°C until the kit's expiration date.

Reagents and Reagent Preparation

1. **Anti-Testosterone Coated Plate:** A ready-to-use 96-well microtitre plate pre-coated with rabbit anti-testosterone antibodies in a resealable foil pouch.
2. **Testosterone Standard:** 1 mL of testosterone in a saliva-like matrix with a non-mercury preservative, at a concentration of 360 pg/mL.
3. **Wash Buffer:** 100 mL of a 10X phosphate buffered solution containing detergents and a non-mercury preservative. Dilute the wash buffer concentrate 10-fold with room temperature deionized water (100 mL of 10X wash buffer to 900 mL of deionized H₂O). (NOTE: If precipitate has formed in the concentrated wash buffer, it may be heated to 60°C for 15 minutes. Cool to room temperature before use in assay.)
4. **Assay Diluent:** 63 mL of a phosphate buffered solution containing a pH indicator and a non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate:** 50 μ L of a solution of testosterone labeled with horseradish peroxidase. Dilute prior to use with assay diluent.
6. **Tetramethylbenzidine (TMB):** 25 mL of a non-toxic ready-to-use solution.
7. **Stop Solution:** 12.5 mL of a 2 molar solution of sulfuric acid in distilled water (US customers only). Stop solution is provided in powdered form to customers outside the US. Reconstitute the powdered stop solution with 12.5 mL of deionized water. Let sit for 10 minutes before use.
8. **Non-specific Binding Wells:** These wells do not contain anti-testosterone antibody. In order to support multiple-use, a strip of NSB wells is included. They are located in the foil pouch. Wells may be broken off and inserted where needed.

NOTE: The quantity of reagent provided with break-apart kits is sufficient for three individual runs. The volume of diluent and conjugate used for assays using less than a full plate should be scaled down accordingly, keeping the same dilution ratio.

Materials Needed But Not Supplied

- Precision pipette to deliver 7 μL , 50 μL , 100 μL and 200 μL
- Precision multichannel pipette to deliver 50 μL , 150 μL , and 200 μL
- Vortex
- Plate rotator (assay sensitivity may be affected if a rotator is not used)
- Plate reader with a 450 nm filter
- Computer software for data reduction
- Deionized water
- Reagent reservoirs
- One 20 mL disposable tube
- Five small disposable tubes
- Pipette tips
- 25 mL serological pipette

Specimen Collection

The preferred saliva collection method is by unstimulated passive drool. **Do not use any cotton absorbent material, such as Salivettes®, Sorbettes and cotton ropes or swabs to collect samples (1,7), as false high readings will result.** Do not use polyester versions of the Salivette device, or the Salisaver device. **Do not** add sodium azide to saliva samples as a preservative. Freeze at -20°C or lower for long-term storage. Contact the technical service team at salimetrics for more detailed information on specimen collection.

Saliva samples should be frozen prior to assay to precipitate the mucins. On day of assay, thaw completely, vortex, and centrifuge at $1500 \times g$ (@3000 rpm) for 15 minutes. It is important to avoid additional freeze-thaws cycles. Pipette clear sample into appropriate wells. Particulate matter may interfere with antibody binding, leading to falsely elevated results.

Procedure

Bring all reagents to room temperature.

Step 1: Determine your plate layout (see below).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	360 Std	360 Std	Ctrl H	Ctrl H								
B	144 Std	144 Std	Ctrl L	Ctrl L								
C	57.6 Std	57.6 Std	S 1	S 1								
D	23.0 Std	23.0 Std	S 2	S 2								
E	9.2 Std	9.2 Std	S 3	S 3								
F	3.7 Std	3.7 Std	S 4	S 4								
G	Zero	Zero	S 5	S 5								
H	NSB	NSB	S 6	S 6								

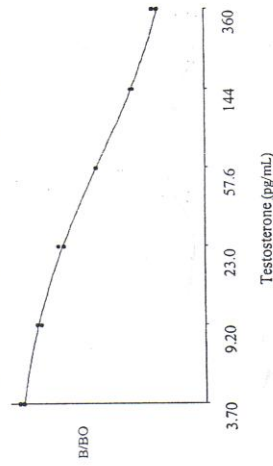
Step 2: Keep the desired number of strips in the strip holder and place the remaining strips back in the foil pouch. If you choose to place non-specific binding wells in H-1, 2, remove strips 1 and 2 from the strip holder and break off the bottom wells. Place the strips back into the strip holder leaving H-1, 2 blank. Break off 2 NSB wells from the strip of NSBs included in the foil pouch. Place in H-1, 2. Alternatively, NSBs may be placed wherever you choose on the plate. Reseal the pouch and refrigerate at $2-8^{\circ}\text{C}$.

Caution: Extra NSB wells should not be used for determination of standards or unknowns.

Step 3:

- Label five microcentrifuge tubes or other small tubes 2 through 6.
- Pipette 150 μL of assay diluent in tubes 2 through 6. Serially dilute the standard 2.5X by adding 100 μL of the 360 pg/mL standard (tube 1) to tube 2. Mix well. After changing pipette tips, remove 100 μL from tube 2 to tube 3. Mix well. Continue for tubes 4, 5, and 6. The final concentrations of standards for tubes 1 through 6 respectively are 360 pg/mL, 144 pg/mL, 57.6 pg/mL, 23.0 pg/mL, 9.20 pg/mL, and 3.70 pg/mL. Standard concentrations in pmol/L are 1248.3, 499.3, 199.7, 79.8, 31.9 and 12.8.

Example: Testosterone 4-Parameter Sigmoid Minus Curve Fit



Material Safety Data*

Hazardous Ingredients

Stop Solution is a 2 molar solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care. We recommend the procedures listed below for all kit reagents.

Handling

Follow good laboratory procedures when handling kit reagents. Laboratory coats, gloves, and safety goggles are recommended. Wipe up spills using standard absorbent materials while wearing protective clothing. Follow local regulations for disposal.

Emergency Exposure Measures

In case of contact, immediately wash skin or flush eyes with water for 15 minutes. Remove contaminated clothing. If inhaled, remove individual to fresh air. If individual experiences difficulty breathing, give oxygen and call a physician.

*The above information is believed to be accurate but is not all-inclusive. This information should only be used as a guide. Salimetrics shall not be liable for accidents or damage resulting from contact with reagents.

Performance Characteristics

- Recovery** - Saliva samples containing different levels of endogenous testosterone were spiked with known quantities of testosterone and assayed. The average recovery was 105.0% (range 93.3% to 110.3%), 109.12% for males and 99.6% for females.
- Intra-assay precision** was determined from the mean of 8 replicates at high (197.3 pg/mL) and low (26.3 pg/mL) testosterone levels. The average intra-assay coefficient of variation was 3.3% and 6.7% for high and low levels.
- Inter-assay precision** was determined from the mean of averaged duplicates for 10 separate runs at high (200.7 pg/mL) and low (13.1 pg/mL) testosterone levels. The average inter-assay coefficient of variation was 5.1% for high and 9.6% for low testosterone levels.
- Linearity of dilution** - Saliva samples were diluted (range 1:2 to 1:16) with assay buffer and assayed in duplicates. The average recovery was 101.1% (range 88.2% to 120.2%), 102.86% for males and 98.68% for females.
- Sensitivity** - The lower limit of sensitivity was determined by interpolating the mean minus 2 SD for 10 sets of duplicates for the 0 pg/mL standard (4). The minimal concentration of testosterone that can be distinguished from 0 is <1.5 pg/mL.

- Pipette 18 mL of assay diluent into the disposable tube. Set aside for Step 5.
- Step 4:**
- Pipette 50 μ L of standards and unknowns into appropriate wells. Standards and samples should be assayed in duplicate.
 - Pipete 50 μ L of assay diluent into 2 wells to serve as the zero.
 - Pipete 50 μ L of assay diluent into each NSB well.
- Step 5:** Dilute the enzyme conjugate by adding 7 μ L of the conjugate to the 18 mL of assay diluent prepared in Step 2. Immediately mix the diluted conjugate solution and add 150 μ L to each well using a multichannel pipette.
- Step 6:** Mix plate on a plate rotator for 60 minutes at 500 rpm at room temperature.
- Step 7:** Wash the plate 4 times with 1X wash buffer. A plate washer is recommended. However, washing may be done by gently squirting wash buffer into each well with a squirt bottle or by pipetting 300 μ L of wash buffer into each well and then flipping the liquid into a sink. After each wash, the plate should be thoroughly blotted on paper towels before turning upright. If using a plate washer, blotting is still recommended after the final wash.
- Step 8:** Add 200 μ L of TMB solution to each well with a multichannel pipette.
- Step 9:** Mix on a plate rotator for 5 minutes at 500 rpm (or tap to mix) and incubate the plate in the dark at room temperature for an additional 25 minutes.
- Step 10:** Add 50 μ L of stop solution with a multichannel pipette.
- Step 11:** Mix on a plate rotator for 3 minutes at 500 rpm (or tap to mix). Be sure all wells have turned yellow. If green color remains, continue mixing until green color turns to yellow.
- Caution:** *DO NOT mix or spread over 600 rpm.* Wipe off bottom of plate with a water-moistened lint-free cloth and wipe dry. Read in a plate reader at 450 nm. Read plate within 10 minutes of adding stop solution (correction at 492 to 620 is desirable).

Calculations

- Compute the average optical density (OD) for all duplicate wells.
- Subtract the average OD for the NSB wells from the average OD of the zero, standards, and unknowns/samples.
- Calculate the percent bound (B/Bo) for each standard and unknown by dividing the average OD (B) by the average OD for the zero (Bo).
- Determine the concentrations of the unknowns/samples by interpolation using software capable of logistics. We recommend using a 4-parameter sigmoid minus curve fit.

Typical Results

The following results are shown for illustration only and SHOULD NOT be used to calculate results from another assay.

Well	Sample	Average OD	B	B/Bo	Testosterone (pg/mL)
A1, A2	S1	0.304	0.254	0.259	360
B1, B2	S2	0.426	0.376	0.384	144
C1, C2	S3	0.609	0.559	0.571	57.6
D1, D2	S4	0.793	0.743	0.759	23.0
E1, E2	S5	0.905	0.855	0.873	9.20
F1, F2	S6	0.997	0.947	0.967	3.70
G1, G2	Bo	1.029	0.979	NA	NA
H1, H2	NSB	0.05	NA	NA	NA

6. **Correlation with serum** – The correlation between saliva and serum free and total testosterone was determined by assaying 32 matched samples (16 adult males and females). The saliva-serum free testosterone correlation was, $r(30) = 0.93$, $p < 0.001$, and the saliva-serum total testosterone correlation was $r(30) = 0.929$, $p < 0.001$. The serum-saliva correlations were stronger for males ($r = 0.80$ to 0.85) than for females ($r = 0.38$ to 0.48).
7. **Method Comparison** – The correlation between the Salimetrics EIA and a published serum RIA modified for use with saliva (2) was evaluated by assaying 32 common samples. For the combined sample, the EIA-RIA results were highly correlated, $r(30) = 0.95$, $p < 0.001$. The EIA-RIA correlation was stronger for males ($r = 0.88$) than for females ($r = 0.54$).

†**Salivary Testosterone Expected Ranges:**

Adult males (mid day*)	70-220 pg/mL
Adult females (mid day*)	5-70 pg/mL
*AM values may be significantly higher	

†To be used as a guide only. Each laboratory should establish its own range.

References

1. Kirschbaum, C., Read, G.F., & Hellhammer, D.H. (1992). *Assessment of hormones and drugs in saliva in biobehavioral research*. Kirkland, WA: Hogefe & Huber.
2. Granger, D. A., Schwartz, E. B., Booth, A., & Arentz, M. (1999). Salivary testosterone determination in studies of child health and development. *Hormones and Behavior*, 35, 18-27.
3. Schwartz, E.B., Granger, D.A., Susman, E.J., Gunnar, M.R., & Laird, B. (1998). Assessing salivary cortisol in studies of child development. *Child Development*, 69, 1503-1513.
4. Chard, T. (1990). *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*. Amsterdam: Elsevier.
5. Kivlighan, K. T., Granger, D. A., Schwartz, E. B., Nelson, V., & Curran, M. (2004). Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Hormones and Behavior*, 46, 39-46.
6. Schwartz, E., & Granger, D. A. (2004). Transferrin enzyme immunoassay for quantitative monitoring of blood contamination in saliva. *Clinical Chemistry*, 50, 654-656.
7. Shirtcliff, E.A., Granger, D.A., Schwartz, E., & Curran, M.J. (2001). Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: Cotton based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology*, 26, 165-173.

Seller's Limited Warranty

"Seller warrants that all goods sold hereunder will be free from defects in material and workmanship. Upon prompt notice by Buyer of any claimed defect, which notice must be sent within thirty (30) days from date such defect is first discovered and within three months from the date of shipment, Seller shall, at its option, either repair or replace the product that is proved to Seller's satisfaction to be defective. All claims should be submitted in written form. This warranty does not cover any damage due to accident, misuse, negligence, or abnormal use. Liability, in all cases, will be limited to the purchased cost of the kit.

It is expressly agreed that this limited warranty shall be in lieu of all warranties of fitness and in lieu of the warranty of merchantability. Seller shall not be liable for any incidental or consequential damages that arise out of the installation, use or operation of Seller's product or out of the breach of any express or implied warranties."

Anexo 7

Ficha de Registro de Placas - ELISA

Anexo 8

Ficha de Registro de Placas ELISA - Cortisol

Anexo 9

Ficha de Registro de Placas ELISA - Testosterona

Anexo 10

Tratamiento Estadístico

Cortisol

Estatística Descritiva

	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Cortisol1	4271,03	7576,44	516,57	26439,76
Cortisol 2	4690,14	7320,43	415,70	26439,76
Cortisol 3	5884,84	5413,50	508,80	17384,20
Cortisol 4	2476,01	1822,69	227,87	5303,50
Cortisol 5	4217,63	7449,02	100,52	23658,62
Cortisol 6	12344,20	15460,85	1763,07	55281,87

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cort_2 - Cort_1	Negative Ranks	4(a)	5,75	23,00
	Positive Ranks	7(b)	6,14	43,00
	Ties	0(c)		
	Total	11		
Cort_3 - Cort_1	Negative Ranks	4(d)	5,00	20,00
	Positive Ranks	6(e)	5,83	35,00
	Ties	0(f)		
	Total	10		
Cort_4 - Cort_1	Negative Ranks	8(g)	5,25	42,00
	Positive Ranks	3(h)	8,00	24,00
	Ties	0(i)		
	Total	11		
Cort_5 - Cort_1	Negative Ranks	7(j)	5,57	39,00
	Positive Ranks	4(k)	6,75	27,00
	Ties	0(l)		
	Total	11		
Cort_6 - Cort_1	Negative Ranks	2(m)	5,50	11,00
	Positive Ranks	9(n)	6,11	55,00
	Ties	0(o)		
	Total	11		

- a Cort_2 < Cort_1
- b Cort_2 > Cort_1
- c Cort_2 = Cort_1
- d Cort_3 < Cort_1
- e Cort_3 > Cort_1
- f Cort_3 = Cort_1
- g Cort_4 < Cort_1
- h Cort_4 > Cort_1
- i Cort_4 = Cort_1
- j Cort_5 < Cort_1
- k Cort_5 > Cort_1
- l Cort_5 = Cort_1
- m Cort_6 < Cort_1
- n Cort_6 > Cort_1

o Cort_6 = Cort_1

Testes Estatísticos (a)

	Cort_2 - Cort_1	Cort_3 - Cort_1	Cort_4 - Cort_1	Cort_5 - Cort_1	Cort_6 - Cort_1
Z	-,889(a)	-,764(a)	-,800(b)	-,533(b)	-1,956(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,374	,445	,424	,594	,050

a Based on negative ranks.

b Based on positive ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test

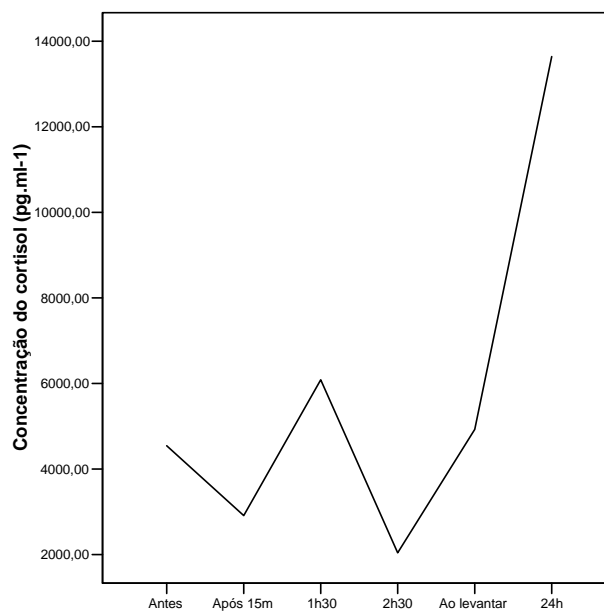
Testes Estatísticos (b)

	Cort_4 - Cort_2	Cort_4 - Cort_3
Z	-,863(a)	-1,689(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,388	,091

a Based on positive ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Gráfico



Testosterona

Estadística Descritiva

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Testosterona 1	139,04	263,52	195,92	40,82
Testosterona 2	158,00	312,51	216,81	46,02
Testosterona 3	149,98	231,89	183,66	25,82
Testosterona 4	87,41	314,00	189,06	63,73
Testosterona 5	190,96	341,94	267,75	40,17
Testosterona 6	156,51	277,62	222,07	39,95

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Test_2 - Test_1	Negative Ranks	3(a)	7,00	21,00
	Positive Ranks	8(b)	5,63	45,00
	Ties	0(c)		
	Total	11		
Test_3 - Test_1	Negative Ranks	7(d)	6,14	43,00
	Positive Ranks	3(e)	4,00	12,00
	Ties	0(f)		
	Total	10		
Test_4 - Test_1	Negative Ranks	7(g)	6,00	42,00
	Positive Ranks	4(h)	6,00	24,00
	Ties	0(i)		
	Total	11		
Test_5 - Test_1	Negative Ranks	1(j)	3,00	3,00
	Positive Ranks	10(k)	6,30	63,00
	Ties	0(l)		
	Total	11		
Test_6 - Test_1	Negative Ranks	3(m)	6,00	18,00
	Positive Ranks	8(n)	6,00	48,00
	Ties	0(o)		
	Total	11		

a Test_2 < Test_1

b Test_2 > Test_1

c Test_2 = Test_1

d Test_3 < Test_1

e Test_3 > Test_1

f Test_3 = Test_1

g Test_4 < Test_1

h Test_4 > Test_1

i Test_4 = Test_1

j Test_5 < Test_1

- k Test_5 > Test_1
 l Test_5 = Test_1
 m Test_6 < Test_1
 n Test_6 > Test_1
 o Test_6 = Test_1

Testes Estatísticos

	Test_2 - Test_1	Test_3 - Test_1	Test_4 - Test_1	Test_5 - Test_1	Test_6 - Test_1
Z	-1,067(a)	-1,580(b)	-,800(b)	-2,667(a)	-1,334(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,286	,114	,424	,008	,182

- a Based on negative ranks.
 b Based on positive ranks.
 c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Test_5 - Test_4	Negative Ranks	2(a)	3,00	6,00
	Positive Ranks	10(b)	7,20	72,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		

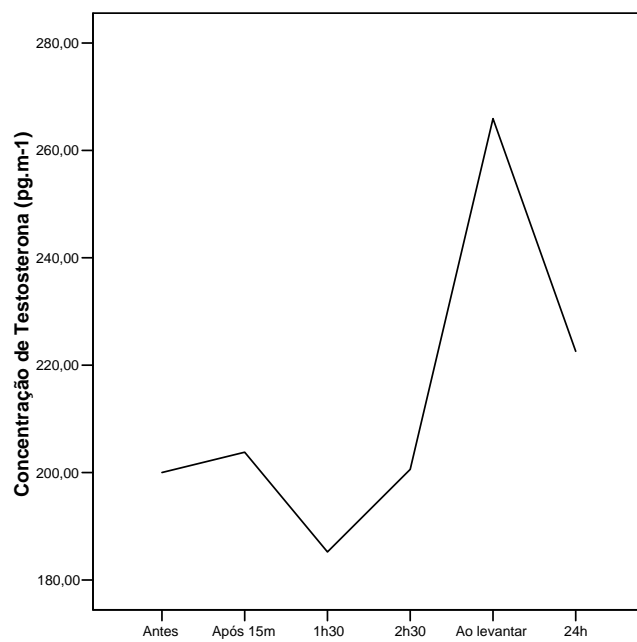
- a Test_5 < Test_4
 b Test_5 > Test_4
 c Test_5 = Test_4

Test Statistics(b)

	Test_5 - Test_4
Z	-2,589(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,010

- a Based on negative ranks.
 b Wilcoxon Signed Ranks Test

Gráfico



Rácio Testosterona/Cortisol

Estatística Descritiva

	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Rácio 1	,14	,09	,01	,31
Rácio 2	,18	,18	,01	,60
Rácio 3	,08	,09	,01	,29
Rácio 4	,16	,16	,02	,59
Rácio 5	,58	,80	,01	2,80
Rácio 6	,04	,04	,00	,13

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
rac_2 - Rac_1	Negative Ranks	7(a)	5,00	35,00
	Positive Ranks	4(b)	7,75	31,00
	Ties	0(c)		
	Total	11		
Rac_3 - Rac_1	Negative Ranks	6(d)	6,50	39,00
	Positive Ranks	4(e)	4,00	16,00
	Ties	0(f)		
	Total	10		
Rac_4 - Rac_1	Negative Ranks	3(g)	7,67	23,00
	Positive Ranks	8(h)	5,38	43,00
	Ties	0(i)		
	Total	11		
Rac_5 - Rac_1	Negative Ranks	4(j)	3,50	14,00
	Positive Ranks	7(k)	7,43	52,00
	Ties	0(l)		
	Total	11		
Rac_6 - Rac_1	Negative Ranks	9(m)	7,00	63,00
	Positive Ranks	2(n)	1,50	3,00
	Ties	0(o)		
	Total	11		

- a rac_2 < Rac_1
 b rac_2 > Rac_1
 c rac_2 = Rac_1
 d Rac_3 < Rac_1
 e Rac_3 > Rac_1
 f Rac_3 = Rac_1
 g Rac_4 < Rac_1
 h Rac_4 > Rac_1
 i Rac_4 = Rac_1
 j Rac_5 < Rac_1
 k Rac_5 > Rac_1
 l Rac_5 = Rac_1
 m Rac_6 < Rac_1
 n Rac_6 > Rac_1
 o Rac_6 = Rac_1

Testes Estatísticos

	rac_2 - Rac_1	Rac_3 - Rac_1	Rac_4 - Rac_1	Rac_5 - Rac_1	Rac_6 - Rac_1
Z	-,178(a)	-1,172(a)	-,889(b)	-1,689(b)	-2,667(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,859	,241	,374	,091	,008

a Based on positive ranks.

b Based on negative ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test

Gráficos

