

Universidade de Coimbra
Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física

**COMPORTAMENTO DA TESTOSTERONA E CORTISOL SALIVAR EM
RESPOSTA A UM ESFORÇO DE NADO AERÓBIO INTERVALADO**

Miguel Filipe L. C. Antunes

Coimbra, 2006

Universidade de Coimbra

Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física

**COMPORTAMENTO DA TESTOSTERONA E CORTISOL SALIVAR EM
RESPOSTA A UM ESFORÇO DE NADO AERÓBIO INTERVALADO**

Monografia de Licenciatura realizada no âmbito
do Seminário em *Comportamento de Marcadores
Imunológicos em Esforço de Nado Aeróbio e
Anaeróbio* no ano lectivo 2005/2006

Coordenadora: Prof. Doutora Ana Teixeira

Orientador: Mestre Luís Rama

Agradecimentos

Para a concretização deste estudo contei com o apoio de inúmeras pessoas, sem as quais nada teria sido possível, e a quem não posso deixar de expressar os meus mais sinceros agradecimentos.

À coordenadora deste seminário, Professora Doutora Ana Teixeira, pela sua capacidade de liderança e pelo modo com que me guiou neste processo de produção de conhecimento;

Ao meu orientador do seminário, Mestre Luís Rama, pela sua infindável paciência, disponibilidade, capacidade de motivação e amizade.

À minha família e namorada pelo apoio incondicional que sempre me deram nos momentos mais difíceis.

À Dr. Fátima e aos colegas de Seminário pela sua amizade e capacidade de trabalho em todas as fases deste projecto.

Aos colegas, Timóteo Monteiro, Marlene Barardo, Vítor Severino e Luís Clérigo pela sua amizade verdadeira.

Índice

Capítulo I – Introdução.....	- 1 -
Capítulo II – Revisão da Literatura.....	- 3 -
1. Cortisol	- 4 -
1.1 Cortisol e Exercício	- 6 -
2. Testosterona	- 8 -
2.1 Testosterona e Exercício	- 9 -
3. Racio Testosterona/Cortisol	- 10 -
4. Aspectos caracterizadores e especificidade do exercício de nado	- 11 -
4.1 Vias energéticas associadas ao exercício de nado.....	- 12 -
4.2 Zonas de Intensidade de treino.....	- 14 -
4.3 Nado Intervalado	- 16 -
Capítulo III – Metodologia.....	- 17 -
1. Caracterização da Amostra	- 17 -
2. Procedimentos no Terreno.....	- 18 -
2.1 Teste de Nado.....	- 18 -
2.2 Recolha de Saliva	- 19 -
3. Procedimentos em Laboratório	- 19 -
3.1 Enquadramento Temporal.....	- 19 -
3.2 Cortisol Salivar.....	- 20 -
3.3 Testosterona Salivar	- 21 -
4. Procedimentos Estatísticos	- 23 -
Capítulo IV – Apresentação e Discussão de Resultados.....	- 25 -
1. Parâmetros Cinemáticos	- 25 -
2. Parâmetros Fisiológicos	- 26 -
3. Parâmetros Hormonais	- 26 -
3.1 Cortisol	- 26 -
3.2 Testosterona	- 28 -
4.3 Racio Testosterona / Cortisol.....	- 30 -
Capítulo V – Conclusões e Sugestões.....	- 33 -
1. Conclusões	- 33 -
2. Sugestões	- 34 -
Capítulo VI – Bibliografia.....	- 35 -
Anexos.....	- 39 -

Índice de Figuras

Fig. II.1 - Mecanismo da Regulação da secreção de Glicocorticóides (<i>in</i> Guyton & Hall, 1997).....	5
Fig. II.2 - Influência do Cortisol sobre o exercício e controlo positivo e negativo da secreção de Cortisol pelo o Hipotálamo (<i>in</i> Powers & Howley, 2001).....	5
Figura II. 3 - Padrão típico da concentração do cortisol durante um período de 24h (<i>in</i> Guyton & Hall, 1997).....	5
Figura II. 4 Variação da percentagem da concentração do cortisol plasmático com o aumento da intensidade do exercício (<i>in</i> Powers & Howley, 2001).....	7
Fig II.5 - Controlo da secreção da testosterona pelo hipotálamo e hipófise anterior. (<i>in</i> Powers & Howley).....	9
Fig. III.1 – Procedimento 8.....	21
Fig. III.2 – Procedimento 11.....	21
Fig. III.3 – Procedimento 1.....	22
Fig. III.4 – Procedimento 13.....	22

Formatada: Tipo de letra: (predefinido) Times New Roman, 12 pt, Itálico

Índice de Quadros

Quadro II.1 – Sistemas de produção de ATP. (<i>in</i> Fox, 1996).....	13
Quadro II.2 –Contribuições relativas para cada via energética em diferentes distâncias nadadas. (adaptado de Maglisho,2003).....	14
Quadro II.3 – Caracterização das zonas de treino. (adaptado de Maglisho,2003 e Navarro, 2001).....	15

Índice de Tabelas

Tabela III.1 – Nível Técnico. Mínimos, máximos, médias e desvios padrão (Idade Decimal; Anos de Treino; Volume de nado/ano; Prova mais Pontuada).....	17
Tabela III.2 – Caracterização Antropométrica. Mínimos, máximos, médias e desvios padrão (Altura, Envergadura, Massa Corporal, Somatório Pregas de Gordura, Índice de Massa Corporal).....	17
Tabela IV.1 – Parametros Cinemáticos em Teste. Mínimos, máximos, médias e desvios padrão (Velocidade Máxima, Velocidade Média e Percentagem da Velocidade Máxima de nado; frequência gestual média).....	25
Tabela IV.2 – Valores mínimos, máximos médias e desvios padrão da Frequência Cardíaca e da Lactatemia no protocolo 5 x 400L.....	26
Tabela IV.3 – Valores mínimos, máximos médias e desvios padrão do Cortisol Salivar ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). ao longo de 24 horas.....	26
Tabela IV.4 – Valores mínimos, máximos médias e desvios padrão da Testosterona Salivar ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) ao longo de 24 horas.....	28
Tabela IV.5 – Valores Mínimos, máximos, médias e desvios padrão do Racio Testosterona / Cortisol ao longo de 24 horas.....	30

Índice de Gráficos

Gráfico IV.1 – Variação da Concentração de Cortisol Salivar ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) ao longo das 24 horas.....	27
Gráfico IV.2 – Variação da Concentração de Testosterona Salivar ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) ao longo das 24 horas.....	29
Gráfico IV.3 – Variação do Racio Testosterona / Cortisol ao longo das 24 horas.....	31

Lista de Abreviaturas

ACTH – Hormona Adrenocorticotrofina
AMPc – Monofosfato Cíclico de Adenosina
ATP – Adenosina Trifosfato
CRF – Factor de Libertação da Corticotrofina
ELISA – “Enzime linked immuno – assay”
FC – Frequência Cardíaca
GnRH – Hormona Libertadora da Gonadotrofina
IMC – Índice de Massa Corporal
LH – Hormona Luteinizante
NPD – Natação Pura Desportiva
O₂ - Oxigénio
PC – Fosfocreatina
T/C – Testosterona/Cortisol
VO₂ máx – Consumo Máximo de Oxigénio

Lista de Anexos

Anexo 1 – Tabela do Atleta para o teste de Nado
Anexo 2 – Protocolo de Recolha das Amostras de Saliva
Anexo 3 – Dados para caracterização da Amostra
Anexo 4 – Kits Salimetrics (USA)
Anexo 5 – Resultados do Teste de Nado
Anexo 6 – Concentrações do Cortisol e da Testosterona Salivar
Anexo 7 – Ficha de Registo de Placas - ELISA
Anexo 8 – Tratamento Estatístico

Resumo

O seguinte estudo pretendeu analisar a resposta da Testosterona e do Cortisol a um protocolo de nado intervalado em condições experimentalmente controladas, e ao longo de 24 horas. Isto no sentido de monitorizar o comportamento de marcadores conhecidos da adaptação ao exercício.

A amostra foi constituída por doze nadadores de nível nacional com uma média de idades de $17,03 \pm 0,89$ anos, com um volume de treino médio anual de $1450 \pm 70,71$ Km, e com $7,08 \pm 1,16$ anos de competição. O protocolo do exercício de nado consistiu na realização de um esforço aeróbio, onde foram cumpridas cinco séries de 400 metros, com um intervalo de 45 segundos. Quanto às amostras de saliva (6), estas foram recolhidas antes do aquecimento, 15min após o teste, 1h 30min após o teste, 2h 30min após o teste, ao acordar no dia seguinte (7:30 a.m. aproximadamente) e por fim, 24h após o esforço. A análise estatística foi realizada recorrendo ao Teste Wilcoxon e foi estabelecido um nível de significância de 0,05.

Os valores do Cortisol salivar aumentam de forma estatisticamente significativa ($p=0,006$), 15min após o exercício. Após 1h 30min de recuperação os valores descem significativamente em relação aos obtidos 15 min após o esforço e, 2h 30min após o exercício, essa diminuição continua a ser significativa. A partir daqui verificou-se uma recuperação até à manhã seguinte para níveis idênticos aos pré teste, mantendo-se assim até ao final do tempo de estudo (24h após).

A resposta pós exercício da Testosterona (15min após) mostrou que os valores das concentrações salivares diminuem sendo que, 1h 30min e 2h 30min após o exercício essas diferenças para os valores pré teste são significativas. Vinte e quatro horas após o exercício não existem diferenças significativas dos valores pré exercício.

Os valores médios do Rácio T/C, 15min após o exercício, diminuíram significativamente ($p=0,015$) sendo que, 1h 30min e 2h 30min após o exercício, essas diferenças deixaram de ser significativas comparado-as com os valores iniciais. A partir daqui os valores aumentaram e ao levantar apresentavam-se idênticos aos de referência. Considerando que o rácio T/C poderá traduzir o equilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos este comportamento permite-nos pressupor que atletas sujeitos a este tipo de exercício pela tarde, poderão treinar sem limitação pela manhã.

Capítulo I - Introdução

O trabalho que apresentamos teve como base o estudo do comportamento da Testosterona e do Cortisol durante um período de 24 horas após a realização de um protocolo de nado em condições experimentalmente controladas. Este trabalho surge na continuação de outros já realizados em anos anteriores e tenta dar mais um contributo para a monitorização da resposta imunitária em momentos pré e pós exercício.

Este projecto de investigação justifica-se porque pretende acrescentar conhecimento relativo ao comportamento de marcadores conhecidos da adaptação ao exercício - Testosterona e Cortisol - em condições específicas de realização de tarefas habituais na preparação de atletas de Natação Pura Desportiva (NPD). Esta modalidade é, de certo modo, de difícil acesso por se realizar no meio em que se realiza mas ao mesmo tempo o seu carácter cíclico permite o controlo das variáveis de treino. Para além do exposto pretende-se ainda verificar se existe algum período do dia, em que os atletas sujeitos a este tipo de exercício, apresentam alterações significativas nas concentrações destas hormonas catabólicas (cortisol) e anabólicas (testosterona) tentando perceber se este equilíbrio é ou não afectado, num tipo de exercício particular, e se o é, até que ponto.

Optou-se pela recolha de saliva para o estudo destes parâmetros por ser um método pouco invasivo. Obminiski (1997), num estudo realizado com praticantes de karate, constatou que os resultados obtidos a partir de amostras de saliva se mostraram mais fiáveis do que os resultados obtidos através de amostras de plasma sanguíneo. Chatard (2002), relativamente ao Cortisol refere o mesmo.

Este trabalho será estruturado da seguinte forma:

Inicialmente serão apresentados alguns estudos já realizados na área da fisiologia do exercício, de forma a enquadrar correctamente este estudo na respectiva área do conhecimento. A pesquisa nesta área foi realizada recorrendo a manuais de referência da fisiologia (*Tratado de Fisiologia Médica*, Guyton & Hall, 1997; *Human Physiology*, Vander et al, 2001) e da fisiologia do exercício (*Fisiologia de la actividade y del deporte*, Gallego, 1992; *Exercise Fisiology – Theory and Application to fitness and Performance*, Powers et al, 2001); e consultando de forma exhaustiva motores de busca na Internet e nas bibliotecas, de forma a poder aceder às

publicações científicas de referência da área, dando preferência aos estudos mais recentes. É no entanto pertinente referir que são quase inexistentes, na literatura nacional e internacional, estudos que analisem o comportamento da Testosterona, Cortisol e Rácio Testosterona / Cortisol em resposta a este tipo de esforço. Assim, optamos por utilizar como referências trabalhos publicados centrados na resposta hormonal a diversos tipos de exercício.

De seguida será apresentada a metodologia seguida (amostra, caracterização das acções desenvolvidas para a recolha de dados), dando especial ênfase aos procedimentos laboratoriais já que foi a tarefa que mais relevo teve no nosso trabalho de campo e seguidamente serão apresentados e discutidos os resultados obtidos. Resultados esses recolhidos com o propósito de compreender os efeitos do exercício sobre a resposta da testosterona e do cortisol. Ficou patente a potencialidade deste procedimento na monitorização da adaptação do organismo ao esforço físico.

Por fim, apresentadas conclusões e sugestões para futuros estudos nesta área.

Capítulo II – Revisão da Literatura

A resposta hormonal ao exercício tem sido alvo de diversos estudos nos últimos anos e em muitos casos tenta-se associar a resposta hormonal aguda e crónica às variações do treino. Segundo Urhausen (2002) períodos de treino longos e a intensidades elevadas estão associados a alterações hormonais, imunológicas e hematológicas. Carli et al (1983), num estudo realizado com 8 rapazes nadadores entre os 12 e 16 anos de idade que se submeteram a treinos diversificados (fartlek, overdistance, intervalado, etc) também afirma que os níveis hormonais basais alteram-se com o treino. Bonifazi (1998) observou outro facto também importante ao acompanhar nove nadadores da selecção nacional italiana, após uma tarefa de nado aeróbio (15x200m com 20s de intervalo) a Adrenocorticotrofina (ACTH) e a Hormona de Crescimento aumentavam as suas concentrações mas, no entanto ao longo da época essas concentrações foram diminuindo. O mesmo autor, noutro estudo de 2000, observou que concentrações menores de cortisol em situações pré competitivas eram indício de uma melhoria da capacidade de desempenho. Outro exemplo de estudos nesta área é o realizado por Hoogeveen et al (1996), com dez ciclistas profissionais, em que concluem que níveis elevados de cortisol e níveis diminuídos de testosterona podem prever um decréscimo de qualidade da performance.

Existem três grandes famílias de hormonas, as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), os polipéptidos e glicoproteínas e ainda os esteróides (como o cortisol e a testosterona). Estas últimas são produzidas no córtex adrenal, nas gónadas sexuais ou na placenta durante a gravidez. As hormonas esteróides têm como precursor o colesterol que, embora também seja produzido pelas células que as segregam, na sua maioria advém do plasma sanguíneo.

O objectivo do nosso estudo reside na monitorização da resposta de duas hormonas, a Testosterona produzida nos testículos, e o Cortisol produzida no córtex adrenal, ao exercício (Vander et al., 2001; Adams, 2002).

1.Cortisol

A secreção do Cortisol está dependente da excitação do hipotálamo por diferentes tipos de stress. O hipotálamo, quando excitado, liberta o *factor de libertação da corticotrofina* (CRF) que actua sobre a hipófise anterior induzindo a libertação de ACTH. Esta hormona actua sobre a membrana das células do córtex adrenal induzindo a formação de Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPC) dentro do citoplasma que, por sua vez, activa as enzimas intracelulares que provocam a formação de hormonas adrenocorticais, entre elas o Cortisol. O Cortisol, por sua vez, inicia uma série de efeitos metabólicos destinados a diminuir o stress a que o hipotálamo está sujeito e, ao mesmo tempo, actua directamente sobre este. Ao actuar sobre o hipotálamo diminui a formação de CRF e, ao actuar sobre a hipófise anterior, diminui a produção de ACTH, o que leva à diminuição da concentração de Cortisol plasmático.

O Cortisol é uma hormona glucocorticóide que tem a sua acção metabólica em vários tecidos alvo. O efeito metabólico mais bem conhecido do cortisol é a sua capacidade de estimular a glicogénese no fígado. Este facto resulta de dois efeitos distintos desta hormona, o primeiro consiste no aumento das enzimas hepáticas necessárias à glicogénese, o segundo consiste na mobilização de aminoácidos de tecidos extra-hepáticos aumentando, conseqüentemente, a sua concentração no plasma e tornando-os disponíveis para o processo glicolítico do fígado. Além deste efeito o Cortisol causa também uma diminuição da taxa de utilização da glicose pelas células, e uma diminuição das reservas de proteínas em quase todas as células, excepto as hepáticas. Outro dos efeitos mais importantes do cortisol consiste no seu efeito anti-inflamatório, reduzindo todos os aspectos do processo inflamatório como: estabilizar as membranas lisossomais; diminuir a permeabilidade dos capilares e conseqüentemente evitar a perda de plasma para dentro de outros tecidos; diminuir a migração de leucócitos para dentro da área inflamada; ou baixar a febre. O Cortisol, assim como bloqueia a resposta inflamatória, também tem um efeito positivo sobre as alergias, já que muitos dos efeitos graves destas se devem à resposta inflamatória (Guyton & Hall, 1997).

Fig. II.1 - Mecanismo da Regulação da secreção de Glicocorticóides (in Guyton & Hall, 1997)

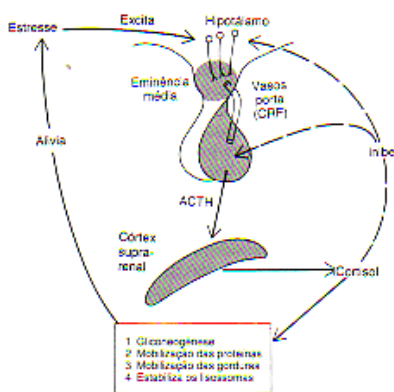
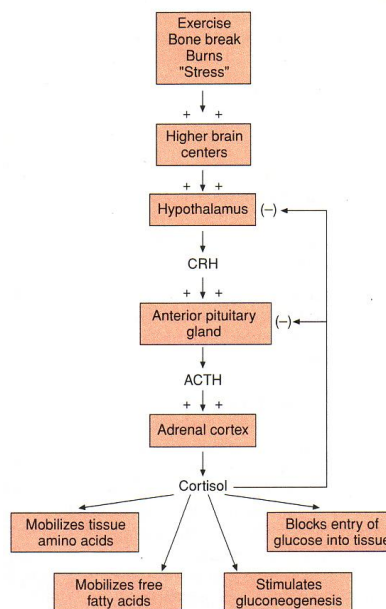


Fig. II.2 - Influência do Cortisol sobre o exercício e controlo positivo e negativo da secreção de Cortisol pelo o Hipotálamo (in Powers & Howley, 2001)

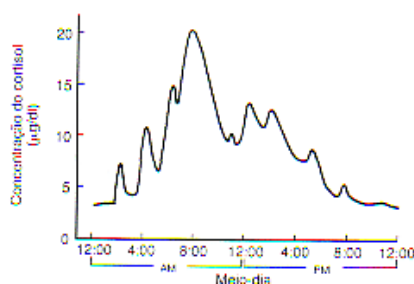


Formatada: Tipo de letra: (predefinido) Times New Roman, 10 pt, Itálico

Formatada: Tipo de letra: 10 pt

A secreção dos glucocorticoides varia ao longo do dia (ritmo circadiano), sendo as taxas de secreção de cortisol, mais altas de manhã cedo e mais baixas à tarde e noite (Lac et al. 1997). Este efeito resulta de uma alteração cíclica de 24h nos sinais a partir do hipotálamo que condicionam a secreção do cortisol. Sendo assim, os valores dos níveis de cortisol sanguíneo, só são significativas quando expressas em termos do momento do ciclo em que foram adquiridos (Guyton & Hall, 1997);

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



1.1 Cortisol e Exercício

O Cortisol desempenha um papel fundamental durante o exercício já que permite ao indivíduo manter os níveis de glicose no sangue. A actuação do Cortisol desenvolve-se a vários níveis: no tecido adiposo mobilizando ácidos gordos livres; bloqueando o aporte de glicose para os tecidos o que obriga a uma maior mobilização de ácidos gordos como fonte energética; no tecido proteico, inibido a síntese proteica, o que leva a uma produção de mais aminoácidos que por sua vez são metabolizados a nível hepático para a formação de glicose (neoglicogénese); e estimulando enzimas hepáticas envolvidas nas vias metabólicas que por sua vez também permitem a síntese de glicose (Vander et al., 2001).

Já existe um conjunto de trabalhos pretendem confirmar a elevação do Cortisol após exercício, entre eles um estudo realizado por Lac et al (1997) com nove estudantes de educação física (5 rapazes e 4 raparigas); com idades compreendidas entre os 19 e os 23 anos; e praticantes de actividade física regular (6 a 12h por semana), em que lhes foi pedido que pedalassem durante trinta minutos a uma intensidade de acima de 80% da frequência cardíaca máxima e acima de 70% do seu VO2 máximo. Concluíram que durante a realização deste tipo de exercício sub-máximo a concentração de Cortisol aumentou para o dobro. No entanto observa-se que antes do exercício começar já existe essa tendência, possivelmente devido ao stress pré-teste. Os valores encontrados no momento pré-exercício não apresentaram diferenças significativas para os valores de referência (valores obtidos às 10h da manhã e inferiores aos obtidos às 8h da manhã). Os níveis de cortisol apresentaram um aumento significativo a partir do começo do exercício e, ao contrário de exercícios onde a carga aplicada é constante, os níveis não continuaram a aumentar, tendo atingido um plateau, com concentrações duas vezes superiores às de referência. Após o término do exercício, ocorreu um novo aumento significativo dos níveis de cortisol. 1h30 depois de terminado o exercício, os valores sofreram uma diminuição aproximando-se dos níveis de referência (Lac et al, 1997).

Este comportamento também foi verificado por Hoogeveen (1996) ao realizar um teste sub-máximo em bicicleta com dez ciclistas profissionais, onde se constatou um aumento significativo da concentração de Cortisol plasmático. Pagano et al. (2005), encontrou a tendência do aumento do Cortisol, mas não para o dobro, em dez

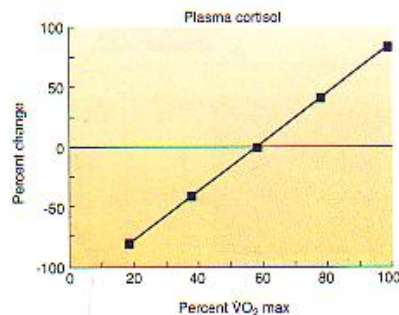
jogadores de futebol de salão após um jogo de duas partes de 30 minutos. Esse aumento continuava a verificar-se 24h depois da realização do exercício.

Chatard et al (2002), num estudo realizado com 9 nadadores de elite ao longo de 37 semanas, verificaram que o Cortisol aumentava as suas concentrações dependendo da distância de nado acumulada. Esse facto foi corroborado por Bonifazi (2000) ao concluir que a concentração do cortisol plasmático no final de uma época de natação era superior aos valores iniciais, alcançando valores máximos nas competições preparatórias e decrescendo antes das competições principais. Neste mesmo estudo verificou-se que a percentagem do aumento da velocidade individual de nado, desde as competições preparatórias até às principais, está negativamente correlacionado com o decréscimo da concentração de cortisol no período pré-competitivo, podendo esta diminuição ser um pré-requisito para a melhoria da performance do nado com características anaeróbicas.

Quanto à intensidade do exercício, se esta for superior a 60% do VO_2 máx., o cortisol plasmático aumenta de forma mais nítida quanto maior for a potência alcançada (Gallego, 1992), enquanto que para percentagens inferiores a concentração diminui (Powers & Howley, 2001).

Parece então ser aceite pela maioria dos autores que em períodos de exercício intenso os valores do cortisol são significativamente aumentados no entanto, por si só, não é um bom marcador para controlo do treino e da fadiga (Atlaoui, 2003).

Figura II. 4 Variação da percentagem da concentração do cortisol plasmático com o aumento da intensidade do exercício (in Powers & Howley, 2001)



Formatada: Tipo de letra: 10 pt

2. Testosterona

As hormonas esteróides, entre elas a Testosterona, são segregadas pelo córtex adrenal, participando na regulação mineral e no equilíbrio energético, e denominam-se por corticoesteróides. Estes agrupam-se em três categorias funcionais: mineralcorticoides (reguladores do equilíbrio do potássio e do sódio), glucocorticoides (reguladores dos mecanismos da glicose e de outras moléculas orgânicas) e os esteróides sexuais (androgéneos) que complementam as hormonas sexuais segregadas pelas gónadas. (Fox, 1996).

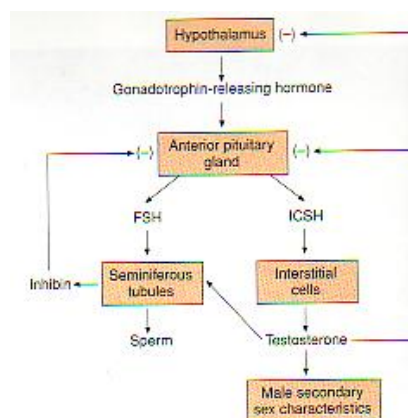
A Testosterona faz parte do grupo dos Androgénios (grupo de hormonas com efeitos masculinizantes), e é sintetizada a partir do colesterol ou, directamente, a partir da acetilcoenzima A. Dentro deste grupo, do qual também fazem parte a Dihidrotestosterona e a Androstenodiona, a Testosterona é tão mais abundante que pode ser considerada a hormona testicular mais importante. A Testosterona é formada nas *células intersticiais de Leyding*, que constituem cerca de 20% da massa testicular, e após ser secretada pelos testículos circula entre 30m a 1h na corrente sanguínea ligada à *albumina plasmática proteica* ou à *globina fixadora de hormonas sexuais*. A partir daqui, a Testosterona que se fixa aos tecidos é convertida dentro das células em dihidrotestosterona, a que não é fixada é convertida, essencialmente no fígado, em *androsterona* e *desidroepiandrosterona* que ligadas a sulfatos ou glicuronídeos, são excretadas através do intestino ou da urina. A acção da dihidrotestosterona nos tecidos alvo têm várias consequências como o aumento das Hemácias, o desenvolvimento muscular e ósseo ou o aumento do metabolismo basal mas no fundo, podemos resumir o seu efeito a um aumento da síntese proteica dentro das células dos tecidos alvo.

A secreção da Testosterona só existe se as *células intersticiais de Leyding* forem estimuladas pela *hormona luteinizante* (LH), aumentando a sua produção em proporção directa à quantidade de LH disponível. A LH, por sua vez, é secretada na Hipófise anterior quando esta é estimulada pela *hormona libertadora da gonadotrofina* (GnRH). O GnRH, produzido no hipotálamo, estimula a hipófise anterior de forma intermitente levando à produção de LH, também de forma cíclica, mas ao mesmo tempo a sua produção está dependente do efeito da Testosterona sobre o hipotálamo. Completa-se assim um ciclo em que a GnRH leva à produção de LH, que por sua vez leva à produção de Testosterona, que controla a produção da

primeira e conseqüentemente da segunda. Provavelmente o controlo da LH pela Testosterona não é apenas indirectamente mas também directamente sobre a hipófise anterior (Guyton & Hall, 1997).

Esta hormona tem uma taxa de secreção diária é de 4 a 9 mg, em indivíduos do sexo masculino adultos, e pequenas quantidades desta hormona são também segregadas no género feminino, tanto no ovário como nas supra-renais. Quanto ao comportamento desta hormona ao longo do dia, a sua secreção mantém um ritmo circadiano, sendo as concentrações médias da hormona menores pela manhã do que à tarde (Gallego, 1992)

Fig. II.5 - Controlo da secreção da testosterona pelo hipotálamo e hipófise anterior.
(Adaptado de Powers & Howley)



2.1 Testosterona e Exercício

A testosterona comporta-se perante o exercício físico de formas distintas. Se existir uma fadiga crónica os níveis de testosterona diminuem significativamente enquanto que os níveis de cortisol plasmático se elevam tal como foi referido anteriormente (Powers & Howley, 2001). No caso do exercício físico ser sub-máximo a testosterona plasmática aumenta as suas concentrações entre 10% a 37% (Vogel citado em Powers & Howley, 2001). Este facto também se verifica em actividade física máxima (Cumming et al, citados em Powers & Howley, 2001; Christou 2005), em treino aeróbio ou em treino de força (Jensen, et al citados em Powers & Howley, 2001). Obminski (1997) num estudo realizado com praticantes de

karate, afirma que existe um aumento significativo das concentrações de testosterona entre o dia pré prova e o dia da prova.

Quanto aos níveis basais da testosterona verifica-se, segundo Hackney et al. citados em Powers & Howley, 2001, que esses níveis são idênticos em indivíduos com capacidades aeróbias desenvolvidas ou em indivíduos com grandes massas musculares (fisioculturistas) no entanto os segundos parecem ter uma resposta aguda à testosterona mais elevada quando comparados com indivíduos menos treinados (Kramer et al., citados por Powers & Howley, 2001).

Bonifazi et al (1998) num estudo realizado com nadadores, após cumprirem uma tarefa aeróbia (15x200 metros crol com 20s de intervalo), em diferentes fases da época de natação, além de terem verificado o referido anteriormente também verificaram que a concentração testosterona aumenta imediatamente após o exercício mas, após a recuperação (1hora), volta a diminuir. Esse aumento no momento pós exercício também foi verificado por Hoogeveen et al (1996) num estudo realizado com 10 ciclistas profissionais, sujeitos a um exercício em cicloergómetro até à exaustão.

Existem no entanto estudos que contestam estes resultados afirmando que os aumentos das concentrações de testosterona se devem à redução do volume plasmático ou à diminuição da velocidade de inativação e remoção da testosterona (Terjung, citado em Powers & Howley, 2001).

Segundo Calbet et al (1993) num estudo realizado com ciclistas após um período de 6 meses de treino combinado e de competição, os níveis de testosterona salivar não tiveram um decréscimo significativo. Ao longo de várias semanas de treino intenso de nadadores, a testosterona diminui as suas concentrações plasmáticas (Tyndall, G. et al 1996; Bonifazi et al, 1998).

3. Racio Testosterona/Cortisol

O racio Testosterona/Cortisol (T/C) obtido através das concentrações presentes no sangue são muitas vezes considerados um indicador aproximado do estado anabólico/catabólico do atleta (Calbet, 1993) ou, em última análise, predictores de situações de “overtraining”, embora ainda existam poucas certezas e os estudos sejam de certa forma contraditórios. Alguns autores como Fry et al (1997)

e Urhausen et al (1998) dizem-nos que o rácio T/C é um bom marcador para prevenir o “overtrainig” (entendendo este como uma redução acentuada de capacidade de desempenho) visto que podemos verificar através desse valor o equilíbrio entre o anabolismo e o catabolismo. Banfi (1993), num estudo realizado com 8 patinadores de elite ao longo de uma época, verificou que a diminuição do rácio testosterona / cortisol sanguíneos, na ordem dos 30%, está relacionada com uma recuperação incompleta do exercício realizado, concordando com as ideias de Fry et al (1997) e Urhausen et al (2002). Além disto este autor ainda acrescenta que este marcador não é aplicável ao género feminino.

Corroborando com esta ideia, Chatard & Duclos (2004) dizem-nos que para o propósito de verificação da existência de “overtrainig”, este parâmetro será insuficiente já que a testosterona não é a única hormona com um papel importante no processo anabólico.

Num estudo realizado com corredores velocistas e fundistas por Simões et al (2004), os resultados sugerem que a razão T/C no sangue, é mais influenciada pelo volume de treino do que pela intensidade. Priit (2006), também nos diz que as variações, de concentração destas hormonas é mais sensível ao volume de treino, sendo que para ambas as variáveis o valor da razão T/C diminui após esforço.

Calbet (1993), pode concluir que os ciclistas profissionais, após um período de 6 meses de treino combinado e de competição, melhoram a sua capacidade aeróbia enquanto a sua capacidade anaeróbica se deteriorou, no entanto não detectou um decréscimo significativo nos níveis do rácio T/C salivares, embora este tenha sido de 29%.

4. Aspectos caracterizadores e especificidade do exercício de nado

A Natação Desportiva engloba cinco disciplinas, o Pólo Aquático, os Saltos para a Água, a Natação Sincronizada, Águas Abertas e a Natação Pura. No nosso caso quando falarmos de Natação estaremos a referir-nos à chamada Natação Pura.

A Natação é um desporto individual que se divide em várias “provas/categorias” em função da distância a percorrer e do estilo em que essa distância é percorrida. Independentemente disto a Natação tem como objectivo

principal percorrer uma determinada distância no menor tempo possível em determinada técnica ou técnicas (provas de estilos).

A Natação, por definição, é uma modalidade de resistência não só pelo tipo de competições oficiais (que têm durações e intensidades que mobilizam diferentes sistemas energéticos), mas também pelo tipo de treino que requer (grande densidade de trabalho dentro e fora de água) e pelas características dos nadadores de alto rendimento (que apresentam valores elevados de potência e capacidade aeróbia independentemente da especialidade de cada um) (Pereira, 1994; Alves, 2004).

4.1 Vias energéticas associadas ao exercício de nado

A Natação é uma modalidade essencialmente de resistência implicando a participação de diferentes vias de produção de energia. As reacções metabólicas que permitem ao organismo a transformação da energia podem ser divididas em dois tipos: as anabólicas, que requerem energia para acontecer e consistem na degradação de moléculas complexas como o glicogénio, lípidos ou proteínas; e as catabólicas, que libertam energia a partir da degradação de moléculas complexas em mais simples com a libertação de energia. A energia produzida é, em ambos os casos, em forma de Adenosina Trifosfato (ATP) (Vander et al, 2001; Fox, 1996; Powers & Howley, 2001).

Em exercício o organismo necessita de um fornecimento contínuo de ATP. Como é impossível armazenar a quantidade de energia necessária sob a forma de ATP, o corpo humano recorre a três vias metabólicas para a sua produção. De acordo com a generalidade dos autores de referência as vias energéticas são três, duas que não requerem a presença de oxigénio e por isso consideradas Anaeróbias (Via anaeróbia aláctica - Sistema ATP-Fosfocreatina (PC) e Via anaeróbia Láctica - Sistema de Ácido Láctico) e uma terceira que requer a presença de oxigénio (Via Aeróbia - Sistema Oxidativo) e por isso considerada Aeróbia (Maglisho 2003).

A via anaeróbia aláctica consiste na transformação de PC, armazenado nos músculos, em ATP sendo a primeira a ser utilizada e tendo uma duração bastante curta, 4 a 5 segundos (Maglisho, 2003).

Uma vez esgotada esta via, o organismo recorre às reservas de glicogénio dos músculos para a ressíntese das reservas de ATP e PC – via anaeróbia láctica. Os factores limitativos desta via são a acumulação do ácido láctico, pela impossibilidade de remoção dos seus produtos (piruvato e H^+) na ausência de oxigénio, e a sua duração que é apenas entre 30 segundos e 2 minutos (Castelo, 1996).

Se a necessidade de fornecer energia às células continuar, a única via disponível é a aeróbia que consiste na metabolização de glicose e gorduras. Esta via energética é praticamente inesgotável, embora lenta, podendo ser utilizada sempre que exista oxigénio e substratos passíveis de oxidação, no entanto tem como limitadores as funções orgânicas que condicionam o consumo de oxigénio (captação pulmonar, fixação alveolar e capilar, velocidade do transporte pelo sistema cardiovascular, e utilização ao nível da célula muscular) (Gastin, 2001; Castelo, 1996).

Quadro II.1 – Sistemas de produção de ATP. (adaptado de Fox, 1996)

Sistemas	Combustível Químico	O ₂ Necessário	Velocidade	Produção de ATP	Potência Máxima ATP
Anaeróbio Sistema ATP-PC	Fosfocreatina	Não	Imediata	Pouca Limitada	3,6 mol/min
Anaeróbio Sistema de Ácido Láctico	Glicogénio (glicose)	Não	Rápida	Pouca Limitada	1,6 mol/min
Aeróbio Sistema oxidativo	Glicogénio, Gorduras, Proteínas	Sim	Lenta	Muita Ilimitada	1,1 mol/min

As três vias energéticas não funcionam separadamente e é o contributo de todas que permite a produção de energia para a resposta muscular quando o atleta cumpre todo o tipo de distâncias, a diferentes velocidades. Maglisho (2003) estimou que num exercício aeróbio realizado à máxima intensidade a contribuição da via aeróbia é bastante elevada, a contribuição da via anaeróbia láctica é ligeira enquanto que a contribuição da via anaeróbia aláctica é negligenciável.

Quadro II.2 – Contribuições relativas para cada via energética em diferentes distâncias nadadas.

(adaptado de Maglisho, 2003)

Distância	Duração do Esforço	% Via Anaeróbia Aláctica	% Via Anaeróbica Láctica	Via Aeróbia	
				% metabolismo glucolítico	% metabolismo Lipídico
25 m	10 – 15 seg	50	50	Neg	Neg
50 m	19 – 30 seg	20	60	20	Neg
100 m	40 – 60 seg	10	55	35	Neg
200 m	1:30 – 2 min	7	40	53	Neg
200 m	2 – 3 min	5	40	55	Neg
400 m	4 – 6 min	Neg	35	65	Neg
800 m	7 – 10 min	Neg	25	73	2
900 m	10 – 12 min	Neg	20	75	5
1.500 m	14 – 22 min	Neg	15	78	7

Neg- Negligenciável

4.2 Zonas de Intensidade de treino

A melhoria da resistência do atleta, ou seja um aumento da sua capacidade aeróbia e anaeróbia, pressupõe a sujeição a estímulos prolongados. Para isto deve-se aumentar o volume ou a intensidade ou ainda, reduzir o descanso. É portanto através do treino que se aperfeiçoam as capacidades metabólicas requeridas em determinada prova.

Segundo Maglisho (2003) podemos definir diferentes zonas de intensidade do treino recorrendo aos valores de lactémia no sangue, à percentagem de VO_2 máx. e à velocidade de execução. Navarro, (2001) propõe valores de lactémia e frequências cardíacas para o controlo da zona de treino em que o atleta se encontra. Para Sweetenham et al (2003) essas intensidades de treino podem ser avaliadas de forma mais facilitada a partir da frequência cardíaca. Neste sentido apresentam-se de seguida, em forma de tabela alguns desses valores.

Quadro II.3 – Caracterização das zonas de treino. (adaptado de Maglisho, 2003 e Navarro, 2001)

Zonas de Treino		Frequência Cardíaca	Lactémia (mmol.l ⁻¹)	% VO ₂ máx.	Velocidade
Aeróbio	Aeróbio Ligeiro – A1	120 – 150	2-3	50 – 80	Baixa
	Aeróbio Moderado – A2	150 – 180	3,5 – 4,5	80 – 90	Média
	Aeróbio Intenso – A3	> 180	4,5 – 10	> 90	Média Alta
Anaeróbio Lático	Tolerância Láctica – TL	Máxima	> 6	+/- 90	Alta Sub-Máxima
	Máxima Produção Láctica – MPL	Máxima	> 10	+/- 95	Alta Sub-Máxima
Anaeróbio Alático	Velocidade	Sub-máxima	2- 3	+/- 95	Máxima

Com o evoluir da natação surgiram vários métodos de treino que permitem desenvolver a resistência de modo mais objectivo quer a nível pedagógico quer científico. Assim, os métodos de treino podem ser classificados genericamente em dois tipos:

Métodos contínuos

Uniforme – caracterizado por esforços de longa duração e índices externos da carga (velocidade) constantes.

Variado – caracterizado pela realização de esforços prolongados, durante os quais se procede a variações significativas de intensidade mas sem que se chegue a parar efectivamente a actividade.

Método por Intervalos

Repetições – com pausa completa

Intervalado – com pausa incompleta

4.3 Nado Intervalado

O treino aeróbio em natação tem como objectivo principal a melhoria da capacidade aeróbia, permitindo ao atleta nadar mais rápido com o menor contributo possível das vias anaeróbias. Este tipo de treino permite ao atleta em situação de competição reduzir a acumulação de ácido láctico assim como fazer mais facilmente a sua remoção, em suma, evita o aparecimento precoce da fadiga (Maglisho, 2003). Com o evoluir da modalidade surgiram vários métodos de treino e um deles, o treino intervalado que teve como pioneiros na sua sistematização Reindell & Gerschler em 1960 (citados por Alves, 2004). A sua versatilidade na organização da carga tendo em vista as adaptações funcionais pretendidas faz dele um método de aplicação praticamente universal. O método de treino por intervalos com pausas incompletas (treino intervalado) é caracterizado por períodos de repouso que não permitem a recuperação completa dos parâmetros cardiovasculares e ventilatórios. Este tipo de treino tem três componentes, a intensidade, o período de esforço (repetição) e a pausa entre repetições. As variações da carga, da pausa, do volume total ou da intensidade da tarefa, variam consoante a zona de treino que se pretende trabalhar.

As vantagens apontadas para este método são: a possibilidades de alcançar um maior volume de trabalho e ao mesmo tempo com maiores intensidades (chega a ser 2,5 vezes superior às realizadas em método contínuo); a sua proximidade com o perfil metabólico da competição em modalidades de esforço intermitente (Alves, 2004); a possibilidade de ser utilizado para recrutar especificamente fibras de contração rápida; e ganhos de VO_2 máx. idênticos aos do método contínuo.

Capítulo III – Metodologia

1. Caracterização da Amostra

Para a realização deste estudo foi pedida a participação e colaboração de 12 atletas do sexo masculino, todos eles praticantes de Natação Pura de elevado rendimento.

Tabela III.1 – Nível Técnico. Mínimos, máximos, médias e desvios padrão (Idade Decimal; Anos de Treino; Volume de nado/ano; Prova mais Pontuada).

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Idade Decimal (anos)	15,33	18,64	17,03	0,891
Anos de Treino (anos)	5	9	7,08	1,16
Volume de nado/ano (km)	1400	1500	1450	70,71
Prova mais Pontuada*	585	760	674,08	51,47

* Pontuação das Provas obtida a partir da “International Point Score SC 2004”

A amostra é constituída por indivíduos com uma média de idades igual a 17,03 anos ($\pm 0,891$ anos), em que o mais novo tem 15 e o mais velho tem 18 anos. Estes indivíduos apresentam alguma experiência a nível competitivo, em média 7,08 anos de treino ($\pm 1,16$ anos) e um volume de nado médio anual de 1450 km ($\pm 70,71$).

Tabela III.2 – Caracterização Antropométrica. Mínimos, máximos, médias e desvios padrão (Altura, Envergadura, Massa Corporal, Somatório Pregas de Gordura, Índice de Massa Corporal).

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Altura (cm)	164,50	191,60	177,11	7,17
Envergadura (cm)	171,00	194,00	182,17	8,54
Massa Corporal (Kg)	55,20	79,60	66,45	7,17
Σ Pregas (mm)	32,00	69,00	47,25	10,36
IMC (Kg/m²)	18,90	23,60	21,17	1,65

Quanto à composição corporal a caracterização da amostra foi realizada com base em dados de medidas antropometrias como a altura, massa corporal, envergadura e somatório das pregas de gordura subcutânea com a finalidade de

determinar o seu somatório (Sobral, F., & Silva, M., 1997). Verificou-se que os indivíduos apresentam valores para a altura e envergadura, abaixo da média dos nadadores de elite do sexo masculino portugueses (Rama, 2004), mas concluiu-se que a amostra era reactivamente homogénea.

2. Procedimentos no Terreno

Antes da recolha dos dados, cada indivíduo foi informado acerca de todos os procedimentos a que iriam ser submetidos, tendo os maiores de idade dado o seu consentimento por escrito, enquanto que nos menores esse consentimento foi dado pelos seus encarregados de educação. Cada um foi avaliado isoladamente e num único dia.

2.1 Teste de Nado

Antes de realizar o teste foram determinadas as seguintes tarefas como aquecimento:

- 600 N (75 Crol. 25 Estilo) + 300 Crol (50 Normal. 25 Técnica. 50 Normal. 25 Rápido)
- 200 pernas Estilo s/ prancha + 6x50 pernas Crol cd 1'10''
- 300 braços Crol (50 Alongar. 25 Progressivo)
- 4x50 Técnica Nado cd 1' (1 Vel Partida. 2 Vel Viragem. 1 Vel Nado)
- 100 Suave

O teste de nado intermitente consistiu numa série aeróbia de 5 x 400 metros Crol, com um descanso de 45 segundos entre cada série, e em regime aeróbio ligeiro (A2). A intensidade seria portanto à volta de 75% da velocidade máxima concordando com o proposto por Navarro (2001) e Maglisho (2003) para as zonas de intensidade de treino. Todas estas indicações foram dadas aos atletas de forma a que estes ajustassem o seu desempenho ao esforço pedido.

No final do teste, foi colocado no sujeito um cardio-frequencímetro POLAR® S810, para que fosse possível registar a frequência cardíaca com precisão.

2.2 Recolha de Saliva

Foram dadas indicações prévias aos indivíduos no sentido de que estes não bebessem água, mastigassem pastilhas ou escovassem os dentes na hora anterior à sua realização. Além disto foi-lhes entregue o protocolo de salivação de forma a garantir a fiabilidade das amostras. 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.

Foram recolhidas seis amostras de saliva em seis momentos distintos: 1º momento – antes do aquecimento; 2º momento – 15 minutos após o teste; 3º momento – 1h30min após o teste; 4º momento – 2h30min após o teste; 5º momento – na manhã seguinte, 6º momento – 24h após a aplicação do teste.

Após o teste foram também recolhidas micro amostras de sangue para a determinação dos níveis de lactato no sangue.

3. Procedimentos em Laboratório

A segunda fase deste 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 presentes nelas.

3.1 Enquadramento Temporal

As amostras de saliva foram analisadas em dois momentos distintos e passaram por vários procedimentos laboratoriais. No primeiro momento foi analisada a hormona cortisol, no segundo foi analisada a hormona testosterona.

3. 2 Cortisol Salivar

O método utilizado foi o ELISA competitivo (Salimetrics, USA) com os seguintes princípios:

Cada poço tinha uma microplaca revestida com anticorpos do cortisol. O Cortisol standart, tal como o existente nas amostras, competem com o cortisol ligado a uma peroxidase pelas ligações ao anticorpo. Após a incubação os componentes em excesso são lavados e desperdiçados. A quantidade de cortisol peroxidase é medida pela reacção da peroxidase no substrato tetrametilbensidina (TMB). Esta reacção produz uma cor azul que passa a amarela depois se adicionar a stop solution (ácido sulfúrico). A densidade óptica foi medida num leitor de ELISA (Elx 800) a 450 nm. A quantidade de peroxidase detectada é inversamente proporcional à quantidade de cortisol presente.

Procedimentos:

1. Descongelar as amostras de saliva.
2. Misturar as amostras, no *Minishaker Modelo MS 2 Ika*, na rotação máxima.
3. Centrifugar, durante 15 minutos, à temperatura de 4°C, a uma rotação de 3000rpm na *Labofuge 400 R Heraeus*.
4. Colocar por ordem as amostras.
5. Realizar a grelha dos poços:
 - a) os standards
 - b) os zeros
 - c) NSB (poços azuis, que não possuíam anticorpos)
 - d) 1 control H (concentração elevada) e um control L (concentração baixa)
 - e) as diferentes amostras nos vários momentos.
6. Pipetar 25 microlitros de standards, zeros, e amostras para os poços.
7. Preparar 24 mililitros da solução diluente, juntamente com 15 microlitros de cortisol conjugado com *horseradish peroxidase*.

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



Fig. III.1 – Procedimento 8 ▲



Fig. III.2 – Procedimento 11 ▲

Formatada: Tipo de letra: 10 pt

Formatada: Tipo de letra: 10 pt

3.3 Testosterona Salivar

O método utilizado foi um ELISA competitivo (Salimetrics, USA) com princípios idênticos aos do cortisol.

Procedimentos:

1. Descongelar as amostras
2. Realizar a grelha com o número de amostras;
3. Diluição em série (150 microlitros no 1º tubo, 100 microlitros no 2º, 100 microlitros no 3º tubo e assim sucessivamente);
4. Passar o standard pela salivete, deixar absorver e depois centrifugar durante 15 minutos na *Labofuge 400 R Heraeus*;
5. Pipetar 50 microlitros de standards e amostras para os poços;
6. Preparar 18 mililitros de solução diluente, juntamente com 7 microlitros de testosterona conjugada com *horseradish peroxidase*;
7. Colocar em cada poço 150 microlitros da solução conjugada anterior;
8. Colocar os poços no rotador durante 5 minutos (500 rpm), e deixar a encubar durante 55 minutos à temperatura ambiente.
9. Lavar os poços 4 vezes, com a solução de lavagem (50 mililitros de Wash Buffer Concentrate em 500 mililitros de água ultra-pura).
10. Coloca-se o substrato (tetrametilbezidina) nos poços, vai durante 5 minutos ao agitador de placas e fica depois 25 minutos em repouso.
11. Após os 30 minutos, coloca-se 50 microlitros da STOP solution em cada poço.
12. Seguidamente vai durante 3 minutos ao agitador de placas.
13. Por último, coloca-se no aparelho *Leitor de Elisa* para determinar a densidade óptica de cada amostra.



Fig. III.3 – Procedimento 1



Fig. III.4 – Procedimento 13

Formatada: Tipo de letra: 10 pt

Formatada: Tipo de letra: 10 pt

4. Procedimentos Estatísticos

Para análise e tratamento estatístico dos dados foram usados os programas informáticos *Microsoft Office Excel* e *Statistical Package for Social Sciences – SPSS versão 12.0*, para *Windows*.

Para a caracterização antropométrica dos atletas assim como do treino foi usada a Estatística Descritiva recorrendo à média, como medida de tendência central, e ao desvio padrão e mínimos e máximos como medidas de dispersão.

Como a amostra era bastante reduzida e algumas das variáveis não cumpriam a normalidade na distribuição, optamos pela estatística não paramétrica recorrendo ao teste de Wilcoxon. Para todas as variáveis estudadas nos procedimentos inferenciais foi assumido um nível de significância de $p \leq 0,05$.

Capítulo IV – Apresentação e Discussão de Resultados

Neste capítulo serão apresentados os resultados do nosso estudo respeitando a seguinte ordem: i) parâmetros cinemáticos do exercício realizado (velocidade média de nado, frequência gestual média); ii) parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca e níveis de lactato); iii) parâmetros hormonais (concentrações nos diferentes momentos de cortisol, testosterona e ratio testosterona/cortisol).

1. Parâmetros Cinemáticos

Tabela IV.1 – Parâmetros Cinemáticos em Teste. Mínimos, máximos, médias e desvios padrão (Velocidade Máxima, Velocidade Média e Percentagem da Velocidade Máxima de nado; frequência gestual média).

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Velocidade Máxima (m.s⁻¹)	1,58	1,78	1,71	,057
Velocidade Média Nado (m.s⁻¹)	1,20	1,34	1,28	,039
% Velocidade Nado	71,50	77,89	74,99	2,30
Frequência Gestual (c.min⁻¹)	21,57	29,95	24,79	2,47

Como podemos observar na **tabela IV.1** a velocidade de nado média no exercício proposto foi de $1,28 \pm 0,039$ m.s⁻¹. Este valor corresponde a $74,99\% \pm 2,30\%$ da velocidade máxima média ($1,71 \pm 0,057$ m.s⁻¹). Estes valores são considerados pela literatura revista como típicos para uma exercício intervalado de nado aeróbio básico (Maglischo, 2003; Navarro 2001).

Quanto à frequência gestual os sujeitos observados obtiveram valor médios de $24,79 \pm 2,47$ (c.min⁻¹). O reduzido desvio padrão apresentado pelos elementos da amostra sugerem estabilidade no padrão gestual empregue, não constituindo por isso elemento perturbador na análise dos resultados.

2. Parâmetros Fisiológicos

Os valores para a frequência cardíaca média foram de $160, \pm 8$ bpm e os níveis de Lactato capilar foram de $3,63 \pm 1,46$ mmol.l⁻¹ o que vai ao encontro dos valores propostos para estes parâmetros por Maglisho (2003) e Navarro (2001) para a zona de treino aeróbio ligeiro a moderado (ver Tabela I.3).

Tabela IV.2 – Valores mínimos, máximos médias e desvios padrão da Frequência Cardíaca e da Lactatemia no protocolo 5 x 400L.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Frequência Cardíaca (bpm)	144,00	174,00	160,92	8,67
Lactato (mmol.l⁻¹)	2,10	7,10	3,63	1,46

Tendo-se verificado estes valores podemos considerar que o protocolo foi adequado ao objectivo do estudo.

3. Parâmetros Hormonais

3.1 Cortisol

No nosso estudo verificamos que **15 minutos após** o exercício os valores médios de cortisol salivar aumentaram significativamente ($p=0,006$), e atingiram um pico com valores médios de $3989,90 \pm 2739,64$ µg.ml⁻¹. A partir deste ponto os valores começaram a diminuir e **1h 30min após** apresentavam valores idênticos aos de referência. A concentração de cortisol salivar continuou a diminuir significativamente até **2h 30min após** o exercício ($p=0,026$), altura em que voltou a subir até alcançar valores de referência **Ao levantar**.

Tabela IV.3 – Valores mínimos, máximos médias e desvios padrão do Cortisol Salivar (µg.ml⁻¹). ao longo de 24 horas.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Antes	407,93	3068,14	1504,24	766,86
15 min após	882,71	9609,80	3989,90	2739,64
1h 30min após	474,32	7582,36	1959,01	1991,36
2h 30min após	469,24	1889,64	972,75	548,91
Ao levantar	135,00	8117,65	2354,27	2267,27
24h após	745,65	5071,89	2017,28	1291,47

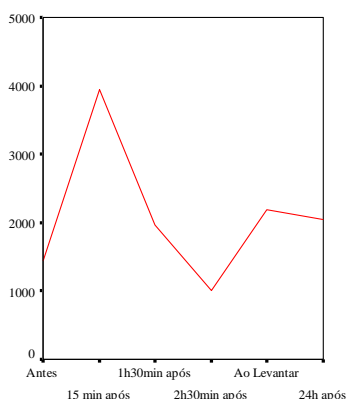
Os resultados obtidos no nosso estudo, **1h 30min após** o exercício, não apresentam diferenças significativas dos valores de referência e parecem concordar com os valores obtidos por Lac (1997), que também verificou resultados idênticos aos de referência neste momento, e com os de Hoogeveen (1996) que também verificou o mesmo comportamento. No entanto é de realçar que os exercícios realizados, embora sub-máximo e cíclico, foram realizados em cicloergómetro.

Quanto aos resultados obtidos por Pagano et al., (2005), que encontrou a tendência do aumento do Cortisol após um jogo de futebol de duas partes de 30 minutos, os nossos resultados também vão nesse sentido, já que se verificaram diferenças significativas entre os momentos **Antes** e **15min pós** esforço ($Z = -2,746$ e $p = 0,006$), no entanto, ao contrário do que Pagano constatou, **24h após** o exercício esse aumento já não se verificava ($p > 0,05$). Esta diferença pode estar relacionada com a diferença de duração do esforço, o que nos poderá levar a pensar que quanto maior for essa duração, maior será o tempo de recuperação.

Os resultados por nós obtidos estão, de forma indirecta, em concordância com os obtidos por Bonifazi (1998). No nosso estudo verifica-se um aumento da concentração de Cortisol plasmático imediatamente após a realização da tarefa enquanto no estudo de Bonifazi se verifica um aumento da ACTH (hormona precursora da secreção de Cortisol).

Chatard et al (2002) e Bonifazi (2000) verificaram que as concentrações do cortisol plasmático sofriam um incremento com a distância de nado acumulada, o que também foi verificado neste estudo para um momento pós exercício.

Gráfico IV.1 – Variação da Concentração de Cortisol Salivar ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) ao longo das 24 horas



Por fim é importante referir que os resultados obtidos **2h 30 minutos após** o esforço foram recolhidos ao fim de tarde/noite e nessa altura seria de esperar, segundo o ciclo circadiano descrito por Lac et al (1997), níveis de Cortisol mais baixos do que pela manhã. Este facto que não se verificou já que os valores médios da concentração de Cortisol salivar não apresentaram diferenças significativas entre estes dois momentos.

3.2 Testosterona

No nosso estudo verificamos que, **15 minutos após** o exercício os valores médios de testosterona salivar diminuíram, mas não significativamente. No entanto **1 hora e 30 minutos após** e **2 horas e 30 minutos após** essas diferenças já eram significativas ($p=0,028$ e $p=0,015$ respectivamente), quando comparadas com os valores de referência. A partir daqui, os valores começaram a aumentar sendo que **Ao levantar** apresentavam-se idênticos aos de referência.

Tabela IV.4 – Valores mínimos, máximos médias e desvios padrão da Testosterona Salivar ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) ao longo de 24 horas.

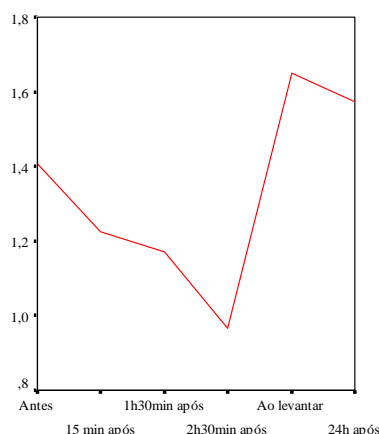
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Antes	90,33	214,29	140,63	36,55
15 min após	79,06	200,94	122,48	32,98
1h 30min após	59,19	199,11	116,90	44,97
2h 30min após	46,40	168,75	96,69	36,90
Ao levantar	87,47	234,92	164,88	44,68
24h após	104,64	263,52	157,39	45,39

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com a ideia de que a testosterona diminui as suas concentrações entre 10 a 37%, como afirma Vogel (citado em Powers & Howley, 2001), após um esforço sub-maximal. No nosso caso a diminuição média das concentrações salivares de testosterona foi de 12,91% no momento **15 minutos após**, de 16,87% no momento **1 hora e 30 minutos após** e de 31,25% no momento **2 horas e 30 minutos após**. É no entanto importante referir que a diminuição em percentagem da concentração de testosterona, encontrada por Vogel, refere-se à testosterona plasmática, mas que essa diminuição também se verificou no nosso estudo mas para a concentração salivar. Bonifazi et al (1998), num dos poucos estudos em que os valores da testosterona são também medidos pós

exercício, verificaram que a concentração de testosterona aumenta imediatamente após o exercício, o que não se verificou na nossa amostra (não houve uma variação significativa). No entanto, os valores obtidos **1 hora e 30 minutos após** vão ao encontro dos obtidos por Bonifazi (1998) 1h depois do exercício, ou seja, existe uma diminuição significativa da concentração da testosterona salivar.

Existem estudos como o de Terjung (citado em Powers & Howley, 2001) que contestam estes resultados, afirmando que os aumentos das concentrações de testosterona se devem à redução do volume plasmático ou à diminuição da velocidade de inativação e remoção da testosterona, no entanto, o nosso estudo, não estando sujeito às variações de volume plasmático acaba por contrariar de certa forma estas teorias. Isto sabendo à partida que, os valores obtidos através de saliva, serão mais fiáveis do ponto de vista fisiológico (Obminski, 1997).

Gráfico IV.2 – Variação da Concentração de Testosterona Salivar (pg.ml^{-1}) ao longo das 24 horas



Ao levantar, os níveis de testosterona encontrados foram superiores aos encontrados ao fim de tarde/noite, o que nos permite concluir que este tipo de exercício altera o ritmo de secreção da testosterona previsto na literatura (Gallego, 1992). Através da análise dos resultados obtidos **24 horas após** podemos verificar que não existiram diferenças significativas para os valores **Antes** do exercício. Isto permite-nos prever que este tipo de protocolo, quando aplicado durante o processo de treino, não influencia significativamente as concentrações de testosterona. Ideia

partilhada com Calbet (1993) que também afirma que o treino combinado e a competição, não afectam significativamente a concentração da testosterona salivar.

4.3 Racio Testosterona / Cortisol

Verificou-se que, **15 minutos após** o exercício os valores médios do Rácio Testosterona / Cortisol diminuíram significativamente ($Z = -2,432$; $p = 0,015$). No entanto, **1 hora e 30 minutos após** e **2 horas e 30 minutos após** essas diferenças deixaram de ser significativas quando comparadas com os valores iniciais. A partir daqui, os valores começaram a aumentar sendo que **Ao levantar** apresentavam-se idênticos aos de referência.

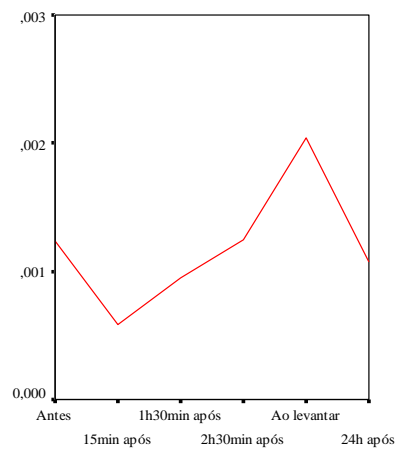
Tabela IV.5 – Valores Mínimos, máximos, médias e desvios padrão do Racio Testosterona / Cortisol ao longo de 24 horas.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Antes	,06	,28	,119	,068
15 min após	,01	,16	,056	,050
1h 30min após	,01	,17	,095	,045
2h 30min após	,04	,21	,121	,061
Ao levantar	,03	,73	,190	,226
24h após	,03	,22	,106	,061

A diminuição da razão T/C verificada por nós no momento **15 minutos após** corrobora a ideia de Simões et al (2004). Quanto aos valores obtidos **24 horas após** o exercício acabam por ir ao encontro do defendido por Calbet (1993) que não detectou um decréscimo significativo nos níveis do racio testosterona / cortisol ao longo de um período de treino combinado e competições. Estes factos permitem-nos supor que este tipo de treino intervalado, embora conduza a uma diminuição do racio Testosterona / Cortisol o que poderá representar uma diminuição da capacidade de desempenho, não o faz de forma tão acentuada que não permita uma recuperação para o dia seguinte. Isto poderá ser interessante para o planeamento do treino, já constatamos que os indivíduos testados apresentaram no dia seguinte um decréscimo

de 10,92% no rácio o que, segundo Banfi (1993), não é suficiente para existir uma situação de recuperação incompleta. Supondo que os nadadores realizem este tipo de esforço pela tarde, na manhã seguinte não se vêem “impedidos” fisiologicamente de treinar na manhã seguinte.

Gráfico IV.3 – Variação do Rácio Testosterona / Cortisol ao longo das 24 horas



Capítulo V – Conclusões e Sugestões

Neste capítulo serão reunidas as principais conclusões do nosso estudo acerca do comportamento do Cortisol e da Testosterona Salivar ao longo das 24h, após um exercício de nado intervalado (descrito anteriormente) a que a amostra foi sujeita. Além disto, deixaremos algumas sugestões para aprofundar o conhecimento acerca do comportamento da testosterona e do Cortisol em resposta ao exercício, e como estes dois parâmetros poderão ser usados no controle do treino.

1. Conclusões

Verificamos que os valores do Cortisol salivar aumentam de forma estatisticamente significativa em resposta aguda ao exercício (15 minutos após).

Aproximadamente 1 hora e 30 minutos após o exercício, os valores descem significativamente em relação aos obtidos 15 minutos após o esforço, no entanto não apresentam diferenças significativas para os valores pré teste. No momento seguinte, 2h 30min após o esforço, essa diminuição continua a ser significativa, mas continua a não apresentar diferenças significativas para os valores pré teste. A partir daqui verifica-se uma recuperação, até à manhã seguinte, para níveis idênticos aos pré teste mantendo-se assim até 24 horas após o teste.

A resposta pós exercício (15 minutos após) da Testosterona mostrou que os valores das concentrações salivares diminuem mas não de forma significativa. No entanto 1 hora e 30 minutos e 2 horas e 30 minutos após o exercício essas diferenças são significativas, quando comparadas com os valores de referência. No nosso estudo a diminuição média das concentrações salivares de testosterona foi de 12,91% **quinze minutos após** esforço, de 16,87% **uma hora e trinta minutos após** esforço e de 31,25% **duas horas e trinta minutos após** esforço.

No entanto os resultados obtidos 24 horas após o exercício permitem-nos constatar que não diferem significativamente dos valores pré exercício.

Este comportamento permite-nos supor que desde que respeitado um período normal de repouso (\pm 12 horas), este tipo de exercício, não influencia significativamente as concentrações de testosterona.

Os valores médios do Rácio Testosterona / Cortisol 15 minutos após o exercício diminuíram significativamente. No entanto, 1 hora e 30 minutos e 2 horas e 30 minutos após o exercício essas diferenças deixaram de ser significativas quando comparadas com os valores iniciais. A partir daqui, os valores começam a aumentar sendo que ao levantar apresentavam-se idênticos aos de referência.

Considerando que o rácio T/C poderá traduzir no organismo o equilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos este comportamento permite-nos pressupor que atletas sujeitos a um regime de treino bi-diário quando sujeitos a este tipo de exercício pela tarde, poderão treinar sem limitação pela manhã.

2. Sugestões

Com a intenção de alargar a informação recolhida em futuros estudos, e partindo dos resultados obtidos e da revisão da literatura realizada, sugere-se que futuros trabalhos adotem os seguintes procedimentos:

- Realizar a recolha das amostras de saliva com os mesmos indivíduos no final de uma fase de recuperação, sem esforços físicos, de modo a poder comparar-se a variação das concentrações da Testosterona e do Cortisol em resultado do exercício, com os níveis basais do indivíduo;
- Realizar o mesmo estudo com uma amostra mais alargada;
- Realizar o estudo com atletas do sexo feminino.
- Controlar o aporte nutricional e o uso de fármacos;
- Realizar o mesmo tipo de estudo em situação de competição e relacionando o Rácio Testosterona / Cortisol com a performance;

Capítulo VI – Bibliografia

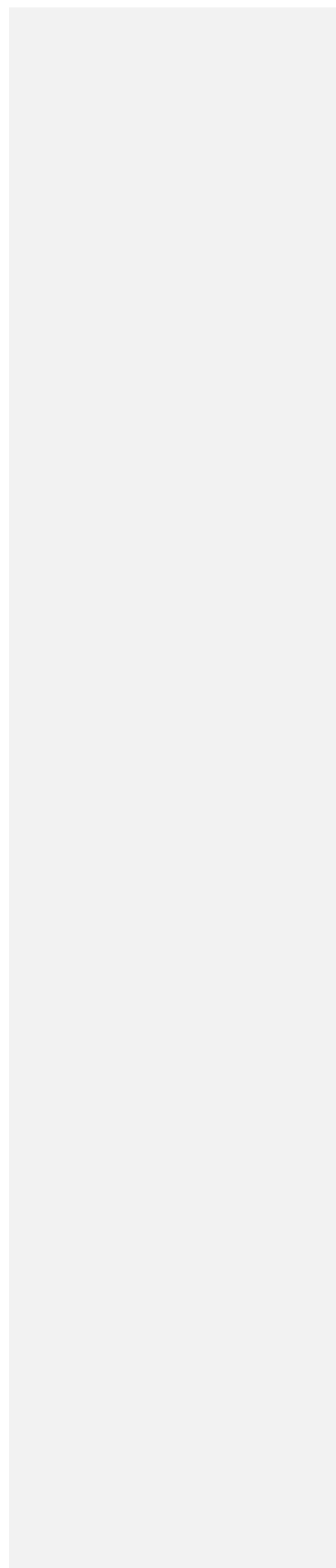
- Adams, G. (2002). *Exercise Physiology* (4th Ed). Michigan: Mcgraw Hill.
- Alves, F. (2004) *O treino das qualidades físicas – a resistência. Metodologia do treino*. Lisboa – Faculdade de Motricidade Humana
- Atlaoui, D.; Duclos, M.; Gouarne, C.; Lacoste, L.; Barale, F.; Chatard, J. (2004). The 24-h urinary cortisol/cortisone ratio for monitoring training in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc.* **36(2)**: 218 – 224.
- 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.
- Bonifazi, M.; Bela, E.; Carli, G.; Lodi, G.; Martelli, G.; Zhu, B. e Lupo, C. (1998). Influence of training on the response to exercise of adrenocorticotropin and growth hormone plasma concentrations in human swimmers. *Eur J Appl Physiol.* **78**: 394 – 397.
- Bonifazi, M.; Sardella, F. e Lupo, C. (2000). Preparatory versus main competition: differences in performances, lactate responses and pré – competition plasma cortisol concentrations in elite male swimmers. *Eur J Appl Physiol.* **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.; Martelli, G.; Viti, A.; Baldi, L.; Bonifazi, M.; Prisco, C. (1983) Modulation of hormone levels in male swimmers during training. *In Hollander, A.P., Huijimg, P.A., Gert de Groot. Biomechanics and medicine in swimming.* International Series on Sport Science. Vol **14** Human Kinetics.
- Castelo; Barreto, H.; Alves,F.; Santos, P.; Carvalho, J.; Vieira; J.; (1996). Metodologia do Treino Desportivo. Edições FMH.
- Chatard, J. C., Atlaoui, D., Lac, G., Duclos, M., Hooper, S. E Mackinnon, L. (2002). Cortisol, DHEA, Performance an Training in Elite Swimmers. *Int J Sports Med.* **23**: 510 – 515.
- Chatard, J., M. Duclos (2004) Le suivi hormonal des sportifs. *Faculté de Médecine St-Etienne*
- Christou, M., Smilios, I., Pilianidis, T., Häkkinen, Tokmakidis, S., (2005). The effect of mechanical power output during resistance exercise on hormonal responses. *In www.apr.online.com*
- Fox, S. (1996). *Human Physiology* (5th 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, J. (1992). Fisiologia de la actividad física e del deporte (1^a Ed.), Mcgraw-Hill – International de España.
- Gatin, P. (2001). Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. *Sports Medecine* **31**: 423 – 428

-
- Guyton, A. C. e Hall, J.E. (1997). Fisiologia do Esporte. In: Guanabara Koogan S. A (Eds), *Tratado de Fisiologia médica* (968 – 970). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.
 - Hoogeveen, A.R. e Zonderland, M.L. (1996). Relationships Between Testosterone, Cortisol and Performance in Professional Cyclists. *Int. J. Sports Med.* **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.
 - Maglisho, E. (2003). *Swimming Fastest – The Essential Reference on Technique, Training, and Program Design*. Champaign: Human Kinetics.
 - Navarro, F., (2001) *Planificación y Control del Entrenamiento en Natación*. Madrid:Gymnos.
 - 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
 - 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).
 - Pereira, J.G. (1994) *Caracterização Fisiológica da Natação de Competição* (s.l.).
 - Powers, S. & Howley, E., (2001) *Exercise Physiology: Theory and Application to Fitness and Performance* (4thed.). MacGraw-Hill: Companies, inc.

- Rama, L. (2004). Factores Determinantes no Rendimento de Jovens Nadadores Portugueses. Lisboa: Congresso de Treinadores de Natação. APTN
- 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.
- Sobral, F., & Silva, M. (1997). Cineantropometria – Curso Básico. Coimbra: FCDEF-UC.
- Sweetenham, B., Atkinson, J., (2003). *Championship Swim Training*. Human Kinetics.
- Tyndall, G.L., Kobe, R. W. e Houmard, J. A. (1996). Cortisol, testosterone, and insulin action during intense swimming training in humans. *Eur J Appl Physiol*. **73**: 61 – 65.
- Urhausen A, Kindermann W. (2002). Diagnosis of overtraining: what tools do we have?. *Sports Medicine* 32: 95-102
- Vander, A., Sherman, J., Luciano, D., (2001). *Human Physiology: the Mechanisms of Body Function* (8th ed.). Michigan: Macgraw Hill.

Anexos



Anexo 1

Tabela do Atleta para o teste de Nado

Folha de Registo

Nado Aeróbio Intervalado – 5 x 400 m / 45”

Nº de Identificação	Nome
Data	Hora

1ª Série

	100 m	200 m	300 m	400 m
Tempo				
FG				
FC	-----	-----	-----	-----

2ª Série

	100 m	200 m	300 m	400 m
Tempo				
FG				
FC	-----	-----	-----	-----

3ª Série

	100 m	200 m	300 m	400 m
Tempo				
FG				
FC	-----	-----	-----	-----

4ª Série

	100 m	200 m	300 m	400 m
Tempo				
FG				
FC	-----	-----	-----	-----

5ª Série

	100 m	200 m	300 m	400 m
Tempo				
FG				
FC	-----	-----	-----	-----

RPE: _____

Lactato: _____

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 – Anos de Treino (anos), volume médio anual (Km) e prova mais pontuada.

Sujeitos	Anos de treino	Volume Médio Anual	Prova Mais Pontuada
01	8	1400	200m – 669 pts
02	8	1400	400m – 676 pts
03	7	1400	200m – 724 pts
04	6	1400	50m – 760 pts
05	6	1400	100m – 637 pts
06	5	1400	100m – 687 pts
07	8	1500	100m – 632 pts
08	8	1500	100m – 672 pts
09	9	1500	100m – 753 pts
10	7	1500	200m – 585 pts
11	7	1500	100m – 659 pts
12	6	1500	1500m – 635 pts

Tabela 2 – Pregas sub-escapular, supra-ilíaca, tricripital, abdominal, geminal e crural.

Sujeitos	sub- escapular	Supra- ilíaca	tricripital	abdominal	geminal	crural	Σ Pregas
01	7	4	7	7	7	12	44
02	6	6	6	9	9	9	45
03	6	5	6	7	10	7	41
04	7	7	8	7	6	9	44
05	6	5	4	8	3	6	32
06	9	7	7	9	11	14	57
07	9	8	9	8	11	14	59
08	9	7	7	8	9	10	50
09	7	6	7	6	7	8	41
10	7	7	8	7	11	9	49
11	6	6	5	7	5	7	36
12	11	10	11	12	10	15	69

Tabela 3 – Idade decimal, Massa, Estatura, IMC, Altura Sentado

Sujeitos	Idade Décimal (anos)	Massa (Kg)	Estatura (cm)	IMC	Altura Sentado (cm)	Envergadura (cm)
01	15,79	55,20	164,50	20,40	84,00	171,00
02	15,33	65,00	182,50	19,52	92,20	193,00
03	16,93	58,00	174,00	19,16	87,00	184,00
04	16,48	79,60	191,60	21,68	95,10	194,00
05	17,64	59,40	177,40	18,87	91,50	190,00
06	18,64	69,40	171,50	23,60	88,40	173,00
07	17,44	59,80	172,60	20,07	91,50	174,00
08	17,08	68,00	173,70	22,54	91,20	175,00
09	17,65	72,00	183,00	21,50	95,00	190,00
10	16,60	72,80	179,60	22,57	89,60	181,00
11	17,50	68,20	182,60	20,45	92,50	187,00
12	17,30	70,00	172,30	23,58	92,40	174,00

Anexo 4

Kits Salimetrics (USA)

**Expanded Range
High Sensivity Salivary
Cortisol Enzime Immunoassay Kit - Controlo**

**High Sensivity Salivary
Cortisol Enzime Immunoassay Kit – Amostra**

Salivary Testosterone Enzime Immunoassay Kit - Amostra

Expanded Range High Sensivity Salivary Cortisol Enzyme Immunoassay Kit - Control

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
techserv@salimetrics.com

EXPANDED RANGE
High Sensivity
SALIVARY CORTISOL ENZYME IMMUNOASSAY KIT
Catalog No. 1-30271-3012, 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. These assays were not designed for use with saliva. Given that the composition of serum is markedly different from that of saliva, these assays 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 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 sample per test. Third, the pH of saliva is easily lowered or raised by the consumption of food or drink. For accurate measurement, the pH of samples to be tested must be controlled and kept constant. This assay kit includes a buffer that is specifically designed to be resistant 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 Features

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 ≤ 5.5 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 kits of this.
4. When using a multichannel pipette, reagents should be added to duplicate wells at the same time. Do not aspirate reagents 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. 1-30271-1312). 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) to avoid evaporation of samples.
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. Wash per concentrate 10-fold with room temperature deionized water (100 mL of 10X buffer requires 900 mL of deionized water). *NOTE: If precipitate has formed in the concentrate wash buffer, it may be heated to 60°C for 15 minutes. Cool to room temperature before use in assays.*
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). *NOTE: This solution is not for use in the laboratory in the US. Reconstitute the powdered stop solution with 12.5 mL of deionized water. Use in the laboratory for research purposes only.*
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.

Materials Needed But Not Supplied

- 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 strips
- One disposable tube capable of holding 24 mL
- Pipette tips
- Serological pipette to deliver up to 24 mL

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 sealed down accordingly, keeping the same dilution ratio.

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 rotor 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

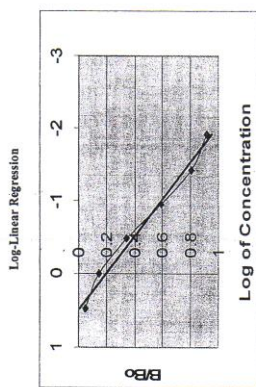
- Compute the average optical density (OD) for all duplicate wells.
- Subtract the average OD for the NSB wells from the average OD of the zero, standards, and unknowns.
- Calculate the percent bound (B/B₀) for each standard and unknown by dividing the average OD (B) by the average OD for the zero (B₀).
- If calculating the results by hand, plot B/B₀ on the vertical axis against the log of the concentration of the standards on the horizontal axis and draw a smooth curve 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

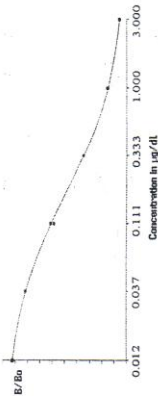
The following charts and graphs are for illustration only and SHOULD NOT be used to calculate results from another assay.

Well	Sample	Average OD	B	B/B ₀	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	S6	1.379	1.356	0.921	0.012
G1,G2	B ₀	1.496	1.473	NA	NA
H1,H2	NSB	0.023	NA	NA	NA

Example: Standard Curves



Control 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	0.092	0.011	0.103	0.071	67.3
4	0.078	2.500	2.578	2.566	100.1
5	0.010	0.011	0.021	0.016	76.6
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 Level	N	Mean (µg/dL)	Standard Deviation (µg/dL)	Coefficient of Variation (%)
Level 1	18	0.099	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

1. 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.
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., Read, G.F., & Hellhammer, D.H. (1992). *Assessment of hormones and drugs in saliva in biobehavioral research*. Kirkland, WA: Hogefé & 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."

High Sensivity Salivary Cortisol Enzyme Immunoassay Kit – Amostra

- Do not mix components from different lots of kits.
- 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.
- See "Material Safety Data" at the end of procedure.
- 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: 1-1302/1-1312). Do not use samples with visible blood contamination.
- High reactivity in false positive results due to salivary enzymes.
- Positive inhibition of the assay for the detection of salivary enzymes.
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible (without interruption) across the plate.
- When running multiple plates, or multiple sets of strips, a standard curve should be run with each individual plate and/or strips.
- 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

- Anti-Cortisol Coated Plate:** A ready-to-use 96-well microtitre plate pre-coated with monoclonal anti-cortisol antibodies in a resealable foil pouch.
- Cortisol Standard:** 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.)
- Wash Buffer:** 100 mL of a 10X phosphate buffered solution containing detergents and a non-mercury preservative. Dilute the concentrate with deionized water to 1000 mL. (NOTE: The 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.)
- Assay Diluent:** 63 mL of a phosphate buffered solution containing a pH indicator and a non-mercury preservative.
- Enzyme Conjugate:** 40 µL of a solution of cortisol labeled with horseradish peroxidase. Dilute prior to use with assay diluent.
- Tetramethylbenzidine (TMB):** 25 mL of a non-toxic ready to use solution. Store at room temperature in a brown glass vial in a cool, dry place (US customers only). Store solution is provided in two 12.5 mL vials for use in the US. Dilute the powdered stop solution with 12.5 mL of deionized water. Let sit for 10 minutes before use.
- 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.
- Vortex
- Plate rotor (if unavailable, tap to mix)
- Plate reader with a 450 nm filter
- Log-linear graph paper or computer software for data reduction
- Deionized water
- Other reagents
- Pipette tips
- One disposable use capable of holding 24 mL.
- Serological pipette to deliver up to 24 mL.

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 were modifications of protocols developed for the use with serum/plasma. The standards used were modifications of the standards used in serum. Given that the composition of serum is markedly different from saliva, these standards include 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 sample. Third, the pH of saliva is easily lowered or raised by the consumption of food or drink. Performance of immunoassays depends on the pH of the sample 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 Features

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

- Stop Solution is a solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care.
- 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.

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%
2	1:32	0.016	0.015	93.8%
			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 <.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 μ g/dL

Salimetrics EIA Cortisol = 0.322 μ 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 rpm. 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/Bo) for each standard and unknown by dividing the average OD (B) by the average OD for the zero (Bo).
4. 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.
5. If using software capable of logistics, use a 4 parameter sigmoid minus curve fit. Otherwise, use log-linear regression.

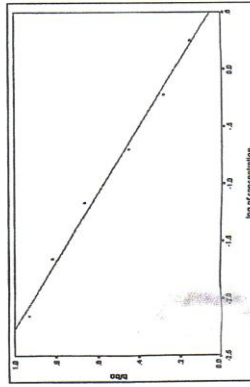
Typical Results

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

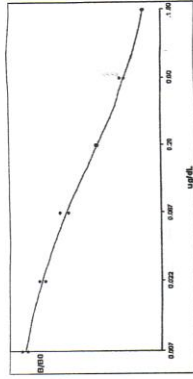
Well	Sample	Average OD	B	B/Bo	Cortisol ug/dL
A1,A2	S1	0.229	0.205	0.1207	1.613
B1,B2	S2	0.419	0.395	0.2326	0.757
C1,C2	S3	0.737	0.713	0.4199	0.214
D1,D2	S4	1.090	1.066	0.6278	0.052
E1,E2	S5	1.330	1.306	0.7691	0.020
F1,F2	S6	1.561	1.537	0.9032	0.008
G1,G2	B0	1.722	1.698	NA	NA
H1,H2	NSB	0.024	NA	NA	NA

Example: Standard Curves

Log-Linear Regression



Cortisol 4-Parameter Sigmoidal 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 required. Wear eye protection. Wash hands with soap and water after handling. Use only certified 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. Salmetrics shall not be liable for accidents or damage resulting from contact with reagents.

References

1. Schwartz, E.B., Granger, D.A., Suman, E.J., Gunnar, 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., & Cunniff, M. (2004). Dehydroepiandrosterone in the oral mucosa: A novel source of endogenous cortisol. *Psychoneuroendocrinology*, 29, 39-46.
4. Granger, D. A., & Cunniff, M. (2004). Transferin enzyme immunoassay for quantitative measurement 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., Raad, 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%
2	0.111	0.54	0.651	0.614	94.3%
		0.04	0.151	0.136	90.1%

Salivary Testosterone Enzyme Immunoassay Kit – Amostra

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/reader. Testosterone values from samples with a pH ≤ 4.0 or ≥ 9.0 may be artificially inflated or lowered (1).

Precautions

1. Stop Solution is a 2 molar solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care. 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.
2. Do not mix components from different lots of kits.
3. 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.
4. See "Material Safety" Data at the end of procedure.
5. 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. 1-130271-1312). Do not use dipsticks, which result in false positive values due to salivary enzymes.
6. Routine calibration of pipettes is critical for the best possible assay performance. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible (without interruption) across the plate.
7. When running multiple plates, or multiple sets of strips, a standard curve should be run with each individual plate and/or strips.
8. 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 350 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 concentrate 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 conjugates used for assays using less than a full plate should be scaled down accordingly, keeping the same dilution ratio.


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. 1-140271-1412, 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 sensitive, efficient, reliable, and commercially available assay system for the measurement of 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

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								

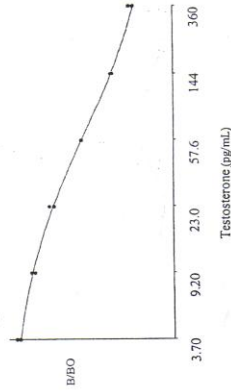
Step 2: Keep the desired number of strips in the strip holder and place the remaining strips back in the foil pouch. If you choose to place non-specific binding wells in H-1, 2, remove strips 1 and 2 from the strip holder and break off the bottom wells. Place the strips back into the strip holder leaving 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. Salmetrics shall not be liable for accidents or damage resulting from contact with reagents.

Performance Characteristics

- 1. 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 116.3%), 109.12% for males and 99.6% for females.
- 2. 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.
- 3. Inter-assay precision** was determined from the mean of averaged duplicates for 10 separate runs at high (202.7 pg/mL) and low (11.4 pg/mL) testosterone levels. The average inter-assay coefficient of variation was 5.1% for high and 9.6% for low.
- 4. Linearity of dilution** - Saliva samples were diluted (range 1:2 to 1:16) with assay buffer and assayed in duplicate. The average recovery was 101.1% (range 88.2% to 120.2%), 102.86% for males and 98.68% for females.
- 5. 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 µL of standards and unknowns into appropriate wells. Standards and samples should be assayed in duplicate.
 - Pipette 50 µL of assay diluent into 2 wells to serve as the zero.
 - Pipette 50 µL of assay diluent into each NSB well.

Step 5: Dilute the enzyme conjugate by adding 7 µL of the conjugate to the 18 mL of assay diluent prepared in Step 4. Immediately mix the diluted conjugate solution and add 150 µL 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 µL of wash buffer into each well and then tipping 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 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). Be sure all wells have turned yellow. If green color remains, continue mixing until green color turns to yellow.

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

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/samples.
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. Determine the concentrations of the unknown 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/B0	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	B0	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 5

Resultados do Teste de Nado

Tabela 4 – Tempo de cada Série – 5x400 / 45” (min), Frequência gestual ($\text{c}\cdot\text{min}^{-1}$), Frequência Cardíaca (bpm), Lactato.

Sujeitos	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	FG Média	FC	Lactato
01	05:17,51	05:15,17	05:11,01	05:08,00	05:01,36	21,57	158	3,3
02	05:09,26	05:04,20	05:25,61	05:04,46	04:57,74	23,21	159	2,8
03	05:09,30	04:59,40	04:59,90	04:58,60	05:02,00	23,60	164	2,8
04	05:09,48	05:06,80	05:09,10	05:07,17	05:10,05	24,73	153	4,1
05	05:21,89	05:16,16	05:20,07	05:17,64	05:09,10	26,06	144	2,1
06	04:59,94	04:59,47	04:54,22	05:02,36	05:01,34	29,95	169	4,4
07	05:25,08	05:15,08	05:16,88	05:07,90	05:16,49	26,57	173	7,1
08	05:06,51	05:09,00	05:03,53	05:02,32	05:03,20	23,72	174	2,9
09	05:13,14	05:18,73	05:16,34	05:13,60	05:09,10	22,67	164	2,4
10	05:24,30	05:19,10	05:14,30	05:23,80	05:18,90	25,89	162	5,6
11	05:38,17	05:22,92	05:23,01	05:19,32	05:20,00	22,06	154	3,2
12	05:29,88	06:01,14	05:26,10	05:25,48	05:24,73	27,45	157	2,9

Anexo 6

Concentrações do Cortisol e da Testosterona Salivar

Tabela 5 – Concentrações do Cortisol Salivar ($\mu\text{g.dl}^{-1}$)

	a	b	c	d	e	f
1	0,080	0,112	0,061	0,054	0,057	0,124
2	0,165	0,242	0,150	0,066	0,189	0,507
3	0,063	0,161	0,094	0,047	0,118	0,075
4	0,167	0,124	0,160	0,142	0,044	0,150
5	0,232	0,446		0,057	0,425	0,167
6	0,041	0,961	0,758	0,189	0,014	0,138
7	0,091	0,522	0,128	0,118	0,090	0,255
8	0,196	0,530	0,315	0,186	0,318	0,229
9	0,185	0,359	0,134	0,054	0,812	0,153
10	0,165	0,761	0,146	0,066	0,392	0,157
11	0,307	0,482	0,163	0,047	0,130	0,392
12	0,114	0,088	0,047	0,142	0,237	0,075

Tabela 6 – Concentrações da Testosterona Salivar ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)

	a	b	c	d	e	f
1	134,73	117,92	80,90	54,74	187,56	113,14
2	137,23	174,27	165,68	130,46	204,67	186,70
3	103,68	112,63	69,52	96,34	137,86	164,89
4	192,80	200,94	179,14	168,75	234,92	263,52
5	134,11	122,34	59,19	52,29	183,30	156,51
6	115,24	118,46	87,88	92,01	98,57	180,41
7	164,92	105,61	128,09	46,40	158,96	118,92
8	154,64	116,84	110,57	119,01	167,21	104,64
9	138,50	100,87	114,19	104,64	215,28	177,87
10	107,07	114,19	126,92	72,12	167,98	180,41
11	214,29	79,06	199,11	92,43	87,47	113,42
12	90,33	106,58	81,65	131,07	134,73	128,28

a	antes
b	15' depois
c	1h 30 min depois
d	2h 30 min depois
e	Ao acordar
f	24h depois

Anexo 7

Ficha de Registo de Placas - ELISA

Anexo 8

Tratamento Estatístico

Estadística Descritiva

	Minimo	Maximo	Média	Desvio Padrão
Idade Décimal (anos)	15,33	18,64	17,03	,89
Anos de treino	6,00	9,00	7,33	,89
Massa corporal	55,20	79,60	66,45	7,17
altura	164,50	191,60	177,11	7,17
Altura sentado	84,00	95,10	90,87	3,20
envergadura	171,00	194,00	182,17	8,54
Σ Pregas	32,00	69,0	47,25	10,36

	Minimo	Maximo	Média	Desvio Padrão
Velocidade max	1,58	1,78	1,71	,057
Velocidade de nado	1,20	1,34	1,28	,039
% velocidade max	71,50	77,89	74,99	2,30
FC	144,00	174,00	160,92	8,67
Lactato	2,10	7,10	3,63	1,46

	Minimo	Maximo	Média	Desvio Padrão
Testosterona 1	90,33	214,29	140,63	36,55
Testosterona 2	79,06	200,94	122,48	32,98
Testosterona 3	59,19	199,11	116,90	44,97
Testosterona 4	46,40	168,75	96,69	36,90
Testosterona 5	87,47	234,92	164,88	44,68
Testosterona 6	104,64	263,52	157,39	45,39

	Minimo	Maximo	Média	Desvio Padrão
Cortisol 1	407,93	3068,14	1504,25	766,86
Cortisol 2	882,71	9609,80	3989,90	2739,64
Cortisol 3	474,32	7582,36	1959,01	1991,36
Cortisol 4	469,24	1889,64	972,75	548,91
Cortisol 5	135,00	8117,65	2354,27	2267,27
Cortisol 6	745,65	5071,89	2017,28	1291,47

	Minimo	Maximo	Média	Desvio Padrão
Racio T/C 1	,06	,28	,1186	,0680
Racio T/C 2	,01	,16	,0560	,0501
Racio T/C 3	,01	,17	,0949	,0446
Racio T/C 4	,04	,21	,1217	,0614
Racio T/C 5	,03	,73	,1903	,2261
Racio T/C 6	,03	,22	,1061	,0613

Estatística Diferencial

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cort2 - Cort1	Negative Ranks	2(a)	2,00	4,00
	Positive Ranks	10(b)	7,40	74,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Cort3 - Cort1	Negative Ranks	7(d)	5,00	35,00
	Positive Ranks	4(e)	7,75	31,00
	Ties	0(f)		
	Total	11		
Cort4 - Cort1	Negative Ranks	9(g)	6,33	57,00
	Positive Ranks	3(h)	7,00	21,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Cort5 - Cort1	Negative Ranks	5(j)	4,80	24,00
	Positive Ranks	7(k)	7,71	54,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Cort6 - Cort1	Negative Ranks	5(m)	4,40	22,00
	Positive Ranks	7(n)	8,00	56,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a Cort2 < Cort1
- b Cort2 > Cort1
- c Cort2 = Cort1
- d Cort3 < Cort1
- e Cort3 > Cort1
- f Cort3 = Cort1
- g Cort4 < Cort1
- h Cort4 > Cort1
- i Cort4 = Cort1
- j Cort5 < Cort1
- k Cort5 > Cort1
- l Cort5 = Cort1
- m Cort6 < Cort1
- n Cort6 > Cort1
- o Cort6 = Cort1

Test Statistics(c)

	Cort2 - Cort1	Cort3 - Cort1	Cort4 - Cort1	Cort5 - Cort1	Cort6 - Cort1
Z	-2,746(a)	-,178(b)	-1,412(b)	-1,177(a)	-1,334(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006	,859	,158	,239	,182

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

Ranks

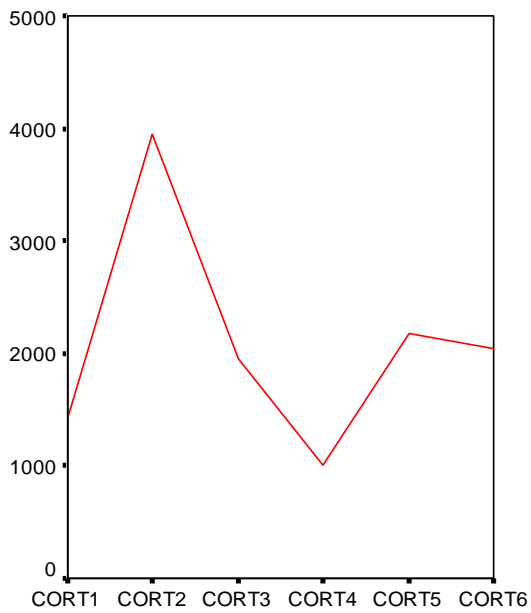
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cort3 - Cort2	Negative Ranks	10(a)	6,50	65,00
	Positive Ranks	1(b)	1,00	1,00
	Ties	0(c)		
	Total	11		
Cort4 - Cort2	Negative Ranks	10(d)	7,50	75,00
	Positive Ranks	2(e)	1,50	3,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Cort4 - Cort3	Negative Ranks	10(g)	5,80	58,00
	Positive Ranks	1(h)	8,00	8,00
	Ties	0(i)		
	Total	11		

- a Cort3 < Cort2
- b Cort3 > Cort2
- c Cort3 = Cort2
- d Cort4 < Cort2
- e Cort4 > Cort2
- f Cort4 = Cort2
- g Cort4 < Cort3
- h Cort4 > Cort3
- i Cort4 = Cort3

Test Statistics(b)

	Cort3 - Cort2	Cort4 - Cort2	Cort4 - Cort3
Z	-2,845(a)	-2,824(a)	-2,223(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,004	,005	,026

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



Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Testo2 - Testo1	Negative Ranks	6(a)	9,00	54,00
	Positive Ranks	6(b)	4,00	24,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Testo3 - Testo1	Negative Ranks	10(d)	6,70	67,00
	Positive Ranks	2(e)	5,50	11,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Testo4 - Testo1	Negative Ranks	11(g)	6,36	70,00
	Positive Ranks	1(h)	8,00	8,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Testo5 - Testo1	Negative Ranks	3(j)	5,33	16,00
	Positive Ranks	9(k)	6,89	62,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Testo6 - Testo1	Negative Ranks	4(m)	6,25	25,00
	Positive Ranks	8(n)	6,63	53,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a Testo2 < Testo1
- b Testo2 > Testo1
- c Testo2 = Testo1
- d Testo3 < Testo1
- e Testo3 > Testo1
- f Testo3 = Testo1
- g Testo4 < Testo1
- h Testo4 > Testo1
- i Testo4 = Testo1
- j Testo5 < Testo1
- k Testo5 > Testo1
- l Testo5 = Testo1
- m Testo6 < Testo1
- n Testo6 > Testo1
- o Testo6 = Testo1

Test Statistics(c)

	Testo2 - Testo1	Testo3 - Testo1	Testo4 - Testo1	Testo5 - Testo1	Testo6 - Testo1
Z	-1,177(a)	-2,197(a)	-2,432(a)	-1,804(b)	-1,098(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,239	,028	,015	,071	,272

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

Ranks

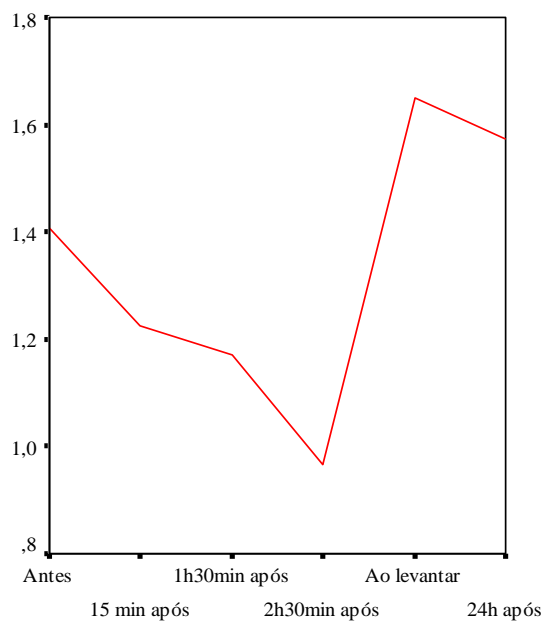
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Testo4 - Testo3	Negative Ranks	8(a)	7,25	58,00
	Positive Ranks	4(b)	5,00	20,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		

- a Testo4 < Testo3
- b Testo4 > Testo3
- c Testo4 = Testo3

Test Statistics(b)

	Testo4 - Testo3
Z	-1,490(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,136

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



Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RTestoCor2 - RTestoCor1	Negative Ranks	10(a)	7,00	70,00
	Positive Ranks	2(b)	4,00	8,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
RTestoCor3 - RTestoCor1	Negative Ranks	6(d)	6,67	40,00
	Positive Ranks	5(e)	5,20	26,00
	Ties	0(f)		
	Total	11		
RTestoCor4 - RTestoCor1	Negative Ranks	4(g)	8,25	33,00
	Positive Ranks	8(h)	5,63	45,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
RTestoCor5 - RTestoCor1	Negative Ranks	8(j)	4,88	39,00
	Positive Ranks	4(k)	9,75	39,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
RTestoCor6 - RTestoCor1	Negative Ranks	6(m)	6,83	41,00
	Positive Ranks	6(n)	6,17	37,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a RTestoCor2 < RTestoCor1
- b RTestoCor2 > RTestoCor1
- c RTestoCor2 = RTestoCor1
- d RTestoCor3 < RTestoCor1
- e RTestoCor3 > RTestoCor1
- f RTestoCor3 = RTestoCor1
- g RTestoCor4 < RTestoCor1
- h RTestoCor4 > RTestoCor1
- i RTestoCor4 = RTestoCor1
- j RTestoCor5 < RTestoCor1
- k RTestoCor5 > RTestoCor1
- l RTestoCor5 = RTestoCor1
- m RTestoCor6 < RTestoCor1
- n RTestoCor6 > RTestoCor1
- o RTestoCor6 = RTestoCor1

Test Statistics(d)

	RTestoCor2 - RTestoCor1	RTestoCor3 - RTestoCor1	RTestoCor4 - RTestoCor1	RTestoCor5 - RTestoCor1	RTestoCor6 - RTestoCor1
Z	-2,432(a)	-,622(a)	-,471(b)	,000(c)	-,157(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,015	,534	,638	1,000	,875

- a Based on positive ranks.
- b Based on negative ranks.
- c The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.
- d Wilcoxon Signed Ranks Test

