

Resposta sérica de testosterona e triiodotironina pós-treinamento intenso com pesos

RESPONSES OF SERUM TESTOSTERONE AND TRIIODOTIRONINE AFTER INTENSE RESISTANCE TRAINING

MARIN, D. P.; JUNIOR, A. J. F. Resposta sérica de testosterona e triiodotironina pós-treinamento intenso com pesos *R. bras. Ci e Mov.* 2007; 15(4): 31-38.

RESUMO: **Introdução:** as respostas adaptativas conduzidas pelo treinamento com pesos são em grande parte influenciadas pelo incremento na resposta aguda dos hormônios endógenos anabólicos. **Objetivo:** o propósito deste estudo foi determinar o efeito agudo do treinamento com pesos em circuito na resposta de testosterona (Tt) e triiodotironina (T3) em adultos jovens treinados. **Métodos:** foram avaliados oito indivíduos ($22,1 \pm 2,06$ anos) experientes em treinamento com pesos (TP), com pelo menos 12 meses de atividade ($78,4 \pm 9,97$ kg; $176,25 \pm 5,49$ cm; e IMC $25,18 \pm 2,44$ Kg/m²). A sessão de exercícios incluiu exercícios para membros inferiores e superiores para diferentes grupamentos musculares até a exaustão (3 séries; 6RM; em circuito alternando segmentos; intervalo de 10-20 segundos entre exercícios) com carga estipulada pelo teste de repetições máximas no dia anterior. A concentração hormonal sérica foi determinada pré e pós-treinamento, imediatamente após (T0), 20 (T20), 40 (T40) e 60 minutos (T60). A estatística descritiva foi feita pelo teste One Way Anova ($p < 0,05$) e diferença percentual ($\Delta\%$). **Resultados:** Os resultados analisados evidenciaram significativo incremento na concentração de Tt (29,42%) imediatamente após o exercício (repouso-T0), com decréscimo significativo (26,47%) entre T0 e T60 após o exercício. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre repouso e T20, T40 e T60 após o treinamento. Da mesma maneira, nenhuma alteração significativa foi observada no T3 sérico em todas as mensurações que tendeu a estabilidade pós-treinamento. **Conclusões:** Os dados sugerem que o treinamento com pesos em circuito de alta intensidade e curtos períodos de intervalo entre as séries pode elevar a concentração de Tt após o exercício.

PALAVRAS-CHAVES: Hormônios séricos, Exercício resistido, Resposta aguda.

MARIN, D. P.; JUNIOR, A. J. F. Responses of serum testosterone and triiodotironine after intense resistance training *R. bras. Ci e Mov.* 2007; 15(4): 31-38.

ABSTRACT: **Introduction:** The adaptations addressed by resistance training are influenced by acute endogenous anabolic hormones responses **Purpose:** The propouse of this study was determine the effect of resistance training (RT) on acute response of serum Testosterone (Tt) and Triiodothyronine (T3) in young trained men. **Methods:** We evaluated eight healthy male ($22,1 \pm 2,06$ years old), with 12-month RT experience ($78,4 \pm 9,97$ Kg; $176,25 \pm 5,49$ cm; and BMI $25,18 \pm 2,44$ Kg/m²). The resistance training included exercises for lower and upper limbs in circuit exercise training until exhaustion (3 sets; 6RM in circuit, alternating upper and lower limbs; rest time between sets and exercises was 10-20s) with work load determined for maximal repetitions one day before test. Serum hormone was determined pre and post-exercise; immediately after exercises (T0), 20 (T20), 40 (T40) and 60 minutes (T60). Absolute values were analyzed by One Way Anova ($p < 0,05$) and $\Delta\%$. **Results:** Analysis evidenced significant increase on serum Tt (29,42%) immediately after exercise (rest-T0), with significant decrease (26,47%) between T0 and T60. No differences were found from rest to T20, T40 and T60. Also no significant change was observed on T3 at all measurements suggesting stability post-exercise. **Conclusion:** Data suggests that high-intensity circuit resistance training with short rest period may increase Tt concentration post-exercise.

KEYWORDS: Serum hormones, Resistance exercise, Acute response.

Douglas Popp Marin
Aylton José Figueira Junior

Núcleo de Estudos em Fisiologia do Exercício (NEFE)
– Faculdade de Fisioterapia e Educação Física – Universidade Metodista de São Paulo – UMEP

Recebimento: 11/2006
Aceite: 04/2007

Correspondência: Rua Joanídia Sodré, 314. Jardim Independência, São Paulo-SP CEP: 03222-110 douglas.marin@metodista.br

R. bras. Ci. e Mov. 2007; 15(4): 31-38

Introdução

As respostas adaptativas observadas no treinamento crônico com pesos de alta intensidade, como aumento da força, potência e hipertrofia muscular, são em grande parte, influenciadas pelas adaptações neuro-endócrina, em função da secreção dos hormônios endógenos anabólicos mesmo em períodos iniciais do treinamento.¹⁹

A testosterona, em particular, conhecida como principal andrógeno circulante, pode influenciar o crescimento e o desenvolvimento muscular estimulando a síntese de proteínas (efeito anabólico) e inibindo a degradação protéica (efeito anticatabólico)⁵, além disso, a testosterona pode ser um importante biomarcador do estado de treinamento⁴. Cardinal e Stone⁴ sugerem que a concentração de testosterona deve ser rotineiramente mensurada no sentido de monitorar as respostas adaptativas agudas e crônicas produzidas pelos programas de treinamento, uma vez que a concentração de testosterona pode sofrer alterações durante os períodos mais intensos do treinamento crônico.⁶

Embora o comportamento agudo da resposta hormonal seja frequentemente observado na literatura, alguns estudos apresentaram diferenças nos resultados, em função da manipulação das variáveis do treinamento como intensidade, volume e intervalo de repouso.^{2,10}

A concentração aguda sérica de testosterona pode aumentar em função do treinamento com pesos.^{1,10} Esta resposta foi observada em protocolos envolvendo exercícios de séries múltiplas de alta intensidade (5RM), com períodos curtos de repouso (1 minuto),¹⁰ bem como em protocolos de intensidade moderada (10RM) e períodos de repouso mais longos (3 minutos).⁷ Elevações significativas na concentração aguda de testosterona poderiam mediar a fase anabólica após cada sessão de treinamento. Dessa forma, haveria maior possibilidade de interação entre o hormônio e seus receptores nas células musculares, proporcionando efeito predominantemente anabólico durante a fase de recuperação, estimulando a hipertrofia^{7,8} e a expressão da força e potência muscular.⁶

A resposta dos hormônios tireoideanos induzida pelo exercício, especialmente o T3, tem sido estudada em protocolos de treinamento de resistência.¹⁶ Entretanto, dados limitados estão disponíveis na literatura sobre o comportamento do T3 em resposta ao treinamento com pesos. Pakarinen et al.,¹⁴ acompanhando indivíduos submetidos a 24 semanas de treinamento com pesos, encontraram decréscimo na concentração de T4 durante o período de treinamento, enquanto nenhuma diferença significativa foi observada na concentração de T3 durante todo o período experimental.

A literatura apresenta somente um trabalho que examinou o efeito do treinamento com pesos em circuito na resposta hormonal aguda.⁹ Harber et al.,⁹ não observaram incremento na resposta aguda de testosterona após uma sessão de treinamento com pesos em circuito de intensidade leve-moderada (40-60% de 1-RM).

Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar o efeito agudo do treinamento com pesos de alta intensidade, executado em circuito na resposta aguda de testosterona e triiodotironina em adultos jovens treinados do gênero masculino.

Materiais e Métodos

Para a realização do presente estudo, avaliamos oito indivíduos treinados e saudáveis do gênero masculino com média de idade de $22,1 \pm 2,06$ anos (20-26 anos) e valores de peso corporal de $78,4 \pm 9,97$ kg, estatura $176,25 \pm 5,49$ cm, IMC de $25,18 \pm 2,44$ kg/m² e que não consumiam habitualmente nenhum tipo de fármaco e/ou tabaco. Os indivíduos foram orientados a não consumir cafeína e não praticar exercícios físicos 24 horas antes dos testes.

Os avaliados eram praticantes de exercícios com pesos por pelo menos 12 meses e participavam regularmente de um programa de treinamento com pesos, com frequência semanal de 3-5 vezes, total de 12-15 exercícios, volume de 2-4 séries e 5-12 repetições cada exercício. Todos os indivíduos foram previamente esclarecidos sobre os procedimentos

relacionados à pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Conselho da Faculdade de Educação Física e Fisioterapia (FAEFF) da Universidade Metodista de São Paulo.

Os avaliados visitaram duas vezes a sala de musculação da Universidade Metodista de São Paulo (UMESP) com intervalo de 48 horas. A primeira visita consistiu na familiarização dos indivíduos com os equipamentos e pesos livres (Cybex Incorp – USA) e determinação da carga de treinamento, seguindo o protocolo de repetições máximas (realizar seis repetições máximas até a exaustão), utilizando a combinação entre as máquinas e pesos livres.

A segunda visita consistiu na aplicação do protocolo de treinamento e coletas séricas no período matutino. Para cada exercício proposto foram executadas três séries com a metodologia de circuito, alternando membros superiores e inferiores. A intensidade de 100% de 6RM e intervalo máximo de 10-20 segundos entre as séries e exercícios foram considerados. Os exercícios foram executados na seguinte ordem: Supino livre, Leg Press Máquina, Pulley Costas, Flexão de Joelhos (Mesa Flexora), Desenvolvimento de ombros na máquina e Extensão de Joelhos (Cadeira Extensora) (tabela 1). O tempo total da sessão foi de aproximadamente 15 minutos, incluindo os intervalos entre as séries e exercícios.

Tabela 1 – Ordem, valores médios e desvio padrão das cargas utilizadas nos exercícios em adultos jovens do gênero masculino.

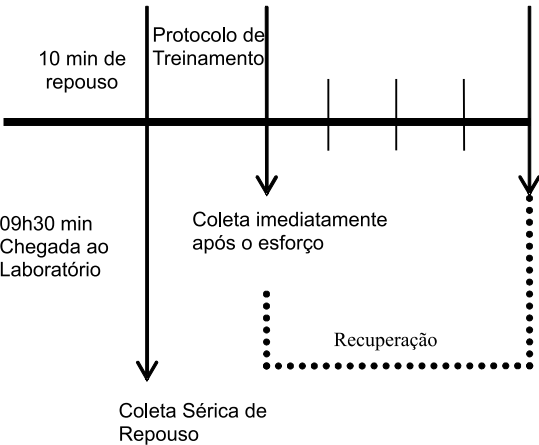
Exercício	Carga (kg)	Exercício	Carga (kg)
1 – Leg Press	163,13 ± 17,68	4 – Pulley Costas	83,61 ± 7,14
2 – Supino Livre	79,99 ± 7,94	5 – Cadeira Extensora	118,13 ± 8,93
3 – Mesa Flexora	65,25 ± 7,28	6 – Desenvolvimento de Ombros	59,04 ± 7,95

As amostras sanguíneas foram obtidas por venopunção, utilizando-se tubos secos sem anticoagulante. Foram extraídos 5 ml de sangue por coleta.

Os avaliados foram submetidos a cinco coletas; a primeira em estado de repouso, a segunda imediatamente após exercício físico (T0), e aos 20 (T20), 40 (T40) e 60 (T60) minutos após o esforço (fig 1). Entre os intervalos das coletas, os indivíduos foram mantidos heparinizados para evitar uma nova punção e a coagulação entre as coletas.

As amostras séricas foram conservadas entre 2 e 8°C, e colocadas com os reagentes ELECYs na posição vertical, para assegurar total disponibilidade das micropartículas durante a mistura automática antes da utilização. As amostras séricas foram analisadas através do equipamento ELECYs 1010, pelo método de eletroquimioluminescência.

Figura 1 – Desenho experimental do Protocolo de Avaliação



A análise estatística utilizada foi a análise de variância One Way Anova, com nível de significância de $p < 0,05$ e o Post Hoc Scheffé para a localização das diferenças para os indicadores séricos. A variação percentual ($\Delta\%$) dos resultados no exercício e no repouso foi determinada através da comparação entre o repouso, T0, T20, T40 e T60.

Resultados

O efeito agudo do exercício com pesos parece promover alterações neuro-

endócrinas importantes, em especial nos minutos que se seguem após o esforço. Mudanças na taxa metabólica basal, lipólise, captação de glicose são observadas após esforço. A taxa metabólica está associada a aumento dos níveis de catecolaminas, testosterona e GH.

No presente estudo, observamos um comportamento distinto entre as concentrações de testosterona e T3 (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração de Testosterona e Triiodotironina pré e pós-exercícios com pesos.

Valores Comparativos Pré e Pós-Exercícios com Pesos						
		REPOUSO	T0	T20	T40	T60
Testosterona (nmol/ mL)	x	17.43	22.23*	19.08	17.08	16.35**
	s	3.60	3.77	3.98	3.58	3.54
T3 (nmol/L)	x	1.53	1.51	1.54	1.56	1.55
	s	0.16	0.20	0.16	0.18	0.22

T0= Imediatamente após o esforço, T20, T40, T60 = Tempo de recuperação após o esforço.

* Significativo ($p < 0,05$) entre Basal e T0.

** Significativo ($p < 0,05$) entre T0 e T60.

Encontramos aumento significativo na concentração de testosterona imediatamente após o esforço, retornando aos valores basais após 40 minutos do término do estímulo. Incremento significativo na concentração de testosterona foi observado após o esforço, comparado com os valores de repouso (incremento de 17,43 nmol/ml para 22,23 nmol/ml). Por outro lado, os valores de T3 não apresentaram variações em todos os períodos avaliados.

A análise dos resultados apontam para diferenças nas respostas de testosterona e T3 em função do estímulo adotado no protocolo de exercício. Poderíamos hipotetizar que o estresse muscular proposto tenha sido suficiente para promover mudanças na concentração aguda de testosterona, pois a intensidade parece ser um fator associado a essa resposta. Por outro lado, os valores de T3 dependeriam mais da duração total do estímulo que da intensidade, pois as respostas adrenérgicas poderiam rapidamente estimular o efeito metabólico induzido pelo exercício.

Discussão

A resposta hormonal aguda ao exercício pode estar associada à configuração do estímulo do treinamento, em função da manipulação das variáveis como intensidade, volume e intervalo de repouso.¹⁰

Segundo Staron et al.¹⁹ Hansen et al.⁸ As adaptações agudas ao exercício, em especial dos sistemas endócrino e nervoso, são freqüentemente observadas no treinamento com pesos. Os hormônios testosterona e T3 podem estimular a síntese de proteína muscular.^{5,16} Portanto, a estimulação do sistema endócrino induzida pelo exercício pode potencializar as adaptações do sistema neuromuscular. Em estudo recente, Ahtiainen et al.¹ demonstraram correlação significativa entre o incremento da resposta aguda de testosterona e o aumento na área de secção transversa dos músculos do quadríceps femoral. Estes dados sugerem que a regulação do sistema endócrino e o incremento da concentração de testosterona pós-exercício durante o treinamento crônico podem ser determinantes para o desenvolvimento da hipertrofia muscular.

No presente estudo, os resultados evidenciaram incremento significativo nos níveis de testosterona sérica entre o valor de repouso e imediatamente após o esforço, com superioridade de 29,42%. Entretanto, Harber et al.⁹ também utilizando a metodologia de treinamento com pesos em circuito com intensidade de 40-60% de 1RM, não encontraram incremento na concentração de testosterona após o esforço. Esta discrepância nos resultados provavelmente é devido à alta intensidade (100% de 6RM) empregada no presente estudo. Por outro lado, os presentes resultados corroboram com Schwab et al.¹⁷ que encontraram incremento significativo de 30,9% na resposta de testosterona imediatamente após o término da última série do exercício de agachamento, no grupo que realizou protocolo de exercício de alta intensidade com longos períodos de intervalo (4x6RM; intensidade de 90-95% de 6RM; 4 minutos de intervalo entre as séries).

Encontramos que a concentração de testosterona tendeu a retornar aos valores pré-exercício durante o período de recuperação. Foi observado decréscimo nos níveis de testosterona entre 20 e 40 minutos, com variação de -10,10% e -0,94% respectivamente. Porém, valores significativos foram encontrados com redução de -26,43% aos 60 minutos após o esforço em relação à concentração imediatamente após o exercício. Tais achados estão de acordo com trabalhos de Ahtiainen et al.² e Hansen et al.⁸ que demonstraram decréscimo na concentração de testosterona durante o período de recuperação. Estudos prévios mostraram que o decréscimo da concentração de testosterona após o esforço abaixo dos valores pré-exercício está relacionado com o estresse imposto pelo treinamento, sendo que este decréscimo pode persistir por até 48 horas após a sessão de exercícios com pesos.⁷ Por outro lado, os níveis de cortisol podem ser restabelecidos mais rapidamente após o exercício. Portanto, a concentração de testosterona pós-exercício pode ser um importante biomarcador do estresse do treinamento.^{4,7}

Foi proposto que a resposta aguda de testosterona depende da magnitude do estresse empregado pela sessão de treinamento.⁷ Entretanto, Ahtiainen et al.² reportaram que a sessão de treinamento

realizada com metodologia de repetições forçadas (sobrecarga 15% acima do máximo para 12RM) produziu maior estresse ao sistema neuromuscular comparado ao protocolo de repetições máximas, entretanto sem diferença significativa na resposta de testosterona.

O incremento na resposta aguda de testosterona parece ser independente da estimulação do LH¹² e pode ser devido a; 1) Hemoconcentração,¹⁷ 2) contribuição das catecolaminas que podem atuar diretamente nos receptores adrenérgicos testiculares,¹¹ 3) estimulação do lactato no tecido testicular conduzindo a um incremento dependente nos níveis de AMPc¹² ou 4) ao nível de treinamento.^{7,8}

Willoughby e Taylor²⁰ demonstraram significativa correlação entre up-regulation na expressão protéica dos receptores androgênicos e o incremento na concentração de testosterona após o exercício. Esses autores propuseram que a consistente elevação na concentração de testosterona após cada sessão de treinamento com pesos pode mediar o up-regulation da expressão dos receptores androgênicos, o que subsequente aumentaria a capacidade de ligação hormônio-receptor, conduzindo ao incremento do conteúdo de proteína miofibrilar.

O principal mecanismo envolvendo a presença da testosterona no processo de hipertrofia da fibra muscular (tipo I e tipo II) está associado possivelmente, ao incremento no número de mionúcleos na razão direta do aumento no diâmetro da fibra muscular, que foram precedidos por incremento no número de células satélites e sua fusão às fibras musculares pré-existentes.¹⁸

Os dados do presente estudo corroboram com os de Kraemer et al.,¹⁰ confirmando que protocolos de exercícios com pesos de alta intensidade (6 RM), envolvendo grandes massas musculares e períodos curtos de intervalo promovem incremento agudo na concentração sérica de testosterona.

Os hormônios tireoideanos exercem efeitos biológicos sobre a maioria dos tecidos, possuindo importante papel permissivo no controle metabólico. O exercício físico pode causar alterações na função tireoideana em função da intensidade, duração, regime de treinamento, assim como pelo nível de

atividade física dos indivíduos.¹⁵ Rone et al.¹⁷ observaram positiva correlação entre a capacidade aeróbia e o metabolismo do T3, sugerindo que os hormônios tireoideanos possuem importante papel adaptativo do organismo ao estresse, incluindo o exercício físico. Os resultados do presente estudo demonstraram que os exercícios com pesos de alta intensidade não produziram alterações significativas na resposta aguda do T3 sérico. Observou-se tendência ao decréscimo de – 1,07% na concentração de T3 imediatamente após o exercício, evidenciando um pico de concentração de 2,41% acima dos valores de repouso aos 40 minutos durante o período de recuperação. McMurray et al.¹³ encontraram resposta similar ao presente estudo, quando não foi reportada alteração aguda significativa no T3 sérico. Porém, a análise de um período experimental mais longo resultou no decréscimo significativo na concentração sérica de T3 em repouso, associado a um regime de treinamento com peso intenso com duas sessões diárias¹⁵. Estes resultados corroboram com Baylor e Hackney,³ que encontraram decréscimo no nível de T3 sérico durante período intenso de treinamento em remadores. Foi sugerido

que o decréscimo na concentração de T3 e TSH pós-exercício poderia ser atribuído à diminuição do sinal hipotalâmico relacionado aos níveis de leptina, o que representaria um possível mecanismo de conservação de energia durante o exercício.

Conclusão

Os resultados do presente estudo evidenciaram respostas com maior magnitude da testosterona que do T3, mostrando efeito positivo de estímulos de curta duração e alta intensidade em indivíduos treinados, para o incremento na resposta aguda de testosterona.

Poderíamos apresentar que o tamanho da amostra e a ausência do grupo controle são limitações do presente estudo para identificar o efeito dos exercícios com pesos na resposta endócrina aguda.

Futuros estudos são sugeridos com indivíduos com outro nível de aptidão física e treinamento, assim como determinação da resposta da proporcionalidade testosterona/cortisol, como indicadores do anabolismo muscular.

Referências bibliográficas

- 1 AHTIAINEN J. P, PAKARINEN A., ALEN M., KRAEMER W. J, HAKKINEN K. Short vs. long rest period between the sets in hypertrophic resistance training: Influence on muscle strength, size, and hormonal adaptation in trained men. **J Strength Cond Res.** 2005; 19 (3): 572-582.
- 2 AHTIAINEN J. P, PAKARINEN A., KRAEMER W. J., HAKKINEN K. Acute hormonal and neuromuscular responses and recovery to forced vs. maximum repetitions multiple resistance exercises. **Int J Sports Med.** 2003; 24(6): 410-418.
- 3 BAYLOR LS, HACKNEY AC. Resting thyroid and leptin hormone changes in women following intense, prolonged exercise training. **Eur J Appl Physiol** 2003; 88(4-5): 480-484.
- 4 CARDINAL M, STONE MH. Is testosterone influencing explosive performance? **J Strength Cond Res** 2006; 20(1): 103-107.
- 5 FERRANDO A. A., et al. Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanism. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2002; 282(3): E601-E607.
- 6 HAKKINEN K, PAKARINEN A, ALEN M, KAUKHANEN H, KOMI PV. Neuromuscular and hormonal adaptations in athletes to strength training in two years. **J Appl Physiol** 1988; 65(6): 2406-2412.
- 7 HAKKINEN K, PAKARINEN A. Acute hormonal responses to two different fatiguing heavy-resistance protocols in male athletes. **J Appl Physiol** 1993; 74(2): 882-887.

- 8 HANSEN S, KVORNING T, KJAER M, SJOGAARD G. The effect of short-term strength training on human skeletal muscle: the importance of physiologically elevated hormone levels. **Scand J Med Sci Sports**. 2001; 11(6): 347-354.
- 9 HARBER MP, FRY AC, RUBIN MR, SMITH JC, WEISS LW. Skeletal muscle and hormonal adaptations to circuit weight training in untrained men. **Scand J Med Sci Sports** 2004; 14(3): 176-185.
- 10 KRAEMER WJ, et al. Hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise protocols. **J Appl Physiol** 1990; 69(4): 1442-1450.
- 11 JEZOVA D, VIGAS M. Testosterone responses to exercise during blockade and stimulation of adrenergic receptors in man. **Horm Res**. 1981; 15(3): 141-147.
- 12 LU SS, et al. Lactate and the effects of exercise on testosterone secretion: evidence for the involvement of a cAMP- mediated mechanism. **Med Sci Sports Exerc**. 1997; 29(6): 1048-1054.
- 13 McMURRAY RG, EUBANK TK, HACKNEY AC. Nocturnal hormonal responses to resistance exercise. **Eur J Appl Physiol** 1995; 72(1): 121-126.
- 14 PAKARINEN A, ALEN M, HAKKINEN K, KOMI P. Serum thyroid hormones, thyrotropin and thyroxine binding globulin during prolonged strength training. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**. 1988; 57(4): 394-398.
- 15 PAKARINEN A, HAKKINEN K, ALEN M. Serum hormones, thyrotropin and thyroxine binding globulin in elite athletes during very intense strength training of one week. **J Sports Med Phys Fitness**. 1991; 31(2): 142-146.
- 16 RONE JK, DONS RF, Reed HL. The effect of endurance training on serum triiodothyronine kinetics In man: physical conditioning marked by enhanced thyroid hormone metabolism. **Clin Endocrinology**. 1992; 37(4): 325-330.
- 17 SCHWAB R, JOHNSON GO, Housh TJ, Kinder JE, Weir JP. Acute effects of different intensities of weight lifting on serum testosterone. **Med Sci Sports Exerc**. 1993; 25(25): 1381-1385.
- 18 SINHA-HIKIM I, ROTH SM, LEE MI, BHASIN S. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2003; 285(1): 197-205.
- 19 STARON RS, et al. Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. **J Appl Physiol**. 1994; 76(3): 1247-1255.
- 20 WILLOUGHBY DS, TAYLOR, L. Effect of sequential bout of resistance exercise on androgen receptor expression. **Med Sci Sport Exerc**. 2004; 36(9): 1499-1506.