

Artículo original

APLICACIÓN Y UTILIDAD DE LAS DETERMINACIONES HORMONALES EN MUESTRAS DE SALIVA DURANTE EL EJERCICIO

APPLICATION AND USEFULNESS OF HORMONAL DETERMINATIONS IN SALIVARY SAMPLES DURING THE PHYSICAL EXERCISE

Víctor M. Cabrera Oliva¹, Jorge Pavel Pino Rivero²

¹ DrC. Biológicas, Investigador Titular, Profesor Titular. vcabrera@infomed.sld.cu

² Médico, Especialista de Primer Grado en Medicina General e Integral, Especialista de Primer Grado en Medicina Deportiva, Director, Instituto de Medicina Deportiva.

RESUMEN

La saliva contiene células y otros componentes tanto de origen local como no local. Estos componentes son moléculas inorgánicas, orgánicas no proteínicas, proteínas/polipéptidos y moléculas lipídicas. Sin embargo, algunas hormonas las cuales se determinan comúnmente en muestras plasmáticas, como es el caso de los esteroides pueden ser detectados en los fluidos orales y las hormonas peptídicas/proteicas así como las hormonas no esteroides han sido investigadas en este tipo de fluido biológico. El medio en el cual se desarrolla la práctica del deporte y la disponibilidad de los atletas conjuntamente con las características de las sustancias hormonales en las muestras de saliva así como los efectos del ejercicio físico sobre el comportamiento, confirman las posibilidades de utilizar este fluido biológico como una alternativa a las muestras séricas. Esta revisión bibliográfica está enfocada principalmente, a la relación entre los esteroides en muestras de saliva y el estrés psicofisiológico, haciendo énfasis sobre cómo las determinaciones de cortisol en muestras de saliva aportan una herramienta indicadora de auto-reporte psicológico y cambios de los niveles de ansiedad relacionados los éxitos en la práctica del ejercicio. Se ha puesto especial interés en la correlación entre los niveles de concentración de hormonas (cortisol, testosterona y dehidroepiandrosterona) en muestras plasmáticas y de saliva observados durante el ejercicio, poniendo especial atención en cómo el tipo, duración e intensidad del ejercicio influyen sobre la concentración de esteroides en muestras de saliva tal como sucede en el caso de los niveles de concentración en las muestras séricas. Se han tomado en consideración las condiciones bajo las cuales se desarrollan los entrenamientos y las variaciones de los niveles de concentración de la respuesta en las muestras de saliva. Esta revisión bibliográfica analiza los resultados publicados hasta el presente relacionados con la determinación de los niveles de concentración de hormonas en muestras de saliva, principalmente los esteroides durante la práctica del deporte y los ejercicios. Las muestras de saliva aplicadas a la determinación de las concentraciones hormonales en determinadas disciplinas, constituyen una posibilidad real como

alternativa a las determinaciones en muestras plasmáticas y ofrece amplias perspectivas.

Palabras claves: saliva, marcador bioquímico, saliva tasa de flujo, saliva niveles hormonales, rendimiento físico, estrés psicofisiológico.

ABSTRACT

Saliva contains cells and compounds, of local and non-local oral origin, namely inorganic, organic non-protein, protein/polypeptide, and lipid molecules. Moreover, some hormones, commonly assayed in plasma, such as steroids, are detectable in oral fluid and peptide/protein, and non-steroid hormones have been investigated. The sports practice environment and athletes' availability, together with hormone molecule characteristics in saliva and physical exercise behavior effects, confirm this body fluid as an alternative to serum. This review focuses on the relation between salivary steroids and psychophysiological stress and underlines how the measurement of salivary cortisol provides an approach of self-report psychological indicator and anxiety change in relation to exercise performance. The correlation between salivary and plasma steroid hormone (cortisol, testosterone, and dehydroepiandrosterone (DHEA)) levels, observed during exercise, has been considered, underlining how the type, duration, and intensity of the exercise influence the salivary steroid concentrations in the same way as serum-level variations. Training conditions have been considered in relation to the salivary hormonal response. This review focuses on studies related to salivary hormone measurements, mainly steroids, in physical exercise. Saliva use in physical disciplines, as a real alternative to serum, could be a future perspective.

Key words: Saliva, biochemical marker, saliva flow rate, saliva hormonal levels, physical performance, psychophysiological stress.

La saliva ofrece una alternativa no invasiva y libre de estrés a las muestras séricas. Durante los últimos años, el análisis de saliva ha sido un método de elección útil para el análisis de hormona.

Numerosos artículos han descrito el uso de saliva para los propósitos analíticos en investigaciones clínicas (como en el campo de la endocrinología, neuroendocrinología) y en investigaciones fisiológicas (en el deporte y en las ciencias del ejercicio) (Tabla 1). Esta revisión está enfocada, particularmente al ejercicio como un activador y factor estresante físico de los sistemas hormonales, principalmente la hormona hipotalámica liberadora de corticotropina. Al mismo tiempo esta investigación bibliográfica presenta una visión general sobre la fisiología de la saliva y los procedimientos de valoración de los cambios hormonales durante la actividad física en relación a la duración, intensidad y tipo de ejercicio.

Tabla 1. Tipos de ejercicios y variación de los niveles hormonales en deportistas.

Tipo de ejercicio	Atletas	Hormonas	Hallazgos	Referencias
Tope	Futbolistas	sF	No variaciones antes y después de los ejercicios	Moreira et al. (2009)
Tope	Tenistas	sF	Incrementos el día de la competencia	Filaire et al. (2009)
Resistencia	Entrenados	sF	Incrementos después de los ejercicios	Crewther et al. (2008)
Resistencia	Voluntarios	sF, sT, sDHE	Incrementos de sF y sDHEA, no variación después de los ejercicios	Lusa Cadore et al. (2009)
Resistencia	Jugadores de Rugby	sF, sT	Disminución de sF, no variación de sT después de los ejercicios	Beaven et al. (2008)
Potencia	Atletas	sF	Incremento después de los ejercicios	Minetto et al. (2007b)
Competencia	Jugadores de Golf	sF, sT	Incrementos de sF y sT, variación después de las competencias	Doan et al. (2007)
Entrenamiento de resistencia	Ciclistas	sF, sDHEAS	Incremento de sF en reposo después de los ejercicios. Disminución de la relación sDHEAS/sF después de los ejercicios	Bouget et al. (2006)
Entrenamiento de resistencia	Atletas	sF	No diferencias entre atletas y sedentarios	Minetto et al. (2006)
Ejercicios agudos	Voluntarios jóvenes	sF, sDHEAS	Incrementos de sF y sDHEAS después de los ejercicios. Disminución de la relación sDHEAS/sF después de los ejercicios	Di Luigi et al. (2006a)
Ejercicios agudos	Atletas jóvenes	sF, sT	Incrementos de sT después de los ejercicios	Di Luigi et al. (2006b)
Ejercicios socinéticos	Atletas de competencia	sF	Incrementos de sF	Pacotti et al. (2005)
Tope	Jugadores de Rugby	sF, sT	Aumento de sF después de los ejercicios. Disminución de sF. Disminución de sF y aumento de sT/sF después de un tope de 4 horas.	Elloumi et al. (2003)
Cicloergómetro	Voluntarios	sF	Incrementos después de los ejercicios al 70% de VO ₂ máx y después de 60 min	Jacks et al. (2002)
Programa de ejercicios intensivos	Futbolistas	sF, sT	Disminución de sT/sF	Filaire et al. (2001b)
Ejercicios de Resistencia fuerte	Recreacionales entrenados en pesas	sT	Disminución de sT después de los ejercicios de resistencia	Kraemer et al. (2001)
Tope simulado de balonmano	Jugadores elites de balonmano	sT y sDHEA Basal	Niveles basales más bajos de sT y sDHEA con respecto al control; no variación durante el ejercicio	Filaire and Lac (2000)
Ejercicios en estera	Mujeres	F Salival y plasmático	Necesario considerar el efecto del ritmo circadiano	Thuma et al. (1995)
Ejercicios de ciclismo	Niños varones	F Salival y plasmático	Incrementos en los niveles séricos y salivales de sF y correlación durante y después de los ejercicios	del Corral et al. (1994)

Leyenda: sF, Cortisol salival; sT, Testosterona salival; sDHEA, Dehidroepiandrosterona salival; sDHEAS, Sulfate de Dehidroepiandrosterona salival.

La saliva como una nueva matriz alternativa al suero. Componentes de la saliva.

La composición salival varía en relación a la sérica o el componente mucoso de las glándulas (Chicharro Et al., 1998; Chiappin et al., 2007; Nieuw Amerongen et al., 2007); La contribución relativa de cada tipo de glándula al total de la secreción de saliva no estimulada varía de 65 %, 23 %, y 8 % hasta el 4 % para las glándulas submandibular, la parótida, Von Ebner, y glándulas sublinguales, respectivamente. Los componentes de saliva también tienen un origen no glandular; por lo tanto, el fluido oral no puede ser considerado como el único producto de las glándulas salivales, porque también contiene fluidos que se originan en las mucosas orofaríngea y gingival. El fluido oral también puede contener residuos de comida y compuestos derivados de la sangre (que se han difundido activa o pasivamente), como puede ser el caso de las proteínas plasmáticas, eritrocitos, y leucocitos en caso de inflamación oral o de lesiones de la mucosa.

La saliva contiene un gran número de compuestos de origen proteico, cuya estructura y función ha sido estudiada utilizando técnicas bioquímicas tradicionales, incluyendo electroforesis, cromatografía líquida, electroforesis de gel y capilar, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masa, e inmunoensayo. Las proteínas cuyas funciones pueden ser relacionadas con la respuesta inmune y de la defensa oral, como la lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, aglutininas, quitinasas, y mucinas en saliva que participan de la protección de los tejidos orales; otras proteínas poseen propiedades bactericidas, como son las histatinas y defensinas (Schipper Et Al., 2007). Además, algunas hormonas similares a los esteroides comúnmente medidos en plasma, péptidos no esteroideos, y las hormonas proteínicas, pueden ser detectados en el fluido oral (Gröschl, 2009; Wood, 2009). Estas hormonas pueden derivarse de la circulación por difusión pasiva o por transporte activo o pueden originarse en parte en ambas fuentes.

Hormonas salivales: Síntesis, difusión y transporte

Los componentes de suero, que no son componentes salivales normales (drogas y las hormonas), pueden alcanzar la saliva por mecanismos de transferencia dentro de los cuales se incluyen las rutas intracelulares y extracelulares. La ruta intracelular más común es la difusión pasiva, aunque también se ha reportado el transporte. La ultrafiltración, que ocurre a través de las uniones entre las células, es la ruta extracelular más común. Las moléculas de suero que alcanzan la saliva por difusión, deben cruzar cinco barreras: La pared capilar, el espacio intersticial, la membrana plasmática basal de las células del ácino o las células del ducto, el citoplasma del ácino o las células del ducto, y la membrana plasmática del lumen (Kaufman y Lamster, 2002; Gröschl, 2008).

Los componentes de suero, los cuáles son solubles en la membrana plasmática lipídica de las células acínicas de la glándula salival, pueden pasar libremente a las células y difundirse hacia la saliva. Este mecanismo es aplicado a los compuestos lípido-solubles como son las hormonas esteroideas no conjugadas.

Las moléculas polares pequeñas, como sulfato de esteroide, están restringidas a la ruta de ultrafiltración como un modo de entrada a la saliva (Wood, 2009). Los esteroides no conjugados/no unidos, como el cortisol libre, se difunden libremente a través de la glándula salival y experimentan pocos cambios en relación a la tasa salival de flujo. De manera contraria, un esteroide conjugado como es el sulfato del dehidroepiandrosterona (DHEAS) es afectado por las tasas de variaciones del flujo salival.

Los compuestos hidrófilos utilizan un mecanismo de transporte activo para pasar a las células salivales. Para estas rutas diferentes de entrada, las concentraciones salivales complejas están o no relacionadas con sus concentraciones en el suero. Algunas hormonas peptídicas, como la insulina, son transferidas activamente a la saliva desde la circulación y, después de la captación de glucosa, aparece en la saliva de manera similar al comportamiento de las concentraciones plasmáticas, mientras que el Peptido C, parecido a insulina por su tamaño, no entra en la saliva (Kaufman y Lamster, 2002; Gröschl, 2009). Otros péptidos, como es el caso de algunas citoquinas, se producen en las glándulas salivales y se secretan por exocitosis, en una forma de transporte dependiente de energía, lo cual hace difícil interpretar las concentraciones salivales porque no siempre se correlacionan con las concentraciones plasmáticas (Gröschl, 2009).

Interrelación Saliva/plasma: Hormonas esteroideas salivales

La medición de las concentraciones de esteroides es un indicador de utilidad en el laboratorio de aplicaciones en endocrinología y toxicología. Algunas de estos esteroides circulan en el organismo en forma libre (no unidos) y unidos a proteínas específicas y no específicas, otros pueden sufrir conjugación para producir los esteroides conjugados como son los sulfatos, glucuronatos, etc. Sin embargo en el análisis de esteroides en saliva se pueden considerar estos aspectos en forma conjunta con los mecanismos de producción/entrada en la cavidad oral y la saliva. Por otra parte, muchos estudios han centrado su atención en la relación entre las concentraciones de varias hormonas esteroideas en muestras plasmáticas y de saliva.

Los esteroides conjugados, tales como la DHEAS muestran un marcado decline en su concentración en relación con la tasa de flujo, lo cual es debido a un proceso de ultrafiltración que limita la tasa de flujo (Wood, 2009).

Los esteroides conjugados, como son la DHEAS y el sulfato de estriol se presentan solamente como el 1% de la fracción de la concentración plasmática no unida, mientras que los esteroides salivares no unidos, como es el caso del cortisol, estradiol y testosterona muestran una correlación con la concentración de su forma plasmática libre (Vining et al., 1983a; Wood, 2009). El cortisol, en forma similar a otros esteroides no unidos, se difunde libremente a través de las glándulas salivares y muestran poco cambio en la tasa de variación del flujo.

Sin embargo, la concentración en saliva y plasma puede además diferir debido a que las glándulas salivares tienen la propiedad de metabolizar esteroides. La concentración de cortisol salivar es solamente 50-60 % del cortisol libre plasmático correspondiente, y la relación cortisol/cortisona es aproximadamente 1:4 con respecto al 8:1 en el suero. Con relación a las cortisonas séricas existe una menor afinidad por las Globulinas de Unión a los Corticosteroides (CBG) y a la presencia en las glándulas salivares de 11-beta-hidroxiesteroides deshidrogenasa del tipo 2, la cual cataliza la conversión del cortisol en cortisona.

Sin embargo, la concentración de cortisol libre es mucho mayor que las de cortisol en saliva (Shimojo et al., 1997). Otros esteroides como es el caso de la progesterona, androstenediona y estradiol son metabolizados en las glándulas salivares y por esta razón, sus concentraciones salivares y séricas difieren (Swinkels et al., 1992; Blom et al., 1993).

Una comparación entre las concentraciones totales de esteroides libres muestra una correlación significativa para casi todos los esteroides salivares (Wood, 2009). Se ha informado que existe una correlación muy baja con la testosterona plasmática libre en el caso de las mujeres (Broadbent, 2002). La correlación del cortisol entre las concentraciones séricas total y libre con el cortisol salivar libre está en relación con la concentración sérica de CBG (la máxima concentración sérica de unión es de aproximadamente 600 nmol/L de cortisol), con una respuesta bifásica cuando se realiza un ploteo contra la concentración de cortisol sérico total. De hecho, una alta concentración de CBG durante el embarazo mantiene la correlación inicial hasta altas concentraciones de cortisol sérico total (Vining et al., 1983b; Wood, 2009).

Hormonas peptídicas salivales

Las hormonas proteicas polipeptídicas son quizá una nueva herramienta analítica del laboratorio clínico, pero hasta el presente se han desarrollado, muy pocas investigaciones sobre los niveles de concentración de las hormona proteicas polipeptídicas en saliva.

Desde el punto de vista teórico, los niveles salivales de las hormonas proteicas no han sido bien correlacionados debido a que estas moléculas son demasiado grandes para difundirse hacia la saliva por medio de la difusión pasiva a través de las células o por ultrafiltración. La detección en el laboratorio de estas hormonas en saliva pudiera ser debido a la contaminación de suero (Kaufman y Lamster, 2002).

Sin embargo, Rantonen et al. (2000) han medido la hormona de crecimiento (GH) en saliva humana y han encontrado una correlación lineal entre los niveles plasmáticos y salivales. Este descubrimiento sugiere una difusión pasiva de GH desde la sangre hasta saliva (Rantonen et al., 2000). En saliva, también han sido detectadas otras hormonas proteicas, como son prolactina (Lindell et al., 1999), el factor de crecimiento insulino-like (Kerr et al., 1995; Antonelli et al., 2007, 2009), y la insulina (Fekete et al., 1993).

Gröschl et al. (2001) demostraron que la leptina es producida, almacenada, y secretada por las glándulas salivales; de hecho, su gen se expresa en la mucosa oral. Se ha observado una correlación fuerte entre los niveles salivales y plasmáticos de leptina, ya que es posible la existencia de un transporte desde los vasos sanguíneos a las glándulas salivales (Gröschl et al., 2001; Aydin et al., 2005). También, la ghrelina es secretada y está presente en la saliva humana (Gröschl et al., 2005). La correlación encontrada entre saliva y plasma sugiere el transporte de la ghrelina desde los vasos sanguíneos a las células glandulares (Aydin et al., 2005). Se ha demostrado la producción autónoma de ghrelina por las glándulas salivales (Gröschl et al., 2005).

Otras hormonas salivales

Las catecolaminas pueden ser reconocidas en la saliva (Kennedy et al., 2001). Al parecer las mismas se originan por difusión desde el plasma, pero algunas catecolaminas plasmáticas también se derivan de la liberación directa de las terminaciones del nervio simpático. Por esta razón, su concentración se correlaciona muy pobremente con las concentraciones plasmáticas. La concentración de metabolitos de la catecolamina (similares al dihidroxifenilglicol), por otra parte, muestran una buena correlación con los niveles plasmáticos (Kennedy et al., 2001).

Los niveles de melatonina en saliva alcanzan los 500 pmol/L durante la media noche y se ha encontrado que se correlacionan en forma significativa con las concentraciones plasmáticas (Römsing et al., 2006). Algunos autores han informado sobre la presencia de hormonas tiroideas en la saliva, demostrando una buena correlación entre las concentraciones salivares y plasmáticas. (Putz et al., 1985; Gotovtseva & Korot'ko, 2002). Putz et al. (1985) observaron que los niveles de concentración de tiroxina (T4) en saliva, al igual que los niveles de tiroxina sérica libre (free T4), no dependían de la fluctuación de las concentraciones séricas de TBG.

Ejercicio físico, saliva y hormonas

La saliva provee un modo conveniente y no invasiva, para determinar las concentraciones hormonales. Dada la correlación entre los valores hormonales séricos y los salivales, se han desarrollado estudios para evaluar la influencia de ejercicio físico sobre los niveles salivales de hormona.

El ejercicio es un factor estresante físico y activa los sistemas hormonales, como son la hormona hipotalámica liberadora de corticotropina, la hormona adrenocorticotrópica de la hipófisis anterior, y los glucocorticoides adrenales. Además, la respuesta adrenocortical durante el ejercicio intenso o crónico es influenciada por factores fisiológicos y psicológicos. Debido a que las determinaciones de hormonas en muestras de saliva son fácilmente accesibles, las mismas pueden ser utilizadas para evaluar las condiciones de competición o de entrenamiento, en el control médico del entrenamiento deportivo y además con propósitos antidopaje.

Condiciones para la toma de muestras de saliva y estabilidad

La colección de saliva, en estos últimos años, ha sido una alternativa no invasiva aceptada a la utilización de muestras plasmáticas. Esta técnica relativamente no invasiva permite la determinación de esteroides sin peligro de contaminación de los resultados debido a la tensión nerviosa que produce la aguja y provee la posibilidad de realizar la toma de muestra en forma personal. La saliva, con relación al plasma, resulta fácilmente accesible para la colección por atletas no sólo antes y después de la actividad deportiva sino también durante las etapas de entrenamiento.

La obtención de muestras de sangre u orina durante el entrenamiento resulta problemático en términos de colección porque se hace necesaria una interrupción durante el régimen de entrenamiento (Gröschl, 2008). Existe diferentes métodos para producir/estimular y coleccionar las muestras de saliva. Diferentes dispositivos pueden ser utilizados y la colección de saliva puede ser realizada con o sin estimulación y escupiendo en forma pasiva de manera incontrolada (Gröschl, 2008). Un escupidor es el método preferido de colección de saliva y puede ser manipulado con holgura por los atletas y personal técnico. No obstante, es importante tener en cuenta el tipo de absorbente que se utiliza para recolectar las muestras en relación con el esteroide que se va a determinar. Se debe evitar la utilización de absorbentes de algodón cuando se van a analizar los esteroides, excepto cortisol; mientras que como una alternativa se pueden utilizar receptores de polipropileno (Lewis, 2006; Wood, 2009).

Como una precaución general, la muestra de saliva debe ser coleccionada al menos 30 min después de comer, beber, y cepillar los dientes.

Lógicamente, es importante considerar la influencia de los ritmos circadianos en la secreción hormonal con relación a las variaciones salivales de las hormonas esteroideas (Morineau Et Al., 1997). Además, la saliva presenta tasas variables de flujo.

Algunos niveles de concentración de hormonas en saliva, como es el caso de la DHEAS, están influenciados por el flujo; por lo tanto, la concentración debería calcularse teniendo en cuenta la tasa de flujo (Wood, 2009). Por consiguiente, el dispositivo de recolección debe ser primeramente pesado antes y después de la colección de saliva. En el siguiente párrafo, consideraremos las variaciones en la tasa de flujo con relación al ejercicio.

La estabilidad de las hormonas esteroideas salivales para ser analizadas ha sido estudiada por diferentes autores (Gröschl et Al., 2001a; El Garde y Hansen, 2005; De Palo et al., 2009; Wood, 2009). Los esteroides salivales son estables a 14°C durante un mes y durante 3 meses a - 20°C. El Cortisol salival, en particular, es estable durante 1 año a - 80°C y una muestra no centrifugada durante 9 meses a -20°C.

Estas características generales de condiciones de muestreo de saliva y la estabilidad son seguidas durante la actividad/competición deportiva. Existen varios procedimientos y dispositivos recolectores para saliva aplicables para diferentes objetivos. En algunos trabajos, los atletas han utilizado saliva sin estimulación utilizando un método pasivo de salivación, coleccionando la prueba en un tubo de ensayo (Beaven Et Al., 2008; Cadore et al., 2008; Crewther et al., 2008; Lusa Cadore et al., 2009; Moreira et al., 2009; Thomas et al., 2009). En otros casos, los atletas coleccionaron muestras de saliva estimulada y no estimulada utilizando un algodón colocado en la boca y coleccionando la saliva en un tubo de ensayo (escupidera) (Bouget Et Al, 2006; Di Luigi et al., 2008, Minetto Et Al., 2008, 2007b; Filaire et al., 2009; Lippi et al., 2009).

Se debe tener especial cuidado considerando los ritmos circadianos y el régimen dietético para evitar a cualquier efecto confusor. Las pruebas de saliva se toman generalmente en horas estandarizadas del día y los períodos de ayuno. El entrenamiento también ejerce influencia sobre la secreción hormonal relacionado con el ejercicio, y los atletas tienen que estar bien informados para que suspendan el entrenamiento un día antes como mínimo a la toma de muestra (Eloumi Et Al., 2008, 2003; Filaire et al., 2009, 2001a). En los siguientes párrafos, se hará mención a algunos aspectos relacionado con las condiciones de diferentes ejercicios.

En algunos estudios desarrollados en deportes, las modalidades más utilizadas para coleccionar saliva (estimulada y no estimulada, coleccionado con dispositivos diferentes y babeo pasivo) no son unívocos; por lo tanto, es importante estandarizar el protocolo que se utiliza en el ejercicio y el procedimiento considerando todos los aspectos previos como son los ritmos circadianos, tasa de flujo, ayuno y entrenamiento, y tomar precauciones para evitar contaminaciones con la sangre gingival (Thuma Et Al., 1995; Kraemer et al., 2001; Dimitriou et al., 2002; El Banfi y Dolci, 2003; Bouget et al., 2006).

El flujo salival y el ejercicio físico

La composición salival puede ser influenciada por el procedimiento de recolección utilizado incluyendo la estimulación de flujo salival. Los cambios en la tasa de flujo salival pueden afectar la concentración de indicadores salivales y también de su disponibilidad/estabilidad debido a los cambios en la composición salival como son el pH (Ljungberg Et Al., 1997).

Es de esperar que exista variabilidad en la tasa de flujo salival, bajo condiciones diferentes, entre individuos y en el mismo individuo (Kaufman y Lamster, 2002). La respuesta del flujo salival y su composición durante el ejercicio es influenciada por actividad del sistema nervioso y por el eje hipotalámico-adrenal-hipofisario (HPA). Las glándulas salivales son inervadas por ambos nervios parasimpático y simpático y el incremento de la actividad del sistema nervioso inhibe la tasa de flujo de saliva (Chicharro Et Al., 1998; Busch et al., 2002). Sin embargo, el efecto de ejercicio en la tasa de flujo de saliva sigue siendo un tema controversial.

Algunos estudios no han logrado demostrar una respuesta de la tasa de flujo de saliva durante el desarrollo de series de ejercicios a intensidades maximales y submaximales (Allgrove Et Al., 2008). En otros estudios se ha informado una disminución marcada en la respuesta al ejercicio de resistencia prolongado (Fahlman Et Al., 2001; Engels et al., 2003) o cuándo se ingirió agua u otro tipo de bebida deportiva casera (limonadas, etc) (Horswill Et Al., 2006). Se ha sugerido que la reducción total en la tasa de flujo de saliva no estimulada, después del ejercicio prolongado, se deba predominantemente a la deshidratación tal como ha sido demostrado por estudios en los cuales se combinaron los ejercicios. La restricción del ejercicio y la práctica de ejercicios en un entorno muestra grandes reducciones en la tasa de flujo salival lo cual puede ser impedido cuando los sujetos reciben suficiente agua para contrarrestar las pérdidas que producen durante el ejercicio (Walsh Et Al., 2004). Sin embargo, los carbohidratos y la ingestión de líquidos influyen sobre la sIgA y la respuesta de la tasa de flujo de saliva en relación a la intensidad de los ejercicios y ejercicios crónicos intensos (Bishop et al., 2000; Bishop y Gleeson, 2009).

Hormonas esteroideas salivares y deporte

Considerando que las hormonas esteroideas pueden ser analizadas de una forma segura en las muestras de saliva, debido a que las mismas atraviesan las barreras endoteliales y epiteliales por difusión pasiva, la determinación de las concentraciones de esteroides en muestras de saliva, durante los últimos años es un procedimiento que ha sido utilizado frecuentemente en la evaluación de la actividad atlética. El cortisol salival, testosterona, y DHEAS son las hormonas que más han sido estudiadas en relación al ejercicio.

Cortisol salival y ejercicio físico: Cortisol salival y estrés psicofisiológico

El cortisol juega un rol central en la respuesta fisiológica y del comportamiento a los retos ante estresores físicos y psicológicos mediante la activación del eje HPA, lo cual estimula la liberación de hormonas de la corteza adrenal (Tsai et al., 2010). El cortisol (sF), es un marcador representativo del cortisol libre circulante que se ha recomendado como un indicador del estrés por entrenamiento, pero además el mismo puede ser utilizado debido a que evita el estrés causado por punción venosa. Por otra parte, sF puede utilizarse para determinar el estrés psicofisiológico durante las sesiones de ejercicios simples o repetitivos incluso en el caso de que no se haya encontrado una relación inequívoca entre la intensidad de la ansiedad y las concentraciones de sF

después de las competencias (Filaire et al., 2001b; Thatcher et al., 2004). El mismo nivel de ansiedad puede ser percibido por algunos atletas como facilitadores y por otros como debilitadores en relación con su rendimiento deportivo (Hanton et al., 2004; Filaire et al., 2009). Filaire et al. (2009) demostraron una respuesta del sF a las competencias (tenis), las cuales se caracterizaron especialmente por un aumento de la anticipación en sF en la mañana de la competencia con respecto a los valores de referencia tomados dos semanas más tarde (165% para hombres y 185% para mujeres, $P < 0.01$). Los jugadores de tenis hombres y mujeres tienen el mismo patrón de respuesta al cortisol, incluso si las concentraciones de cortisol son significativamente superiores en mujeres que en hombres en el día de la competencia (valores AUC, Área Bajo la Curva 118.5-5.7 vs 81.5-8.9; $P < 0.05$, 130%). De hecho, la ansiedad somática fue significativamente superior en las mujeres (123%, $P < 0.05$) en comparación con los hombres, mientras que la autoconfianza fue significativamente superior en los hombres (134%, $P < 0.05$). Además se observaron diferencias estadísticamente significativas entre perdedores y ganadores.

Los niveles de concentración de sF determinados el día de la competencia fueron significativamente mayores que los valores encontrados durante los periodos de descanso (08:00 horas), en los perdedores ($P < 0.001$), así como en los ganadores ($P < 0.01$). Sin embargo, valores significativamente mayores ($P < 0.05-0.01$) se observaron en los perdedores con respecto a los ganadores independientemente de la hora del día de la competencia, excepto durante la tarde (20:00 horas). De hecho, en los perdedores se observaron valores de AUC significativamente superiores que en los ganadores (120.4-12.8 vs 76.7-8.5; $P < 0.05$, 135%). Los ganadores mostraron menor ansiedad cognitiva y mayor registro de auto-confianza que los perdedores. La ansiedad somática fue significativamente mayor en los perdedores. La conclusión sacada por los autores de esta investigación fue que la determinación de las concentraciones de cortisol en el mismo momento como indicador psicológico de auto-reporte provee un método para analizar los cambios en la ansiedad y su relación con el rendimiento deportivo.

Por otra parte, las disciplinas deportivas pueden ser altamente estresantes y las concentraciones de sF pueden ser mayores que las observadas durante los días de descanso. De hecho, los niveles de sF basales (08:00 horas) en el día de una carrera de motociclismo y durante la competencia fueron superiores que los determinados a la misma hora en el día de descanso (35.5-2.8 y 31.4-2.2 vs 13.2-2.5 nmol/L, respectivamente) (Filaire et al., 2007).

La competencia real puede inducir mayores respuestas hormonales en los atletas en relación con los valores que se obtienen durante la práctica de ejercicios de laboratorio (Filaire et al., 1999; Elloumi et al., 2003; Haneishi et al., 2007). Se considera que el componente psicológico de la competencia es el responsable del incremento en la respuesta del cortisol más que las mismas variaciones psicológicas. Doan et al. (2007) encontraron aumentos significativos ($P < 0.05$) en las concentraciones de cortisol salival durante una competencia de golf (esfuerzo físico de 35-41% de VO_2 máx). Se tomó una muestra de saliva a los 45min antes de la ronda de competencias e

inmediatamente después de cada hoyo, para un total de 37 muestras por competidor. Se coleccionaron muestras basales durante el tiempo que duró la competencia y durante diferentes días para ajustar las variaciones debidas al ritmo circadiano. Sin embargo, no se observaron cambios en las concentraciones de testosterona durante la competencia en comparación con la línea de base. La relación entre las concentraciones de testosterona/cortisol en muestras de saliva (T/C) fue significativamente inferior durante toda la competencia en comparación con los niveles basales y los mejores resultados (menor registro de goles) en esta competencia estuvieron relacionados con una relación T/C inferior ($r=0.82$).

Un tope de entrenamiento en el cual se realice una carrera de competencia puede reducir el estrés emocional inherente al ambiente de la competencia real. Moreira et al. (2009) estudiaron un encuentro de fútbol profesional al máximo nivel utilizando este tipo de modelo de estrés y encontraron que la influencia del tope de entrenamiento intenso parece ser mínimo sobre los cambios de concentración del cortisol salival. La sesión de entrenamiento se realizó durante la tarde y las muestras de saliva pre-competencia se obtuvieron a las 3:00 horas. Cuando se eliminan los componentes que induce una competencia real, el estrés inducido por el tope no parece ser suficiente para inducir un impacto significativo en los parámetros endocrino en todos los atletas.

En un estudio realizado por Rimmele et al. (2007), los autores demostraron cómo un protocolo de estrés psicosocial induce aumentos significativos en los niveles de cortisol salival libre tanto en deportistas elites bien entrenados como en los sujetos no entrenados ($P<0.01$). Veinte y dos hombres entrenados (deportistas elites) y 22 hombres sanos no entrenados fueron sometidos a un estresor psicosocial de laboratorio estandarizado (TSST). Las concentraciones de cortisol medidos en muestras colectadas durante la mañana inmediatamente antes (-1min relativo a la selección del TSST) y después de la exposición al estrés no difirieron entre los grupos y los valores basales ($P=0.37$).

Sin embargo, los atletas entrenados mostraron respuestas del estresor al cortisol significativamente más bajas en comparación con el grupo de sujetos no entrenados, produciendo un efecto principal significativo para el grupo ($P<0.05$). Por lo tanto, los deportistas elites mostraron reactividad reducida al estresor psicosocial, caracterizado por una baja respuesta adrenocortical, autonómica y una menor respuesta del estrés psicosocial al estresor psicosocial. Estos resultados sugieren que la actividad física puede proporcionar un efecto protector contra los trastornos producidos por el estrés. Las determinaciones de sF pudieran representar una herramienta para el estudio de la relación psicosocial entre la ansiedad y el rendimiento de los ejercicios.

Correlación entre el suero y la saliva

Es conocido que factores como la duración, el tipo, la intensidad, y estado de entrenando de los atletas, en relación con la respuesta al ejercicio, influyen sobre la concentración del cortisol plasmático. Las investigaciones desarrolladas sugieren que las concentraciones plasmáticas de cortisol están relacionadas con la intensidad y la duración del ejercicio (Jacks Et Al., 2002; Tremblay et al., 2005). En particular, el ejercicio que se realiza a una intensidad ≥ 60 % del consumo máximo de oxígeno se ha demostrado que aumenta la secreción de cortisol (Tremblay et al., 2005). Estos factores también se han tomado en cuenta en el caso del cortisol salival, debido a la correlación que se ha encontrado entre las concentraciones séricas y salivales de cortisol en estado de reposo. De hecho, Neary et al. (2002) han demostrado una fuerte relación entre los niveles de reposo de cortisol, medidos en las horas de 07:30–08:00 en suero y saliva, y en el cortisol urinario libre de 24 horas, lo cual sugiere que cualquiera de ellos puede ser utilizado para monitorear la hormona cortisol durante un período de recuperación del ejercicio de entrenamiento.

Sin embargo, existen controversias concernientes con la correlación entre las concentraciones de cortisol en muestras plasmáticas y saliva durante el ejercicio. En un estudio desarrollado por Port (1991), aunque se observó una correlación significativa ($r=0.86$, $P < 0.001$) entre las concentraciones séricas y salivales de cortisol durante una prueba incremental en un cicloergómetro con cargas submaximales realizadas entre las 10:00 y 12:00 horas, lo mismo no fue observado con la carga máxima en una prueba realizada bajo las mismas condiciones. En otro estudio, Paccotti et al. (2005), usando un protocolo isocinético realizado por la tarde a las 16:00 y 3 h después de una comida estándar, se evaluó la respuestas salival y plasmática en sujetos físicamente entrenados y en sujetos no entrenados y observaron una relación notablemente no lineal entre los niveles séricos y salivales de cortisol. Después de la transformación logarítmica de datos se observó una correlación significativamente positiva ($r=0.62$, $P < 0.001$), lo cual sugiere, aparentemente, la existencia de una relación exponencial entre los valores de concentración de cortisol en las muestras plasmáticas y los valores observados en muestras salivales. Cadore et al. (2008) demostraron, en un grupo de voluntarios no competitivos adiestrados en deportes de fuerza y no entrenados, que el cortisol sérico se correlacionaba significativamente con el cortisol salival antes ($r=0.52$, $P < 0.005$) y después ($r=0.62$, $P < 0.001$) del protocolo de ejercicios de resistencia. Las pruebas de sangre y de saliva fueron obtenidas entre las 08:00 y 09:00 horas después de 2 días sin una sesión de entrenamiento. Una posible explicación para estas discrepancias podría ser las diferencias entre los protocolos de ejercicios que fueron utilizados (es decir, la carga de ejercicios) y/o el tiempo de la toma de muestra post-ejercicio obtenida después del ejercicio (el tiempo necesario para reflejar las modificaciones que ocurrieron en las concentraciones de cortisol plasmático y salival durante el ejercicio) y los diferentes tiempos en los cuales fueron realizados los ejercicios.

Tipo, duración e intensidad del ejercicio

Jacks et al. (2002) informaron que la concentración de sF guardaba una relación lineal con la intensidad y duración del ejercicio. Durante las sesiones de máxima intensidad de los ejercicios (76.0-6.0% of VO_2 máx), sF fue significativamente mayor a los 59 minutos de ejercicio ($P < 0.004$) y a 20 min de recuperación ($P < 0.016$) que a los mismos intervalos de tiempos durante la sesión de control de descanso. No se encontraron diferencias en la concentración de sF durante el descanso de los ejercicios de baja intensidad (44.5-5.5%), e intensidad moderada (62.3-3.8%). Todas las pruebas fueron realizadas durante los días en los cuales los sujetos, hombres activos, se despertaban en un tiempo estándar. Todas las pruebas fueron completadas en el mismo momento del mismo día (entre las 11:00 y las 14:00 horas). En tres ocasiones separadas, los sujetos completaron una serie de 1 hora en un cicloergómetro con ejercicios de baja, moderada y alta intensidad y una sesión de recuperación.

Cada prueba fue separada por al menos por un periodo de recuperación de 1 día. A los sujetos se les instruyó para que tomaran el desayuno 3 horas antes de los ejercicios y no comer nada entre el desayuno y la prueba. A los individuos se les advirtió abstenerse de realizar ejercicios de gran intensidad 48 horas antes de la prueba. Las muestras de saliva se recolectaron antes de los ejercicios, durante los ejercicios, y a los veinte minutos de recuperación. Las muestras de saliva se recolectaron durante la sesión de recuperación y los mismos intervalos que los utilizados para las series de ejercicios.

Thomas et al. (2009) demostraron que las series de ejercicios de ciclismo repetidos a corto tiempo y alta intensidad, realizados durante dos mañanas y al menos tres horas de un desayuno ligero, producía una respuesta significativa ($P < 0.05$) de sF en post vs pre-ejercicio (0.20-0.12 vs 0.13-0.69 mg/dL o 5.5-3.3 vs 3.6-19.0 nmol/L) en muchachos adolescentes, lo cual coincide con los reportes de otros autores (Di Luigi et al., 2006a). Una falta de incremento en sF, por el contrario puede ser debido a un estímulo inadecuado de los ejercicios o a la ingestión de alimentos pre-ejercicios (Thomas et al., 2009).

Sin embargo, los cambios en la producción de cortisol como respuesta al ejercicio no se hacen evidentes de forma instantánea al concluir los ejercicios. De hecho, Lac et al. (1999) reportaron un porcentaje de incremento teórico en los niveles de sF alrededor de los 15 minutos después de un test incremental realizado en la mañana con una duración de 12 a 18 minutos en un cicloergómetro, y este efecto puede ser explicado por las diferencias en el metabolismo periférico de la hormona.

Crewther et al. (2008) examinaron la respuesta del cortisol salival libre a los ejercicios de resistencia con respecto a las diferentes variables de entrenamiento, generando una ecuación mediante la duración de la carga de entrenamiento y el volumen de la carga. La sesión experimental fue realizada en el mismo momento del día (entre las 14:00 y las 17:00 horas). Los autores encontraron altos niveles de sF en respuesta al esquema de hipertrofia. Se observó un incremento significativo ($P \leq 0.000-0.024$) en relación con la

concentración pre-ejercicio, cuando se comparó inmediatamente después del ejercicio, el tiempo 0 (47 %), con 60 minutos después del ejercicio, tiempo de recuperación (290 %), mientras que los esquemas de fuerza y resistencia máxima produjeron poco o ningún cambio de acuerdo a los niveles de concentración de cortisol en muestras de plasma o saliva encontrados por otros investigadores (McGuigan et al., 2004; Kraemer & Ratamess, 2005).

Después de un protocolo múltiple de ejercicios de resistencia de aproximadamente 25 minutos de duración, en voluntarios entrenados y no entrenados, Cadore et al. (2008) encontraron una correlación moderada entre los valores de concentración de cortisol en suero y saliva y una mayor significación ($P < 0.001$) en la concentración de sF después y antes de los ejercicios de resistencia (2.16-1.10 vs 1.39-0.75 mg/dL o 59.6-30.3 vs 38.3-20.7 nmol/L).

Crewther et al. (2009) compararon el rendimiento neuromuscular (velocidad, fuerza, resistencia) de jugadores de la categoría elite, por posiciones de juego (delanteros y defensas), y analizaron la interrelación entre el rendimiento de los jugadores y la concentración de hormonas salivares. Para la exploración de las variaciones diurnas, los sujetos fueron analizados en el mismo momento del día (09:00 horas). Las muestras de saliva fueron recolectadas después de cada prueba y la concentración cuantificada de sT, y la relación sF: sT/sF en el día de la prueba de velocidad fue superior en los jugadores de rugby defensores que en los atacantes (98.6-72.7 vs 48.0-22.9, $P < 0.05$). La concentración de sT y/o de sF de los jugadores se correlacionó con la velocidad, fuerza y resistencia, especialmente en el caso de los defensores ($P < 0.05$), estos resultados confirman que existe una interrelación entre el rendimiento neuromuscular y el patrón de secreción de hormonas salivares.

Condiciones de entrenamiento

Se ha investigado las respuestas hormonales a los ejercicios de resistencia entre los entrenamientos de fuerza a largo plazo y los hombres de edad mediana no entrenados (Lusa Cadore et al., 2009). La saliva fue obtenida entre las 08:00 y las 09:00 horas después de dos días sin entrenamiento. Los sujetos entrenados mostraron un aumento significativo ($P < 0.05$) en la testosterona (sT) después de los ejercicios de resistencia (124-110 vs 150-97 pg/mL or 0.43-0.38 vs 0.52- 0.34 pmol/L); no se observaron diferencias en los sujetos no entrenados (148 - 100 vs 171-111 pg/mL o 0.51-0.35 vs 0.59-0.38 pmol/L). Por el contrario, en ambos grupos hubo incrementos ($P \leq 0.05$) en sF (entrenados: 1.4-0.6 vs 2.06-1.0 mg/dL; no entrenados: 1.5-0.8 vs 2.3-1.2 mg/dL o entrenados: 38.6-16.5 vs 56.8-2.7 nmol/L; no entrenados: 41.4-22.1 vs 63.4-33.1 nmol/L) y DHEA (entrenados: 0.6-0.3 vs 0.9- 0.6 ng/dL; no entrenados: 0.65-0.3 vs 0.97-0.7 ng/dL o entrenados: 0.02-0.01 vs 0.03-0.02 nmol/L; no entrenados 0.02-0.01 vs 0.03-0.02 nmol/L). Se ha sugerido una posible presencia de la respuesta de adaptación de sT a los ejercicios de resistencia en los sujetos entrenados en comparación con los sujetos no entrenados. Tal tipo de adaptación no se observa sobre los niveles de sF y DHEA en estos sujetos debido a que las respuesta observadas fueron similares en ambos grupos.

Paccotti et al. (2005) encontraron una mayor respuesta de a sF en un grupo de veinte atletas de competencia entrenados en resistencia y fuerza en comparación con 11 atletas no competitivos, inmediatamente después y a los 90 y 120 minutos antes de finalizar una serie de ejercicios isocinéticos agudos de alta intensidad realizados por la tarde a las 16:00 horas tres horas después de haber ingerido una dieta estandarizada.

Sin embargo, con relación a los diferentes tipos de entrenamientos, la respuesta de sF fue superior en los atletas de fuerza comparados con los de resistencia a los 60, 90 y 120 minutos después de finalizar los ejercicios (niveles picos a los 60 min: 51.2-18.5 vs 27.5-20.8 nmol/L, $P \leq 0.05$, respectivamente).

Minetto et al. (2007b) encontraron una respuesta superior a los ejercicios isocinéticos en los atletas competitivos que en los sujetos sedentarios. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los atletas y sedentarios en la tasa de recuperación hormonal. Las pruebas en los dos grupos se realizaron durante la tarde (16:00 horas), 3 horas después de una dieta estandarizada. El análisis de un subgrupo dentro del grupo de atletas mostró una mayor respuesta para la ACTH, cortisol y lactato en los atletas de fuerza con respecto a los atletas de resistencia.

Estos resultados no confirman el concepto de que un control por retroalimentación del eje HPA pudiera representar una herramienta de entrenamiento individual. Sin embargo, el mismo autor (Minetto et al., 2008) investigó la posible adaptación de eje HPA en jugadores de fútbol voluntarios después de un periodo de entrenamiento intensivo (un periodo de 7 a 21 días, 1.0 h, correspondiente a un aumento promedio en la carga de entrenamiento del 60%) utilizando dos índices diferentes: respuesta del cortisol al despertarse y cortisol salival a la media noche. A todos los atletas se les instruyó para que recolectaran las muestras de saliva de acuerdo a un esquema idéntico durante dos mañanas consecutivas ambos antes (días 1 y 2) y después (días 9 y 10) del periodo de entrenamiento. Todos los atletas dieron la primera muestras de saliva inmediatamente después de despertarse, y las muestras restantes 15 y 30 minutos más tarde para la respuesta al cortisol y el cortisol salival de media noche a las 24:00 horas al final del primero y el novena día. Minetto et al. (2008) encontraron un aumento significativo con una respuesta al despertar post-entrenamiento contra una respuesta de cortisol al despertar pre-entrenamiento ($P < 0.001$) después de un periodo de entrenamiento de 7 días. El cortisol salival de media noche también se incrementó en forma significativa después del entrenamiento (antes 3.0- 0.7 vs después: 5.9-3.3 nmol/L; $P < 0.017$). La asociación entre la respuesta elevada del cortisol al despertar y el estrés percibido pudiera ser el resultado de un eje HPA hiper-respondedor, una consecuencia de la activación frecuente del eje activado por el estrés del ejercicio. Sin embargo, la presencia de un no-respondedor (bajo rendimiento) con un bajo incremento en la respuesta del cortisol al despertar, con respecto a los atletas respondedores (alto rendimiento), con un mayor incremento de la respuesta del cortisol al despertar ,podría indicar que ha ocurrido una adaptación disregulada en atletas los cuales han experimentado una mayor disminución en el rendimiento después

del entrenamiento, con cambios hormonales menores o sin ellos . Gouarné et al. (2005) evidenciaron una asociación entre la adaptación disregulada y la reducción en la respuesta del cortisol al despertar en 10 triatletas comparado con 9 sujetos entrenados. Los sujetos se despertaron a las 07:00 horas (después de 9 horas de sueño) e inmediatamente recolectaron 3 ml de saliva (fluido natural no estimulado) en un tubo de ensayo plástico. Entre las 07:00 y 07:30 horas, los sujetos descansaron en posición horizontal, y a las 07:30 horas, recolectaron una segunda muestra de saliva (3 mL). A las 08:00 horas, los mismos tomaron un desayuno estandarizado.

Los sujetos llegaron al laboratorio a las 09:00 sin haber realizado ninguna sesión de ejercicio durante el día previo. Los autores encontraron un incremento en la respuesta temporal al cortisol al despertarse (por ciento de variación (% de variación entre las 07:00 y las 07:30 horas) en el grupo no entrenado (42.2-13.9 a 130.0-30.7%, $P < 0.01$) y ninguna reducción significativa en el incremento del cortisol al despertar en siete triatletas (53.8- 13.1 to 56.0-22.0%, $P = ns$), mientras, que dos triatletas, los cuales mostraron una reducción en la respuesta progresiva al cortisol al despertar (151.1-36.4 and 64.4-27.8%, respectivamente), durante un periodo de estudio de 10 meses, desarrollaron el síndrome de sobreentrenamiento.

Sobre la base de estos datos, la respuesta del cortisol al despertar y los niveles de cortisol salivales de media noche y sus valores en la predicción de la pérdida de la adaptación al ejercicio podría representar un marcador biológico sensible para monitorear las condiciones del rendimiento durante los periodos de entrenamiento.

Testosterona salival, DHEA, y ejercicio físico: Testosterona salival y estrés psicofisiológico.

Frecuentemente los investigadores colectan muestras pre-evento 15-30 minutos antes de las competencias. La mayoría de los estudios detectan un incremento anticipado en las concentraciones de testosterona y cortisol.

El incremento de ambas hormonas parece ser de importancia en la preparación de las demandas físicas y mentales, y pueden afectar el rendimiento y de esta manera influir indirectamente sobre el producto final. El aumento pre-evento de la testosterona puede mejorar la función psicomotora y la coordinación puede incrementar la actividad mental. Hasta el presente no se han realizado estudios sobre la asociación entre el incremento de la anticipación en la testosterona y el rendimiento o no se han producido resultados inequívocos.

Kivlighan et al. (2005) encontraron que los niveles de sT no estaban aumentados en la anticipación de una competencia, contrariamente a los estudios previos desarrollados por (Suay et al., 1999; Bateup et al., 2002).

Sin embargo, este autor demostró que los altos niveles de concentración de sT, exactamente antes de la competencia predicen bajos rendimientos más que buenos resultados durante una carrera en el veloergómetro. La principal consideración relacionada con este resultado es que las diferencias inter-

individuales asociadas con la testosterona en la fase de pre-evento parecen estar asociadas al interés en la afiliación social y relacionada con los miembros de los equipos deportivos.

Correlación entre suero y saliva

La Testosterona (T) y la DHEA son otros marcadores de estrés reportados en los atletas cuando las cargas se incrementan en forma progresiva. Algunos investigadores han demostrado una correlación entre los niveles de concentración circulantes de T en muestras de saliva (Granger et al., 2004; Wood, 2009) y DHEA durante la recuperación (Wood, 2009). La correlación de testosterona en particular fue más elevada en los hombres ($r=0.78$) y menor en las mujeres ($r=0.42$) (Wood, 2009). Los niveles de concentración de sT mostraron diferencias en relación con la edad, desarrollo puberal y género (250–600 y 200 pmol/L) y pueden mostrar una rápida fluctuación entre individuos. Estos límites de valores corresponden a una determinación sencilla, y por lo tanto para llegar a conclusiones reales se deben analizar múltiples muestras. Sin embargo, considerando las variaciones rápidas interindividual y el valor limitado de una determinación sencilla de testosterona, Cadore et al. (2008) no encontraron una correlación significativa entre las concentraciones de T libre en muestras de plasma y saliva durante el periodo de recuperación y después de los ejercicios de resistencia ($r=0.22-0.26$, $P \geq 0.05$) en los participantes entrenados y no entrenados.

En los adultos las concentraciones de sDHEA mostraron una buena correlación con las muestras séricas sin diferencia entre sexos ($r=0.82$), y valores disminuidos con el aumento de la edad.

Tipo, duración, intensidad del ejercicio y condiciones de entrenamiento

Las hormonas con propiedades anabólicas o catabólicas, tales como la testosterona y el cortisol respectivamente, muestran cambios cuantitativos, estado de señalización catabólica, en relación con la intensidad y duración de la carga física precedente. Tremblay et al. (2005) encontraron que se necesitan carreras de baja intensidad y larga duración para estimular el incremento de los niveles de testosterona plasmática, aunque la respuesta es transiente. Duclos et al. (1996) observaron que los niveles de testosterona plasmática libre no cambian en respuesta ya sea a 20 o a 120 minutos de carrera a baja intensidad. Esta diferencia en los resultados pudiera estar relacionada con el estado de entrenamiento de los sujetos. Tremblay et al. (2005) indicaron que la duración del ejercicio tiene efecto independiente sobre la respuesta hormonal a los ejercicios de resistencia. A baja intensidad se necesitan carreras de larga duración para estimular el incremento de los niveles de testosterona plasmática.

Dada la correlación entre los niveles séricos y salivales de testosterona, se han desarrollado estudios utilizando determinaciones en muestras de saliva para evaluar la influencia de las diferentes modalidades de ejercicio físico. Lusa Cadore et al. (2009) observaron un incremento moderado en las concentraciones de testosterona salival libre después de un ejercicio de

entrenamiento en fuerza y resistencia, pero no encontraron correlaciones significativas entre las concentraciones de testosterona libre T (sT) en muestras de saliva y plasma, ni durante los ejercicios o recuperación (Cadore et al., 2008). Beaven et al. (2008) examinaron el efecto agudo de cuatro protocolos de diferentes ejercicios de fuerza y resistencia sobre las concentraciones de ST en jugadores de rugby masculino.

Se identificaron grandes diferencias individuales a los cuatro protocolos de ejercicios de fuerza y resistencia con una tendencia al incremento de las concentraciones de sT (11.3 - 19.7%). De forma contraria, cuando se comparó con la recuperación Kraemer et al. (2001) observaron una disminución significativa ($P < 0.05$) en los niveles de sT a las 07.00 horas, durante el desarrollo de una serie de ejercicios agudos de fuerza y resistencia. Posteriormente estos autores demostraron que los ejercicios de fuerza a la resistencia, en hombres entrenados en resistencia, no alteran en forma significativa el patrón de secreción circadiano sobre un periodo de vigilia de 16 horas.

Con relación al entrenamiento, en el estudio de un grupo de jugadores de rugby masculino, sometidos a un régimen idéntico de entrenamiento durante una temporada de competencias, demostró que el periodo de entrenamiento indujo una disminución en los niveles de concentración de sT, especialmente a las 16:00 y a las 18:00 horas ($P < 0.01$) (Elloumi et al., 2008). Estas observaciones coinciden con otros estudios en los cuales se encontró una disminución en las concentraciones plasmáticas de sT después de algunas semanas de un programa de entrenamiento, en relación con el volumen, intensidad, carga de entrenamiento y tipo de deporte (López Calbet et al., 1993; De Souza et al., 1994; Lac et al., 1995; Filaire et al., 2001a; Kraemer et al., 2004; Coutts et al., 2007).

Lac and Berthon (2000) reportaron variaciones en los niveles de concentración de sT y sF y en la relación sT/sF en corredores de larga distancia durante una competencia de relevo y durante tres días posteriores a la competencia. Las muestras de saliva se tomaron durante la mañana de la competencia de la carrera de relevo y durante los tres días posteriores a la competencia. Las muestras de saliva se tomaron durante la mañana de la competencia de relevo, a las 09:00 horas, antes de la competencia a las 10:00 horas, después de cada relevo durante la carrera, y al final de la carrera, y en la mañana entre las 21:00 y las 23:00 horas.

Se tomaron dos muestras, bajo las mismas condiciones, durante los siguientes tres días de vigilia y exactamente antes de acostarse. Se encontró que los niveles de sF alcanzaron aproximadamente 1.5 veces el valor de los niveles basales antes de la carrera. Los niveles de sT durante la carrera disminuyeron de forma gradual y permanecieron bajos hasta por la noche.

Durante los siguientes tres días, los niveles de sT fueron mayores que los niveles observados durante los días de descanso. La relación sT/sF fue baja durante la carrera (asociado normalmente con la tendencia catabólica) y elevada durante los siguientes tres días (asociado con la tendencia altamente anabólica). Elloumi et al. (2008) encontraron una disminución en la relación sT/sF durante una temporada internacional de rugby (-14%, $P < 0.01$) y la variación en la relación estuvo asociada a una disminución en el rendimiento físico. Para evitar cualquier efecto confusor de las variaciones en el ritmo circadiano y la ingesta alimentaria sobre la secreción hormonal, a los jugadores de rugby se les tomaron muestras de saliva durante los siguientes horarios (valores de descanso, 08:00 horas), antes del almuerzo (11:00 horas), 16:00, 18:00 horas, y antes de la comida (20:00 horas). Los jugadores de rugby no entrenaron durante los dos días antes de las tomas de muestras de saliva.

El entrenamiento no afectó los niveles de sF, pero indujo una disminución en los valores de sT durante los periodos de descanso (-15%, $P < 0.05$). Durante el mismo periodo, la respuesta de la sT dependió del tiempo de detención del encuentro. Se encontraron valores elevados cuando la competencia generó niveles significativos de estrés y menores cuando las condiciones psicosociales permanecieron estables. Por el contrario, las competencias durante el mismo periodo indujeron un aumento significativo en los niveles de sF. Sin embargo, la relación se puede considerar como un índice de cansancio, relacionado con el aumento de la carga de entrenamiento, pero además como un ajuste positivo a las facilidades y comportamiento hacia la inminente competencia.

Por otra parte, el mayor problema con la relación T/F se reportó como una limitación de su utilización en el caso de los atletas masculinos. En el caso de las mujeres, el 90 % de la T circulante se deriva del metabolismo de los precursores periféricos, en particular de la DHEA que pueden jugar un rol biológico principal en las mujeres a través de conversión en andrógenos y estrógenos activos. Se ha descrito un incremento en los niveles de DHEA plasmático dependiendo de los niveles de rendimiento deportivo y de la intensidad de los ejercicios (Tremblay et al., 2004).

Por otra parte, Cadore et al. (2008) encontraron una correlación significativa entre las concentraciones salivales y séricas de DHEA (sDHEA) antes ($P < 0.001$) y después ($P \leq 0.001$) de los ejercicios de resistencia en hombres entrenados y no entrenados.

Un tope estimulado de balonmano no indujo cambios significativos en las concentraciones de T y de sDHEA en mujeres jugadoras de balonmano (Filaire & Lac, 2000). Sin embargo, se observó una correlación positiva en sT y en sDHEA durante todos los momentos estudiados [las muestras de saliva se tomaron a las jugadoras de balonmano durante la vigilia (valores de reposo) (08:00 horas), 5 min antes y después de un tope simulado de (18:00 horas; 20:00 horas), y por la mañana al levantarse (08:00 horas)].

Las concentraciones más bajas de testosterona en las mujeres, en particular en las muestras de saliva, sugieren que las mediciones de las concentraciones de DHEA pudieran servir como un sustituto para las mediciones de testosterona para el estudio de la respuesta al entrenamiento en atletas elites femeninas. En un programa de entrenamiento en mujeres sedentarias desarrollado por Filaire et al. (1998), encontraron que 16 semanas de entrenamiento incrementan la relación sDHEA/sF en reposo en las mujeres atletas en un 430% con respecto a la primera semana de entrenamiento y una disminución de la relación sDHEA/sF (16 semanas contra vs la primera semana de entrenamiento; $P \leq 0.01$).

A los sujetos se les tomaron muestras de saliva durante la primera semana y a las 16 semanas sin estimulación escupiendo directamente en un tubo de ensayo plástico durante el tiempo de vigilia (08:00 hours) después de un ayuno de toda la noche. Se encontró una correlación lineal positiva entre la carga de entrenamiento y las concentraciones de sF tanto durante la primera ($r=0.55$, $P < 0.001$) semana como en la semana 16 de entrenamiento ($r=0.33$, $P < 0.01$). De forma contraria, se observó una relación lineal negativa entre la cantidad de entrenamiento y las concentraciones de DHEA durante la primera semana ($r=0.38$, $P \leq 0.01$) y entre la relación sDHEA/sF tanto durante la primera semana ($r=0.53$, $P \leq 0.001$) como durante la semana 16 ($r=-0.73$, $P < 0.001$).

Sin embargo, la cantidad de entrenamiento (de la cual depende el nivel de rendimiento deportivo) influye sobre la relación sDHEA/sF, lo cual se pudiera utilizar como un indicador del estado de entrenamiento.

CONCLUSIONES

Se han realizados pocas investigaciones relacionadas con la determinación de la concentración de hormonas peptídicas en muestras de saliva (Antonelli et al., 2007). Sin embargo, el ejercicio es un prototipo de estresor físico que induce no solamente cambios hormonales, sino también bioquímicos (lactato), e inmunológicos (sIgA) (Ohkuwa et al., 1995; Kimura et al., 2008).

Se han estudiado las relaciones inmunológicas con el ejercicio y se han investigado las concentraciones de sIgA y citoquinas (IL-6) en la matriz salival. Se ha desarrollado un estudio relacionado con el ejercicio enfanzando la utilización de la saliva para estos fines y algunas autoridades científicas han recomendado hacer una investigación profunda sobre este tema (Minetto et al., 2005, 2007a; Robson-Ansley et al., 2007; Cox et al., 2008; Bishop & Gleeson, 2009).

En conclusión, la determinación de la concentración de hormonas en muestras de saliva tiene marcadas ventajas con relación a otros fluidos biológicos (suero, orina). El procedimiento de recolección de las muestras es muy simple, completamente no invasivo, libre de estrés, se puede aplicar en una amplia variedad campos y muy particular en los estudios relacionados con el deporte y el ejercicio, así como en el control biomédico del entrenamiento deportivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allgrove JE, Gomes E, Hough J, Gleeson M. Effects of exercise intensity on salivary antimicrobial proteins and markers of stress in active men. *J Sports Sci* 2008; 26: 653–661.

Antonelli G, Cappellin E, Gatti R, Chiappin S, Spinella P, De Palo EF. Measurement of free IGF-I saliva levels: perspectives in the detection of GH/IGF axis in athletes. *Clin Biochem* 2007; 40: 545–550.

Antonelli G, Gatti R, Prearo M, De Palo EF. Salivary free insulin-like growth factor-I levels: effects of an acute physical exercise in athletes. *J Endocrinol Invest* 2009; 32: 1–5.

Aydin S, Halifeoglu I, Ozercan IH, Erman F, Kilic N, Aydin S, Ilhan N, Ilhan N, Ozkan Y, Akpolat N, Sert L, Caylak E. A comparison of leptin and ghrelin levels in plasma and saliva of young healthy subjects. *Peptides* 2005;26: 647–652.

Banfi G, Dolci A. Preanalytical phase of sport biochemistry and haematology. *J Sports Med Phys Fitness* 2003; 43:223–230.

Bateup HS, Booth A, Shirtcliff EA, Granger DA. Testosterone, cortisol, and women's competition. *Evol Hum Behav* 2002; 23: 181–192.

Beaven CM, Gill ND, Cook CJ. Salivary testosterone and cortisol responses in professional rugby players after four resistance exercise protocols. *J Strength Cond Res* 2008; 22: 426–432.

Bishop NC, Blannin AK, Armstrong E, Rickman M, Gleeson M. Carbohydrate and fluid intake affect the saliva flow rate and IgA response to cycling. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32:2046–2051.

Bishop NC, Gleeson M. Acute and chronic effects of exercise on markers of mucosal immunity. *Front Biosci* 2009; 14: 4444–4456.

Blom T, Ojanotko-Harri A, Laine M, Huhtaniemi I. Metabolism of progesterone and testosterone in human parotid and submandibular salivary glands in vitro. *J Steroid Biochem* 1993; 44: 69–76.

Bouget M, Rouveix M, Michaux O, Pequignot JM, Filaire E. Relationships among training stress, mood and dehydroepiandrosterone sulphate/cortisol ratio in female cyclists. *J Sports Sci* 2006; 24: 1297–1302.

Broadbent JL. Salivary testosterone: is it an indicator of free testosterone concentration in plasma? *NZJ Med Lab Sci* 2002; 56: 85–89.

Busch L, Sterin-Borda L, Borda E. Differences in the regulatory mechanism of amylase release by rat parotid and submandibular glands. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 717–722.

Cadore E, Lhullier F, Brentano M, Silva E, Ambrosini M, Spinelli R, Silva R, Krue L. Correlations between serum and salivary hormonal concentrations in response to resistance exercise. *J Sports Sci* 2008; 26: 1067–1072.

Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 2007;383: 30–40.

Chicharro JL, Lucía A, Pérez M, Vaquero AF, Ureña R. Saliva composition and exercise. *Sports Med* 1998; 26: 17–27.

Coutts A, Reaburn P, Piva TJ, Murphy A. Changes in selected biochemical, muscular strength, power, and endurance measures during deliberate overreaching and tapering in rugby league players. *Int J Sports Med* 2007;28: 116–124.

Cox AJ, Pyne DB, Gleson M, Callister R. Resting plasma and salivary IL-6 concentrations are not correlated in distance runners. *Eur J Appl Physiol* 2008; 103: 477–479.

Crewther B, Cronin J, Keogh J, Cook C. The salivary testosterone and cortisol response to three loading schemes. *J Strength Cond Res* 2008; 22: 250–255.

Crewther BT, Lowe T, Weatherby RP, Gill N, Keogh J. Neuromuscular performance of elite rugby union players and relationships with salivary hormones. *J Strength Cond Res* 2009;23: 2046–2053.

De Souza MJ, Arce JC, Pescatello LS, Scherzer HS, Luciano AA. Gonadal hormones and serum quality in male runners: a volume threshold effect of endurance training. *Int J Sports Med* 1994; 7: 383–391.

del Corral P, Mahon AD, Duncan GE, Howe CA, Craig BW. The effect of exercise on serum and salivary cortisol in male children. *Med Sci Sports Exerc* 1994; 26: 1297–1301.

De Palo EF, Antonelli G, Benetazzo A, Prearo M, Gatti R. Human saliva cortisone and cortisol simultaneous analysis using reverse phase HPLC technique. *Clin Chim Acta* 2009; 405:60–65.

Di Luigi L, Baldari C, Gallotta MC, Perroni F, Romanelli F, Lenzi A, Guidetti L. Salivary steroids at rest and after a training load in young male athletes: relationship with chronological age and pubertal development. *Int J Sports Med* 2006a; 27: 709–717.

Di Luigi L, Baldari C, Sgro` P, Emerenziani GP, Gallotta MC, Bianchini S, Romanelli F, Pigozzi F, Lenzi A, Guidetti L. The type 5 phosphodiesterase inhibitor tadalafil influences salivary cortisol, testosterone, and dehydroepiandrosterone sulphate responses to maximal exercise in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3510–3514.

Di Luigi L, Guidetti L, Baldari C, Gallotta MC, Sgro` P, Perroni F, Romanelli F, Lenzi A. Cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate and dehydroepiandrosterone sulphate/ cortisol ratio responses to physical stress in males are influenced by pubertal development. *J Endocrinol Invest* 2006b: 29: 796–804.

Dimitriou L, Sharp NC, Doherty M. Circadian effects on the acute responses of salivary cortisol and IgA in well trained swimmers. *Br J Sports Med* 2002: 36: 260–264.

Doan BK, Newton RU, Kraemer WJ, Kwon YH, Scheet TP. Salivary cortisol, testosterone, and T/C ratio responses during a 36-hole golf competition. *Int J Sports Med* 2007: 28: 470–479.

Duclos M, Corcuff JB, Rashedi M, Fougere V, Manier G. Does functional alteration of the gonadotropic axis occur in endurance trained athletes during and after exercise? A preliminary study. *Eur J Appl Physiol* 1996: 73: 427–433.

Elloumi M, Maso F, Michaux O, Robert A, Lac G. Behaviour of saliva cortisol [C], testosterone [T] and the T/C ratio during a rugby match and during the post-competition recovery days. *Eur J Appl Physiol* 2003: 90: 23–28.

Elloumi M, Ben Ounis O, Tabka Z, Van Praagh E, Michaux O, Lac G. Psychoendocrine and physical performance responses in male Tunisian rugby players during an international competitive season. *Aggress Behav* 2008: 34: 623–632.

Engels HJ, Fahlman MM, Wirth JC. Effects of ginseng on secretory IgA, performance, and recovery from interval exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2003: 35: 690–696.

Fahlman MM, Engels HJ, Morgan AL, Kolokouri I. Mucosal IgA response to repeated wingate tests in females. *Int J Sports Med* 2001: 22: 127–131. Erratum in: *Int J Sports Med* 2001:22: 284.

Fekete Z, Korec R, Feketeova E, Murty VL, Piotrowski J, Slomiany A, Slomiany BL. Salivary and plasma insulin levels in man. *Biochem Mol Biol Int* 1993: 30: 623–629.

Filaire E, Duche´ P, Lac G. Effects of amount of training on the saliva concentrations of cortisol, dehydroepiandrosterone and on the dehydroepiandrosterone: cortisol concentration ratio in women over 16 weeks of training. *Eur J Appl Physiol* 1998: 78: 466–471.

Filaire E, Le Scanff C, Duche´ P, Lac G. The relationship between salivary adrenocortical hormones changes and personality in elite female athletes during handball and volleyball competition. *Res Q Exerc Sport* 1999:70: 297–302.

Filaire E, Lac G. Dehydroepiandrosterone (DHEA) rather than testosterone shows saliva androgen responses to exercise in elite female handball players. *Int J Sports Med* 2000; 21: 17–20.

Filaire E, Bernain X, Sagnol M, Lac G. Preliminary results on mood state, salivary testosterone: cortisol ratio and team performance in a professional soccer team. *Eur J Appl Physiol* 2001a;86: 179–184.

Filaire E, Sagnol M, Ferrand C, Maso F, Lac G. Psychophysiological stress in judo athletes during competitions. *J Sport Med Phys Fit* 2001b; 41:263–268.

Filaire E, Filaire M, Le Scanff C. Salivary cortisol, heart rate and blood lactate during a qualifying trial and an official race in motorcycling competition. *J Sport Med Phys Fit* 2007; 47: 413–417.

Filaire E, Alix D, Ferrand C, Verger M. Psychophysiological stress in tennis players during the first single match of a tournament. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34: 150–157.

Garde AH, Hansen AM. Long-term stability of salivary cortisol. *Scand J Clin Lab Invest* 2005; 65: 433–436.

Gotovtseva LP, Korot'ko GF. Salivary thyroid hormones in evaluation of the functional state of the hypophyseal–thyroid system. *Klin Lab Diagn* 2002;7: 9–11.

Gouarné C, Groussard C, Gratas-Delamarche A, Delamarche P, Duclos M. Overnight urinary cortisol and cortisone add new insights into adaptation to training. *Med Sci Sports Exerc* 2005; 37: 1157–1167.

Granger DA, Shirtcliff EA, Booth A, Kivlighan KT, Schwartz EB. The “trouble” with salivary testosterone. *Psychoneuroendocrinology* 2004; 29:1229–1240.

Gröschl M, Rauh M, Wagner R, Neuhuber W, Metzler M, Tamgüney G, Zenk J, Schoof E, Dörr HG, Blum WF, Rascher W, Dörr J. Identification of leptin in human saliva. *J Clin Endocr Metab* 2001; 86:5234–5239.

Gröschl M, Wagner R, Rauh M, Dörr HG. Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. *Steroids* 2001a; 66: 737–741.

Gröschl M, Topf HG, Bohlender J, Zenk J, Klussmann S, Dörr J, Rascher W, Rauh M. Identification of ghrelin in human saliva: production by the salivary glands and potential role in proliferation of oral keratinocytes. *Clin Chem* 2005; 51: 997–1006.

Gröschl M. Current status of salivary hormone analysis. *Clin Chem* 2008; 54:1759–1769.

Gröschl M. The physiological role of hormones in saliva. *Bioassays* 2009; 3:1–10.

Haneishi K, Fry AC, Moore CA, Schilling BK, Li Y, Fry MD. Cortisol and stress responses during a game and practice in female collegiate soccer players. *J Strength Cond Res* 2007; 21:583–588.

Hanton S, Thomas O, Maynard I. Competitive anxiety responses in the week leading up to competition: the role of intensity, direction and frequency dimensions. *Psychol Sport Exerc* 2004; 5: 169–181.

Horswill CA, Stofan JR, Horn MK, Eddy DE, Murray R. Effect of exercise and fluid consumption on salivary flow and pH. *Int J Sports Med* 2006; 27:500–504.

Jacks DE, Sowash J, Anning J, McGloughlin T, Andres F. Effect of exercise at three exercise intensities on salivary cortisol. *J Strength Cond Res* 2002; 16: 286–289.

Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva – a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13:197–212.

Kennedy B, Dillon E, Mills PJ, Ziegler MG. Catecholamines in human saliva. *Life Sci* 2001; 69: 87–99.

Kerr M, Lee A, Wang PL, Purushotham KR, Chegini N, Yamamoto H, Humphreys-Beher MG. Detection of insulin and insulin-like growth factors I and II in saliva and potential synthesis in the salivary glands of mice. Effects of type 1 diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 1995; 49:1521–1531.

Kimura F, Aizawa K, Tanabe K, Shimizu K, Kon M, Lee H, Akimoto T, Akama T, Kono I. A rat model of saliva secretory immunoglobulin: a suppression caused by intense exercise. *Scand J Med Sci Sports* 2008; 18:367–372.

Kivlighan KT, Granger DA, Booth A. Gender differences in testosterone and cortisol response to competition. *Psychoneuroendocrinology* 2005; 30:58–71.

Kraemer WJ, Loebel CC, Volek JS, Ratamess NA, Newton RU, Wickham RB, Gotshalk LA, Duncan ND, Mazzetti SA, Gómez AL, Rubin MR, Nindl BC, Häkkinen K. The effect of heavy resistance exercise on the circadian rhythm of salivary testosterone in men. *Eur J Appl Physiol* 2001; 84: 13–18.

Kraemer WJ, French DN, Paxton NJ, Häkkinen K, Volek JS, Sebastianelli WJ, Putukian M, Newton RU, Rubin MR, Gómez AL, Vescovi JD, Ratamess NA, Fleck SJ, Lynch JM, Knuttgen HG. Changes in exercise performance and hormonal concentrations over a big ten soccer season in starters and non starters. *J Strength Cond Res* 2004; 18:121–128.

Kraemer WJ, Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med* 2005;35: 339–361.

Lac G, Passelergue P, Robert A, Rouillon JD, Sesboüé B. Influence du type de pratique sportive sur les taux de testosterone. *Sci Sports* 1995; 10:157–158.

Lac G, Marquet P, Chassain AP, Galen FX. Dexamethasone in resting and exercising men: effects on adrenocortical hormones. *J Appl Physiol* 1999; 87: 183–188.

Lac G, Berthon P. Changes in cortisol and testosterone levels and T/C ratio during an endurance competition and recovery. *J Sport Med Phys Fit* 2000;40: 139–144.

Lewis JG. Steroid analysis in saliva: an overview. *Clin Biochem Rev* 2006; 27:139–146.

Ljungberg G, Ericson T, Ekblom B, Birkhed D. Saliva and marathon running. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7: 214–219.

Lindell SG, Suomi SJ, Shoaf S, Linnoila M, Higley JD. Salivary prolactin as a marker for central serotonin turnover. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 568–572.

Lippi G, De Vita F, Salvagno GL, Gelati M, Montagnana M, Guidi GC. Measurement of morning saliva cortisol in athletes. *Clin Biochem* 2009; 42: 904–906.

López Calbet JA, Navarro MA, Barbany JR, Garcia Manso J, Bonnin MR, Valero J. Salivary steroid changes and physical performance in highly trained cyclists. *Int J Sports Med* 1993; 14:111–117.

Lusa Cadore E, Lhullier FL, Arias Brentano M, Marczwski Da Silva E, Bueno Ambrosini M, Spinelli R, Ferrari Silva R, Martins Krueh LF. Salivary hormonal responses to resistance exercise in trained and untrained middle-aged men. *J Sport Med Phys Fit* 2009; 49: 301–307.

McGuigan MR, Egan AD, Foster C. Salivary cortisol responses and perceived exertion during high intensity and low intensity bouts of resistance exercise. *J Sports Sci Med* 2004; 3:8–15.

Minetto M, Rainoldi A, Gazzoni M, Terzolo M, Borrione P, Termine A, Saba L, Dovio A, Angeli A, Paccotti P. Differential responses of serum and salivary interleukin-6 to acute strenuous exercise. *Eur J Appl Physiol* 2005; 93: 679–686.

Minetto MA, Paccotti P, Borrione P, Massazza G, Ventura M, Termine A, Di Luigi L, Pigozzi F, Angeli A. Effects of the training status on the hormonal response and recovery from highintensity isokinetic exercise: comparisons between endurancetrained athletes and sedentary subjects. *J Sport Med Phys Fit* 2006; 46:494–500.

Minetto MA, Gazzoni M, Lanfranco F, Baldi M, Saba L, Pedrola R, Komi PV, Rainoldi A. Influence of the sample collection method on salivary interleukin-6 levels in resting and post-exercise conditions. *Eur J Appl Physiol* 2007a;101: 249–256.

Minetto MA, Lanfranco F, Baldi M, Termine A, Kuipers H, Ghigo E, Rainoldi A. Corticotroph axis sensitivity after exercise: comparison between elite athletes and sedentary subjects. *J Endocrinol Invest* 2007b: 30:215–223.

Minetto MA, Lanfranco F, Tibaudi A, Baldi M, Termine A, Ghigo E. Changes in awakening cortisol response and midnight salivary cortisol are sensitive markers of strenuous training-induced fatigue. *J Endocrinol Invest* 2008: 31: 16–24.

Moreira A, Arsati F, de Oliveira Lima Arsati YB, da Silva DA, de Araújo VC. Salivary cortisol in top-level professional soccer players. *Eur J Appl Physiol* 2009: 106: 25–30.

Morineau G, Boudi A, Barka A, Gourmelen M, Degeilh F, Hardy N, al-Halnak A, Soliman H, Gosling JP, Julien R, Brerault JL, Boudou P, Aubert P, Villette JM, Pruna A, Galons H, Fiet J. Radioimmunoassay of cortisone in serum, urine, and saliva to assess the status of the cortisol–cortisone shuttle. *Clin Chem* 1997: 43: 1397–1407. Erratum in: *Clin Chem* 1997: 43:2004.

Neary JP, Malbon L, McKenzie DC. Relationship between serum, saliva and urinary cortisol and its implication during recovery from training. *J Sci Med Sport* 2002: 5:108–114.

Nieuw Amerongen AV, Ligtenberg AJ, Veerman EC. Implications for diagnostics in the biochemistry and physiology of saliva. *Ann N Y Acad Sci* 2007: 1098: 1–6.

Ohkuwa T, Itoh H, Yamazaki Y, Sato Y. Salivary and blood lactate after supramaximal exercise in sprinters and long-distance runners. *Scand J Med Sci Sports* 1995: 5: 285–290.

Paccotti P, Minetto M, Terzolo M, Ventura M, Ganzit GP, Borrione P, Termine A, Angeli A. Effects of highintensity isokinetic exercise on salivary cortisol in athletes with different training schedules: relationships to serum cortisol and lactate. *Int J Sports Med* 2005: 26: 747–755.

Port K. Serum and saliva cortisol responses and blood lactate accumulation during incremental exercise testing. *Int J Sports Med* 1991:12: 490–494.

Putz Z, Vanuga A, Veleminsky J. Radioimmunoassay of thyroxine in saliva. *Exp Clin Endocrinol* 1985: 85:199–203.

Rantonen PJ, Penttilä I, Meurman JH, Savolainen K, Närvänen S, Helenius T. Growth hormone and cortisol in serum and saliva. *Acta Odontol Scand* 2000:58: 299–303.

Rimmele U, Zellweger BC, Marti B, Seiler R, Mohiyeddini C, Ehlert U, Heinrichs M. Trained men show lower cortisol, heart rate and psychological responses to psychosocial stress compared with untrained men. *Psychoneuroendocrinology* 2007: 32: 627–635.

Robson-Ansley PJ, Blannin A, Gleeson M. Elevated plasma interleukin-6 levels in trained male triathletes following an acute period of intense interval training. *Eur J Appl Physiol* 2007; 99:353–356.

Roömsing S, Bökman F, Bergqvist Y. Determination of melatonin in saliva using automated solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Scand J Clin Lab Inv* 2006; 66: 181–190.

Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 1114–1135.

Shimojo M, Ricketts ML, Petrelli MD, Moradi P, Johnson GD, Bradwell AR, Hewison M, Howie AJ, Stewart PM. Immunodetection of 11 betahydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human mineralocorticoid target tissues: evidence for nuclear location. *Endocrinology* 1997; 138: 1305–1311.

Suay F, Salvador A, González-Bono E, Sanchis C, Martínez M, Martínez-Sanchis S. Effects of competition and its outcome on serum testosterone, cortisol and prolactin. *Psychoneuroendocrinology* 1999; 24: 551–566.

Swinkels LM, van Hoof HJ, Ross HA, Smals AG, Benraad TJ. Low ratio of androstenedione to testosterone in plasma and saliva of hirsute women. *Clin Chem* 1992; 38: 12819–12823.

Thatcher J, Thatcher R, Dorling D. Gender differences in the precompetition temporal patterning of anxiety and hormonal responses. *J Sport Med Phys Fit* 2004; 44: 300–308.

Thomas NE, Leyshon A, Hughes MG, Davies B, Graham M, Baker JS. The effect of anaerobic exercise on salivary cortisol, testosterone and immunoglobulin (A) in boys aged 15–16 years. *Eur J Appl Physiol* 2009; 107: 455–461.

Thuma JR, Gilders R, Verdun M, Loucks AB. Circadian rhythm of cortisol confounds cortisol responses to exercise implications for future research. *J Appl Physiol* 1995; 78:1657–1664.

Tremblay MS, Copeland JL, Van Helder W. Effect of training status and exercise mode on endogenous steroid hormones in men. *J Appl Physiol* 2004; 96: 531–539.

Tremblay MS, Copeland JL, Van Helder W. Influence of exercise duration on post-exercise steroid hormone responses in trained males. *Eur J Appl Physiol* 2005; 94: 505–513.

Tsai ML, Ko MH, Chang CK, Chou KM, Fang SH. Impact of intense training and rapid weight changes on salivary parameters in elite taekwondo athletes. *Scand J Med Sci Sports* 2010, doi: 10.1111/j.1600-0838.2010.01099.x.

Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, Ho KY. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* 1983a: 20: 329–335.

Vining RF, McGinley RA, Symons RG. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem* 1983b: 29:1752–1756.

Walsh NP, Montague JC, Callow N, Rowlands AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. *Arch Oral Biol* 2004: 49: 149–154.

Wood P. Salivary steroid assays –research or routine? *Ann Clin Biochem* 2009: 46: 183–196.