

Variações na Força Muscular de Membros Superior e Inferior nas Diferentes Fases do Ciclo Menstrual

Variations in Strength Muscle for Upper and Lower Body in the Different Phases of the Menstrual

SIMÃO, R.; MAIOR, A. S.; NUNES, A. P. L.; MONTEIRO, L.; CHAVES, C. P. G. Variações na Força Muscular de Membros Superior e Inferior nas Diferentes Fases do Ciclo Menstrual. *R. bras. Ci e Mov.* 2007; 15(3): 47-52.

RESUMO: Alguns componentes da aptidão física são marcadamente influenciados pelas fases do ciclo menstrual (CM). Portanto o objetivo foi verificar se existem diferenças nos níveis de força muscular dos membros superiores e inferiores em 19 mulheres eumenorréicas treinadas (26 ± 5 anos; $61,1 \pm 6,1$ kg; $165,3 \pm 5,6$ cm), durante as diferentes fases do CM. A força foi avaliada pelo teste de 8RM, sendo um exercício para membro superior e outro para o membro inferior. Cada voluntária realizou seus testes em um único mês respeitando as fases dos seus respectivos CM. Foram aplicados quatro testes: no 1º dia da menstruação; na fase proliferativa; na fase ovulatória e na fase secretória. Para verificar as diferenças na carga em relação aos dias dos testes, foi realizada uma ANOVA de uma entrada com medidas repetidas para cada exercício. As variáveis que se mostraram significativas foram analisadas pelo teste post hoc de Tukey, considerando como nível de significância $p < 0,05$. Os resultados apresentaram no exercício leg press 45° diferenças da 1ª fase para as demais fases do CM. Já a puxada no pulley não apresentou diferença em nenhuma das fases avaliadas. A amostra estudada sugere a influência do CM sobre a capacidade de produzir força em membros inferiores.

Palavras-chave: Aptidão física, exercício, treinamento de força, desempenho, exercícios resistidos.

SIMÃO, R.; MAIOR, A. S.; NUNES, A. P. L.; MONTEIRO, L.; CHAVES, C. P. G. Variations in Strength Muscle for Upper and Lower Body in the Different Phases of the Menstrual Cycle. *R. bras. Ci e Mov.* 2007; 15(3): 47-52.

Abstract: Some components of the physical fitness are influenced remarkably by the phases of the menstrual cycle (CM). Therefore the objective was to verify if differences exist in the levels of strength muscle of the upper and lower body in 19 women trained (26 ± 5 years; $61,1 \pm 6,1$ kg; $165,3 \pm 5,6$ cm), during the different phases of the CM. The strength was evaluated by the test of 8RM, being an exercise for upper and lower body. Each volunteer accomplished their tests in a single month respecting the phases of their respective CM. Were applied four tests: in the 1st day of the period; in the phase proliferate; in the phase ovulation and in the secretors phase. To verify the differences in the load in relation to the days of the tests, an ANOVA of an entrance was accomplished with repeated measures for each exercise. The variables that were shown significant they were analyzed by the test post hoc of Tukey, considering as significance level $p < 0,05$. The results already presented in the exercise leg press 45° differences of the 1st phase for the other phases of the CM. However do lat pull down didn't present difference in none of the appraised phases. The studied sample suggests the influence of the CM on the capacity to produce force in inferior members.

Keywords: Physical fitness, exercise, strength training, performance, resistive exercise.

Roberto Simão¹

Alex Souto Maior^{2,3}

Ana Paula Lopes Nunes²

Luciana Monteiro²

Christianne Pereira Giesbrecht Chaves^{2,4,5}

¹ Escola de Educação Física e Desporto – Universidade Federal do Rio de Janeiro (EEFD/UFRJ)

² Universidade Gama Filho (CEPAC).

³ Programa de Bioengenharia – Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

⁴ Centro Universitário Metodista Bennett – UNIBENNETT, RJ.

⁵ Centro Universitário Plínio Leite – UNIPLI, Niterói, RJ.

Recebimento: 12/2006

Aceite: 04/2007

Introdução

O ciclo menstrual (CM) consiste de muitas alterações ocorrentes no útero, ovários, vagina, mamas e na secreção de hormônios gonadotrópicos pela adeno-hipófise. A duração de um ciclo regular é em média de 28 dias. Ele pode ser mais curto, de apenas 20 dias, ou, mais longo, de até 45 dias^{9,19}. A duração do ciclo varia entre mulheres ou numa mesma mulher. O CM é dividido em 3 fases distintas: fase menstrual, fase proliferativa ou folicular e fase lútea ou secretória. Outros autores, Vander et al.¹⁹, consideram apenas a fase folicular e lútea, inserindo a fase ovulatória como uma etapa tardia dentro da fase proliferativa. Não há um consenso entre os autores estudados acerca do início de cada fase.

A fase menstrual inicia-se no 1º dia da menstruação até o 5º dia. Caracteriza-se por uma redução súbita nos níveis de progesterona e estrógeno. A fase proliferativa dura do 6º até o 13º dia após a menstruação. Nesta fase aumenta a secreção de estrógeno até o seu nível mais elevado. Seguindo a fase proliferativa nas mulheres que apresentam um ciclo sexual normal de 28 dias; ocorre a ovulação no 14º dia^{9,19}. Segundo Guyton et al.⁹, aproximadamente dois dias antes da ovulação, por motivos ainda não inteiramente esclarecidos, a secreção de LH pela hipófise anterior aumenta acentuadamente elevando-se entre seis e 10 vezes, atingindo seu nível máximo cerca de 16 horas antes da ovulação. Em seguida, vem a fase lútea ou secretória que vai do 15º ao 28º dia após a menstruação. É quando são secretadas grandes quantidades de progesterona e estrógeno, mas principalmente progesterona^{9,19}. Nos últimos dias do CM, o corpo lúteo degenera-se e os níveis progesterona e estrógeno caem, provocando o início do fluxo menstrual e um novo ciclo se repete¹⁹.

Em um estudo de revisão, Janse de Jonge¹² demonstrou não haver diferenças significativas no consumo de oxigênio, limiar de lactato, volume plasmático, concentração de hemoglobina e ventilação, nas três fases do CM. Embora tenha sido reportado, um aumento do estresse cardiovascular durante o exercício moderado na fase lútea. Enquanto o impacto das diferentes fases do CM nas respostas ventilatórias, metabólicas e cardiovasculares durante o exercício estejam sendo foco de discussão na literatura^{4,13,14}, os efeitos sobre a força muscular parecem

estar recebendo pouca atenção. Outros estudos abordam também a influência do CM na flexibilidade decorrentes das alterações hormonais, mas não demonstraram haver variação da flexibilidade ao longo do ciclo^{2,10,15}.

Porém, os estudos relacionados às alterações na força muscular e CM ainda são escassos. Por exemplo, não foi possível identificar um estudo que analisasse o comportamento simultâneo da força de diferentes grupos musculares em relação às fases do CM. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o comportamento da força muscular em um teste de oito repetições máximas (8RM) no membro superior e no membro inferior nas diferentes fases do CM de mulheres eumenorréicas treinadas.

Materiais e Métodos

Sujeitos

A amostra foi composta por 19 mulheres fisicamente ativas com idades variando de 21 a 32 anos (26±5 anos), peso corporal entre 49 e 72,8 kg (61,1±6,1 kg), estatura entre 153 e 175 cm (165,3±5,6 cm), todas possuíam ciclos menstruais regulares (28 a 31 dias) e tinham experiência mínima de três anos no treinamento de força. Esse critério foi adotado a fim de evitar dor muscular tardia ou falha na determinação da carga de trabalho por falta de coordenação necessária à execução dos exercícios. Foram excluídas do estudo mulheres que reportaram histórico de qualquer distúrbio relacionado ao sistema endócrino e/ou CM, uso de suplementos alimentares, substâncias ergogênicas, anticoncepcionais orais e comprometimentos osteomioarticulares que impedissem total ou parcialmente a execução dos exercícios. A amostra foi orientada a não ingerir caféina ou álcool, assim como não realizar qualquer atividade física nos dias dos testes. Todas as voluntárias assinaram o termo de consentimento para a realização do experimento de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Teste de 8RM

O procedimento de aplicação do teste 8RM foi na forma de delineamento alternado para a puxada aberta pela frente no *pulley* alto (PF) e *leg press* 45º (LP). Os exercícios foram selecionados devido à sua disseminação em centros de treinamento e facilidade de execução. Além disso, optou-

se por selecionar exercícios que envolviam diferentes grupamentos musculares, o que permitiu avaliar a influência dos distintos intervalos de recuperação nesses grupamentos. Visando reduzir a margem de erro nos testes de 8RM, foram adotadas as seguintes estratégias: a) instruções padronizadas foram fornecidas antes do teste, de modo que o avaliado estivesse ciente de toda a rotina que envolvia a coleta de dados; b) o avaliado foi instruído sobre a técnica de execução do exercício; c) o avaliador estava atento quanto à posição adotada pelo praticante no momento da medida, pois pequenas variações no posicionamento das articulações envolvidas no movimento poderiam acionar outros músculos, levando a interpretações errôneas dos escores obtidos; d) estímulos verbais foram realizados a fim de manter alto o nível de estimulação; e) os pesos adicionais utilizados no estudo foram previamente aferidos em balança de precisão. Os intervalos entre as tentativas em cada exercício durante o teste de 8RM foram fixados entre dois a cinco minutos¹. Após obtenção da carga em um determinado exercício, intervalos não inferiores há 10 minutos foram dados, antes de passar-se ao teste no exercício seguinte.

Protocolo experimental

O estudo foi realizado em quatro dias, de acordo com o CM. O primeiro dia de teste coincidiu com o 1º dia da fase menstrual. O segundo dia foi realizado na fase folicular entre o 6º e o 10º dia após o início da menstruação. O terceiro dia da coleta ocorreu no 14º após a menstruação (fase ovulatória). A última coleta ocorreu entre o 20º e o 23º após a menstruação (fase secretória).

Em todos os dias do estudo foram realizados os testes de 8RM nos exercícios PF e LP, feitos respectivamente em máquinas específicas (Tecno-gym®, Italy). Antes dos testes, foi verificada a massa corporal da amostra e estatura na balança (Filizola®). Também antes de cada teste de 8RM, as avaliadas eram submetidas a um aquecimento específico em duas séries de 20 repetições com cargas leves determinada aleatoriamente. O teste foi realizado após um minuto de execução do aquecimento específico, sendo o peso inicial do teste selecionado de forma aleatória. O teste de 8RM teve o propósito de obter a carga máxima durante as quatro fases do CM. Quando a avaliada não con-

seguia mais realizar o movimento completo de forma correta, o teste era interrompido. Desse modo, validou-se como carga máxima à carga obtida na última execução correta.

Tratamento estatístico

Para verificar as diferenças na carga em relação aos dias dos testes de 8RM, foi realizada uma ANOVA de uma entrada com medidas repetidas para cada exercício. As variáveis que se mostraram significativas foram analisadas pelo teste *post hoc* de Tukey, considerando como nível de significância $p < 0,05$. Os dados foram analisados no programa Statistica 5.5 (Statsoft, USA).

Resultados

As Figuras 1 e 2 mostram os resultados (média \pm desvio padrão (DP)) das cargas em 8RM ao longo das fases analisadas em ambos os exercícios. Em relação ao exercício PF, não foram verificadas diferenças significativas em nenhuma das fases analisadas ($p > 0,05$) (Figura 1). No entanto ao observarmos o exercício LP, foram verificadas diferenças significativas entre a primeira com as outras três fases ($p < 0,05$) (Figura 2). Já entre as outras fases no LP, não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Figura 1 - Comportamento das cargas (8RM) nas fases analisadas no exercício puxada pela frente no pulley.

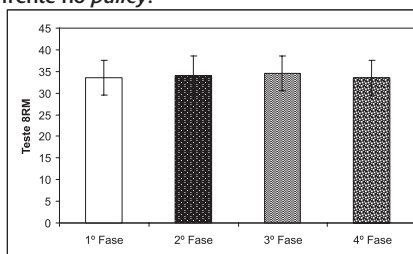
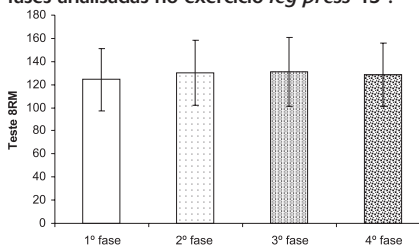


Figura 2 - Comportamento das cargas (8RM) nas fases analisadas no exercício leg press 45°.



† - Diferença significativa entre a 1º e a 2º fase ($p < 0,05$)

§ - Diferença significativa entre a 1º e a 3º fase ($p < 0,05$)

- Diferença significativa entre a 1º e a 4º fase ($p < 0,05$)

Discussão

O presente estudo procurou analisar o comportamento da força em membros superiores e membros inferior durante as diferentes fases do CM. Para realizar esta análise consideraram-se mulheres praticantes no treinamento de força, aparentemente saudáveis do ponto de vista de hormônios sexuais, que diferiam apenas em idade e tempo de treinamento e que não faziam uso de contraceptivos orais. Não houve nenhum relato de complicação ginecológica no período da coleta de dados. Também não houve registro de qualquer intercorrência clínica relevante do sistema locomotor que pudesse ter afetado a realização das medidas no teste de força (8RM).

A literatura reporta que a fisiologia feminina parece ser afetada pelas alterações hormonais cíclicas decorrentes do CM. Alguns autores^{6,16,21} referenciam que tais oscilações endócrinas podem afetar o desempenho na prática de exercícios. No entanto, outros estudos verificaram que as alterações nas concentrações séricas de estrogênio/progesterona não são suficientes para afetar o desempenho físico^{7,10}. Contudo, os sintomas pré-menstruais ou dismenorréia, exercem um efeito negativo no desempenho de algumas mulheres, podendo haver variações individuais⁸.

O desempenho pode variar de acordo com as três fases do CM. Na fase pré-menstrual, devido à influência do aumento nos níveis de progesterona, o desempenho pode sofrer uma redução. Já na fase pós-menstrual, graças à crescente taxa de estrogênio e maior secreção de noradrenalina, observa-se uma melhora significativa no desempenho. Especula-se que tal adaptação possa ser causada pela crescente taxa de estrógeno e ativação do córtex supra-renal, que ocorrem paralelamente provocando maior secreção de noradrenalina. Há também uma participação parassimpática do sistema nervoso central durante o período citado^{9,19}.

Em nosso estudo, os resultados para o exercício LP evidenciaram que na 1ª fase (menstrual), uma redução no desempenho ocorreu quando comparada as demais fases avaliadas. Também vale ressaltar que na 4ª fase (pré-menstrual) houve um decréscimo nas cargas de 8RM quando comparadas a

2ª e 3ª fase, mesmo sem significância entre elas. Os resultados encontrados no LP tendem a corroborar com a literatura, no entanto, na PF não verificamos diferenças significativas em nenhuma das fases, o que discorda da literatura^{9,19}. Este fato pode ser explicado por alguns fatores tais como: adaptação ao teste ao longo das coletas; nível de motivação entre avaliada e avaliador; aumentos nos níveis de força e à quantidade da massa muscular envolvida na execução do movimento. É coerente afirmarmos que no exercício LP as mulheres pareciam ter uma maior motivação no teste do que na PF. Em nossa prática de academia, verificamos que o público feminino possui maior motivação na realização de exercícios para membros inferiores e essa questão pode ter influenciado em nossos resultados.

O estudo encontrado na literatura que mais se aproxima do nosso em termos metodológicos foi o proposto por de Dias et al.⁵, em que verificou o efeito das diferentes fases do CM sobre o desempenho da força em um teste de 10RM. Avaliaram-se oito mulheres treinadas, em uso regular de contraceptivos orais. Os resultados demonstraram que na puxada pela frente no *pulley*, não foram verificadas diferenças significativas na força quando comparadas as três fases do CM. No que diz respeito ao *leg press*, observaram-se variações sem diferenças significativas nas cargas interfases, principalmente entre a primeira e a terceira medida, ou seja, fase folicular e lútea. Em conclusão nesse estudo reporta não haver variações significativas na força muscular máxima durante as distintas fases do CM. Em nosso estudo a PF concordou integralmente com os resultados obtidos por Dias et al.⁵. Já em relação ao LP os resultados foram conflitantes. Vale destacar que em nosso estudo fizemos quatro medidas durante o CM e as mulheres não utilizavam anticoncepcional oral.

Contudo, a questão do desempenho ainda não é consensual. Janse de Jonge et al.¹¹ não encontraram mudanças nas características contráteis do músculo esquelético, medidas através de eletromiografia durante as fases pré e pós-menstrual em mulheres eumenorréicas que não faziam uso de anovulatório. A força isocinética em mulheres que menstruam normalmente também não apresentou diferenças nas fases do CM³. Em contrapartida, Drake et al.⁶, utilizando a ele-

tromiografia e a mecanografia, indicaram que a fadiga é significativamente aumentada durante a ovulação tanto para o grupo que utilizou contraceptivo oral quanto para o grupo controle. Redman e Weatherby¹⁷ verificaram diminuições no desempenho anaeróbico na fase pré-menstrual em um grupo de mulheres que não faziam o uso de contraceptivos orais, enquanto que no grupo que ingeria os esteróides ovarianos não foram observadas alterações no desempenho. Os autores atribuíram seus achados ao controle hormonal advindo dos anticoncepcionais orais. Contrapondo a estes achados, Giacomoni et al.⁸, não observaram oscilações no desempenho anaeróbico ao longo do CM em mulheres que utilizavam ou não anovulatórios.

Hinnerichs et al.¹⁰, não observaram diferenças significativas entre as três fases do CM ao avaliar a força muscular dinâmica e isométrica na extensão e flexão de joelhos, utilizando como instrumento o dinamômetro isocinético da marca *Cybex*[®] em mulheres que faziam ou não o uso de contraceptivos orais. No mesmo estudo referenciado, também não foram verificadas variações na flexibilidade e resistência muscular ao longo do ciclo. Friden et al.⁷, também não detectou variações na força e resistência em voluntárias que possuíam ciclos menstruais normais e não faziam uso de anovulatórios. Sarwar et al.¹⁸ observaram um aumento de força do quadríceps e de preensão manual, aumento da fadiga e diminuição do tempo de descanso em mulheres que não faziam o uso de contraceptivos orais quando comparadas às que faziam o uso do mesmo. Os autores reportam que tais oscilações na força podem ser devido às altas concentrações de estrógeno que antecedem à ovulação.

A falta de consenso pode, em parte, ser devida à falta de controles experimentais adequados e à extensa variação nos tipos de métodos usados para determinar a fase do ciclo menstrual (por exemplo: temperatura corporal vs exames hormonais) e na regulação do tempo de testes (por exemplo, menstruação vs anterior e/ou média, fase folicular vs ovulação vs média e/ou posterior fase lútea durante o ciclo menstrual). Também os critérios de seleção dos requisitos em alguns estudos não foram claramente definidos (em respeito à idade, histórico do ciclo menstrual, condição de aptidão física, grau do CM e problemas ginecológicos) e, por

vezes, a standardização da classificação do pré-exercício, incluindo a ingestão da dieta controlada e o nível das atividades, tem sido limitadas^{2,15,17}.

Dessa forma algumas possibilidades e limitações metodológicas devem ser analisadas em nosso estudo. Uma das principais limitações do estudo é em relação à definição do início e final de cada fase do CM. Caso houvesse uma precisão na determinação do ciclo, seja pela medida dos níveis séricos da razão estrogênio/progesterona na urina²⁰ ou no sangue¹¹ poderia permitir-se uma interpretação mais precisa dos resultados. Além disso, as mulheres não interromperam seus treinamentos de rotina, tão pouco a alimentação foi controlada.

A segunda limitação metodológica diz respeito ao instrumento utilizado para a obtenção das cargas máximas para 8RM, a amostra não foi treinada para a realização dos respectivos testes. A terceira limitação do estudo foi em relação ao tempo da coleta. A nossa coleta foi restrita a um único ciclo; porém, de acordo com a literatura^{9,19}, a duração do ciclo varia entre mulheres ou numa mesma mulher.

Conclusão

Podemos concluir que o desempenho no exercício LP aumentou nas fases intermediárias (2ª e 3ª) em relação à primeira fase. Na quarta fase, por outro lado, a carga mobilizada tendeu a diminuir. Assim, pelo menos na amostra estudada, pode-se sugerir a influência do CM sobre a capacidade de produzir força em membros inferiores. Já para membros superiores, praticamente não houve alterações de carga em nenhuma das fases avaliadas.

Os profissionais envolvidos com o treinamento de força devem estar atentos às queixas de suas alunas quando estas relatam diminuição da força para um treino que vem sendo realizado com frequência, pois a força pode estar sofrendo uma alteração em função da fase do CM que estas alunas se encontram. Contudo, a condução de outros estudos utilizando metodologias similares, amostras maiores e uma definição mais precisa das fases do CM são necessários para comparação e análise mais detalhada da lacuna evidenciada.

Referências

1. Baechle TR, Earle RW. **Essentials of strength training and conditioning**. Champaign: Human Kinetics, 2000.
2. Chaves CPG, Simão R, Araújo CGS. Ausência de variação da flexibilidade durante o ciclo menstrual em universitárias. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. 2002; 8: 212-218.
3. Debrizzio R, Fort IL. Relationships among strength, endurance, weight and body fat during three stages of the menstrual cycle. **Journal Sports Medicine Physical Fitness**. 1991; 31: 89-94.
4. Deon TM, Sharoff C, Chipkin SR, Grow D, Ruby BC, Braun B. Regulation of exercise carbohydrate metabolism by estrogen and progesterone in women. **American Journal Physiological Endocrinology Metabolism**. 2002; 283: 1046-1055.
5. Dias I, Simão R, Novaes J. Efeito das diferentes fases do ciclo menstrual em um teste de 10RM. **Fitness & Performance Journal**. 2005; 4: 288-292.
6. Drake SM, Evetovich, TK, Eschbach C, Webster M, Whitehead, T. The effect of menstrual cycle on electromyography and mecanomyography during fatigue. **Medicine Science Sports Exercise**. 2004; 36: S118-9.
7. Friden C, Hirschberg, AL, Saartok, T. Muscle strength and endurance do not significantly vary across 3 phases of the menstrual cycle in moderately active premenopausal women. **Clinical Journal of Sport Medicine**. 2003; 13: 238-241.
8. Giacomoni M, Bernard T, Gavarry O, Altare S. Influence of the menstrual cycle phase and menstrual symptoms on maximal anaerobic performance. **Physical Fitness and Performance**. 1999; 10: 486-492.
9. Guyton AC, Hall JE. **Fisiologia humana e mecanismo das doenças**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
10. Hinnerichs KR, Conley DS, Evetovich, TK, Engebretsen BJ, Todd JB. Effects of the menstrual and oral contraceptives on muscular strength, endurance, and flexibility. **Medicine Science Sports Exercise**. 2004; 36: S35.
11. Janse de Jonge XAK, Boot CRL, Thom JM, Ruell PA, Thompsom MW. The influence of menstrual cycle phase on skeletal muscle contractile characteristics in humans. **Journal Physiology**. 2001; 530: 161-166.
12. Janse de Jonge XAK. Effects of the menstrual cycle on exercise performance. **Sports Medicine**. 2003; 33: 833-851.
13. Kaygisiz Z, Erkasap N, Soydan M. Cardiorespiratory responses to submaximal incremental exercise are not affected by one night's sleep deprivation during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. **Indian Journal Physiology Pharmacology**. 2003; 47: 279-287.
14. Matsuo H, Katayama K, Ishida K, Muramatsu T, Miyamura M. Effect of menstrual cycle and gender on ventilatory and heart rate responses at the onset of exercise. **European Journal Apply Physiology**. 2003; 90:100-108.
15. Melegario SM, Simão R, Vale RGS, Batista LA, Novaes J. A influência do ciclo menstrual na flexibilidade em praticantes de ginástica de academia. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. 2006. Aceito para publicação.
16. Redman LM, Scroop GC, Norma RJ. Impact of menstrual cycle phase on the exercise status on young, sedentary women. **European Journal Apply Physiology**. 2003; 90: 505-513.
17. Redman LM, Weatherby RP. Measuring performance during the menstrual cycle: a model using oral contraceptives. **Medicine Science Sports Exercise**. 2004; 36: 130-136.
18. Sarwar R, Niclos BB, Rutherford OM. Changes in muscle strength, relaxation rate and fatigability during the human menstrual cycle. **Jornal Physiology**. 1996; 493: 267-272.
19. Vander A, Sherman J, Luciano D. Human physiology. **The Mechanisms of body function**. 8 th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001.
20. Wilcox AJ, Dunson D, Baird DD. The timing of the "fertile window" in the menstrual cycle: day specific estimates from a prospective study. **British Medical Journal**. 2000; 321: 1259-1262.
21. Wojlys EM, Huston LJ, Lindenfeld TN, Hewett TE, Greenfield MLI. Association between the menstrual cycle and anterior cruciate ligament injuries in female athletes. **American Journal Sports Medicine**. 1998; 26: 614-619.