**ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

SANDRA REGINA DE SOUZA

**Efeito do método canguru na redução do estresse crônico em gestantes,
mães e bebês pré-termo através da análise do cortisol e
desidroepiandrosterona em unhas**

**Ribeirão Preto
2017**

SANDRA REGINA DE SOUZA

**Efeito do método canguru na redução do estresse crônico em gestantes,
mães e bebês pré-termo através da análise do cortisol e
desidroepiandrosterona em unhas**

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa
de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública.

Linha de Pesquisa: Assistência à Criança e ao
Adolescente

Orientadora: Profa. Dra. Carmen G. Silvan Scochi

Co-orientadora: Profa. Dra. Fay F. Warnock

**Ribeirão Preto
2017**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Sandra Regina de

Efeito do método canguru na redução do estresse crônico em gestantes, mães e bebês pré-termo através da análise do cortisol e desidroepiandrosterona em unhas/ Souza, Sandra Regina de; Orientadora: Profa. Dra. Carmen G. Silvan Scochi e Co-orientadora: Profa. Dra. Fay F. Warnock, Ribeirão Preto, 2017.

213 p.: il.; 30 cm

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Enfermagem Saúde Pública, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

1. Estresse psicológico. 2. Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. 3. Cortisol. 4. Mães. 5. Prematuro. 6. Método Canguru. 7. Unhas. 8. DHEA. 9. Gestantes

Souza, Sandra Regina de

Efeito do método canguru na redução do estresse crônico em gestantes, mães e bebês pré-termo através da análise do cortisol e desidroepiandrosterona em unhas.

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa
de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública.

Aprovada em: ____/____/____

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Esta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES-DS PROEX (Dezembro/2013 a Setembro/2015 e Julho/2016 a Setembro/2016), Bolsa CAPES Doutorado exterior (Outubro/2015 a Junho/2016, processo nº 99999.003693/2015-05) e Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Ensino do Estado de São Paulo – FAPESP (Outubro/2015 a Outubro/2016, processo nº 2015/041710).

DEDICATÓRIAS

✚ *À Deus, que é o Senhor da minha vida.*

✚ *À minha família com quem sempre pude contar em todos os momentos da minha vida, em especial, durante o percurso para realização desse sonho: ao meu pai José Gomes, minha mãe Lúcia, minha irmã Juliana, meu cunhado Jean Carlos, meu irmão Carlos, meus sobrinhos William, Carlos Henrique, Michelle, Marjorie, Nicholas, Aline, Ryan, Giovana, Simone e Natália.*

✚ *Às enfermeiras doutoras as quais me inspiraram e inspiram: Adriana Leite, Ana Kelve Damasceno, Antonieta Keiko Shimo, Carmen G.S. Scochi, Fay F. Warnock, Giselle Dupas, Ianê Nogueira Vale, Luciana Mara Monti, Margarete Miles, Maria Magda G. Balieiro, Mavilde Pedreira, Monika Wernet, Sonia Barros e Thaila Castral.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

✚ *À Deus por ter me ajudado em todas as etapas da minha vida e pela realização deste sonho.*

✚ *À minha família maravilhosa, pelo amor e apoio incondicional.*

✚ *À minhas fantásticas orientadoras Carmen Scochi e Fay Warnock, por acreditaram no meu trabalho, apostaram nele e me nortearam em todos os momentos deste estudo. Elas que, apesar das dificuldades enfrentadas, fizeram-me enxergar o “caminho” nos momentos de “cegueira intelectual” e guiaram-me até a concretização deste sonho. Sou imensamente grata.*

AGRADECIMENTOS

- *Aos queridos amigos, apaixonados pelo método canguru: Prof. Sergio Marba e Profa. Geisy Lima que foram fundamentais para realização dessa pesquisa.*
- *Aos auxiliares de pesquisa e amigos sem os quais essa pesquisa não seria possível: Elisângela Bomfim, Fabiana Couto, Jean Carlos Teixeira, Juliana Souza Teixeira, Ladjane, Lucy Chiori, Marina Sayuri e Nelma Cabral Calazans.*
- *Aos diretores do serviço de neonatologia dos hospitais campo de pesquisa Dra. Dulce, Profa. Geisy Lima e Dra. Monica Barthelson e as coordenadoras de enfermagem Erli, Lídia e Sandra Figueiredo pelo imprescindível apoio.*
- *Aos funcionários da unidade de neonatologia do IMIP, HES e Maternidade de Campinas pelo carinho e disponibilidade em me auxiliar durante a coleta de dados.*
- *A todas as mães e bebês internados na UTIN que, mesmo diante de suas dores, foram tão afetuosos e colaboraram com a construção do conhecimento científico.*
- *A todos os consultores do Método Canguru do Ministério da Saúde, os quais me inspiraram e me ensinaram muito sobre o Método. Em especial agradeço àqueles com quem mais convivi e aprendi: Arnaldo Bueno, Carol, Maria Cândida Bouzada, Denise Morschi, Diva, Geisy Lima, Izilda Rosa, Karina, Luiza Machado, Marcelle Araujo, Margarete, Mary, Mônica Pessoto, Rebeca, Roberta, Rose, Sandrinha, Sergio Marba, Suzane, Vivian Azevedo, Zaira e Zeni Lamy.*
- *A Ianê Nogueira Vale por ter me introduzido ao maravilhoso mundo da pesquisa.*
- *A Thaila Castral pelo exemplo de pesquisadora e apoio imprescindível.*
- *Ao meu amigo Garth Warnock pelo imenso carinho, cuidado e por compartilhar seus conhecimentos e sabedoria.*
- *Ao meu querido namorado Kyle W. Vogler pelo apoio e orações tão importantes no momento da conclusão desse trabalho.*
- *A minhas amigas Ana Ribas, Ana Costa, Denise Prado, Marina, Nelma e Tamara pela amizade, apoio e por me ouvirem nos momentos de ansiedade durante o doutorado.*

- ✚ *Aos meus amigos (as) Allan, Ana, Angel, Bob, Charl, Caio, Carlos, Daniel, Diana, Ells Torres, Eric, Grey, Guadalupe, Janice, Jeniffer Chow, Jennifer Stimpson, Juliana Basso, Kirsten, Lília Johnson, Lílina, Leanne, Madalaine, Paul, Patrícia e Rubhia que, além da amizade, me ofereceram apoio e oração em momentos imprescindíveis.*
- ✚ *À minhas amigas Ana Xavier, Andréa Germano, Elis Mimmo, Eliane Machado Gonçalves, Fabiane Couto, Flavia Dias, Jessica Chagas, Juliana Basso, Joanna Whatley-Skattum, Katiany, Luciene, Luiza Zomer, Maura Santos, Raquel Tamez, Regina Oliveira, Rosângela Brito, Vilma Hutim e aos amigos André Sucupira, Anderson Gonçalves, Anatolii, Adílton Leite, Carlos Abaunza, Clive Hewson, David Blair, Fabian, Fabio, Kelvin Gonçalves, Kyle Vogler, Marcos, Matthieu Poupon, Phillip Hicks, Shanil Keshwani e Wagner Alexandre, pela amizade, carinho e apoio imprescindível em diferentes momentos do doutorado.*
- ✚ *Aos meus familiares queridos, incluindo os “Bidogas”, pelos risos, distração e apoio sempre.*
- ✚ *Ao querido Gilberto Paschoal pela preciosa ajuda em minha formação profissional.*
- ✚ *Aos pastores Antônio, Fabio e Ziti e a todos os amigos da Igreja Batista Redenção de Campinas; Igreja Batista de Itapema, Igreja Batista Denadai e da Coastal Church pelas orações e apoio.*
- ✚ *Aos amigos da unidade de neonatologia do CAISM/UNICAMP, pelo carinho sempre.*
- ✚ *Ao grupo de amigos que fiz na EERP/USP e que guardarei para toda vida: Aline, Carol Martins, Carolina Guimarães, Larissa Gímenes, Leonardo Neves, Luís Carlos Lopes, Lucy Chiodi, Mariana Souza, Marina Sayuri, Mariza Luiziani, Patrícia Fatima, Plínio, Roberto Fon e Samuel Barroco. Agradeço por compartilharmos as alegrias e dores da pós-graduação.*
- ✚ *À Shirley, secretária do Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública pela ajuda imprescindível nesses quatro anos.*
- ✚ *À Andreia, Joana e Rodolfo pelas revisões da tese e Carlos, pela tradução para Espanhol. Ao Jonas pela imensa ajuda na assessoria estatística e dedicação no momento em que tanto precisei.*
- ✚ *À Universidade de British Columbia pela oportunidade da realização do estágio como aluna pesquisadora (Doutorado Sanduiche) e aos responsáveis pelos laboratórios Joanne, Wayne e Hans pela disposição e ensino na área experimental.*
- ✚ *À EERP/USP pelo acolhimento e imensurável contribuição para minha formação enquanto pesquisadora.*
- ✚ *À todos que de alguma maneira contribuíram para conclusão deste trabalho.*

*“Quando me dedico à assistência eu posso salvar uma vida de cada vez,
quando me dedico ao ensino posso salvar dez vidas por vez, mas,
quando me dedico à pesquisa posso salvar mais de mil vidas de uma só vez”.*

(Garth Warnock)

*"Deus conceda-me serenidade para aceitar as coisas que eu não posso mudar,
coragem para mudar as coisas que posso,
e sabedoria para saber a diferença".*

(autor desconhecido)

RESUMO

SOUZA, S. R. **Efeito do método canguru na redução do estresse crônico em gestantes, mães e bebês pré-termo através da análise do cortisol e desidroepiandrosterona em unhas.** 2017. 213 f. Tese (doutorado). Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2017.

INTRODUÇÃO: O estresse tem sido foco de interesse em diferentes áreas de estudo devido às consequências no processo saúde-doença. Destaca-se a inexistência de estudos sobre o estresse crônico no período pré e pós-natal em unhas de mulheres que tiveram parto prematuro e sua relação o método canguru (MC). **OBJETIVOS:** Avaliar o efeito do Método Canguru na redução do estresse psicológico materno através de escalas psicométricas e o estresse biológico crônico através dos níveis de cortisol e desidroepiandrosterona (DHEA) em unhas de mães e bebês pré-termo (PT). **MÉTODO:** Trata-se de estudo comparativo prospectivo. A amostra contou com 59 mães e 63 bebês, coletada num hospital com o MC implantado e em dois hospitais controle, sem o MC. Foram incluídos PT (<37 semanas), sem malformações, internados em UN; mães alfabetizadas, que tiveram contato prévio com o filho, não usuárias de drogas ou hormônios. O estresse crônico materno e do PT foi avaliado pelo Cortisol e DHEA das unhas. A primeira amostra de unhas maternas foi coletada na terceira semana de vida do PT. A segunda amostra das mães e a amostra das unhas dos PT foram coletadas três meses após parto. Para análise do cortisol e DHEA das unhas das mães foi utilizada a técnica de enzima imunoensaio e dos bebês a cromatografia líquida de alto desempenho com espectrometria de massa. As unhas foram analisadas em laboratórios especializados no Canadá. O estresse psicológico das mães foi analisado com uso das PSS-10 e PSS:NICU que foram respondidas pelas mães na semana da admissão e alta do PT. **RESULTADOS:** Os níveis de Cortisol e DHEA nas unhas das mães referente a gestação e puerpério não diferiu significativamente entre os grupos canguru e controle, porém, diferiu entre os tempos, sendo que, os níveis dos esteroides na gestação foi maior do que no puerpério em ambos os grupos. O estresse percebido (PSS-10) pelas mães referente a gestação ($p=0,846$) e puerpério ($p=0,465$) também não diferiu significativamente entre os dois grupos. O estresse indicado pela PSS:NICU na admissão foi moderado nos dois grupos. O maior escore foi observado na subescala alteração no papel de pais. Na alta o escore foi significativamente menor ($p=0,00$) no canguru do que no controle. Não houve qualquer relação entre o estresse crônico (cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA) e o psicológico (PSS-10 na gestação e PSS:NICU no puerpério) e nem entre as duas medidas de estresse psicológico (PSS-10 e PSS:NICU na alta). O nível de cortisol foi menor nos PT submetidos ao canguru, porém, sem diferença significativa ($p=0,08$). Diferiram significativamente a DHEA – menor no controle e a razão Cort:DHEA – menor nos PT do grupo canguru. Da análise da relação entre estresse crônico constataram-se: associação positiva entre Cort:DHEA da mãe e PT ($\rho=0,51$ canguru; $\rho=0,43$ controle). **CONCLUSÃO:** O estudo mostrou que é possível medir cortisol e DHEA em unhas de mães e de bebês PT de forma retrospectiva. Os dados sugerem que o MC pode contribuir com a regulação e redução do estresse crônico do PT e do estresse psicológico materno.

Descritores: estresse psicológico, unidade de terapia intensiva neonatal, cortisol, mães, prematuro, método canguru, unhas, desidroepiandrosterona, gestantes.

ABSTRACT

SOUZA, S. R. **Effect of the kangaroo mother care on the reduction of chronic stress in pregnant women, mothers and preterm infants through the analysis of cortisol and dehydroepiandrosterone in fingernails.** 2017. 213f. Tese (doutorado). Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2017.

INTRODUCTION: Stress has been a focus of interest in different areas of study due to the consequences in the health-disease process. We highlight the lack of studies on chronic stress in pre and postnatal period using fingernails of women who had preterm birth and its relation to the kangaroo mother care (KMC) to reduce chronic and psychological stress. **OBJECTIVES:** To evaluate maternal psychological stress using psicometrics tools and evaluate chronic stress of mothers and Preterm infant (PT) using the analysis of cortisol and DHEA in fingernails and analyse the implication of the kangaroo care (KMC) in reduce chronic stress. **METHOD:** This is a prospective comparative study. The sample were 59 mothers and 63 babies collected in a KMC's hospital and two controls (without the KMC). Were included PT babies (< 37 weeks), who were admitted to the NICU, those with no malformations. With regard to mothers were included that one who had saw the PT at least once and excluded those using drugs or taking hormones. Maternal and PT chronic' stress were evaluated by fingernails' cortisol and DHEA. The first maternal sample was collected in the third week post-delivery and the second sample in the third month after baby's birth. The baby's fingernail sample was collected in the third month of life. The enzyme immunoassay was used for analysis of mothers' fingernails (cortisol and DHEA) and for babies' were used high performance liquid chromatography with mass spectrometry. Fingernail's analysis was done in Canada. The PSS-10 and PSS: mothers filled up NICU tools on first week in NICU and at discharge of the baby from this unit. **RESULTS:** The cortisol and DHEA's level in mothers' fingernails showed no significant difference between groups. Steroids levels in pregnancy time were higher than in puerperium in both groups (KMC and control) however, showed significant difference between times, steroids levels were higher during gestation time than the puerperium in both groups. The same occurred with the PSS-10 score (KMC's score referring to pregnancy ($p=0,846$) and puerperium ($p=0,465$), also had no difference was between groups. The PSS: NICU's stress level at admission in both groups was moderate. The highest score was showed in the subscale Parental Role. At discharge the score was significantly lower ($p=0,00$) in the kangaroo than in the control. There was no relationship between chronic stress (cortisol, DHEA and Cort:DHEA) and psychological stress (PSS-10 in pregnancy and PSS: NICU in the puerperium) or between the two psychological measures of stress (PSS-10 and PSS: NICU on discharge). The cortisol level was lower in PT submitted to kangaroo, however, without significant difference ($p = 0.08$). They differed significantly in DHEA - lower in the control and the ratio Cort:DHEA - lower in the kangaroo group. From the analysis of the relationship between chronic stress, there was a positive association between Cort: DHEA of the mother and PT ($\rho = 0.51$ kangaroo; $\rho = 0.43$ control). **CONCLUSION:** The study showed that it is possible to measure cortisol and DHEA in preterm infant and mothers' fingernails retrospectively. The data suggests that KMC can contribute to regulate and to reduce chronic stress in preterm infant and to reduce psychological mother's stress.

Key Words: psychological stress, neonatal intensive care unit, cortisol, mothers, premature, kangaroo method, nails, dehydroepiandrosterone, pregnant women.

RESUMEN

SOUZA, S. R. **Efecto del metodo canguro en la reducción del estrés crónico en las mujeres embarazadas, las madres y los recién nacidos prematuros a través del análisis de cortisol y la dehidroepiandrosterona en las uñas.** 2017. 213f. Tese (doutorado). Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2017.

INTRODUCCIÓN: El estrés ha sido foco de interés en diferentes áreas de estudio debido a las consecuencias en los procesos de salud/enfermedad. Cabe destacar la ausencia de estudios sobre el estrés crónico en el pre y postnatal en las uñas de las mujeres que tuvieron un parto prematuro y su método de relación de canguro (MC). **OBJETIVOS:** Evaluar el estrés psicologico de las madres y stress biológico crónico utilizando un análisis de cortisol y desidroepiandrosterona en las uñas de madres y bebés prematuros (PM) internados en unidades neonatales (UN), y la implicación del método canguro (MC) en la reducción del estrés. **MÉTODO:** Se trata de un estudio comparativo prospectivo. La muestra contó con 59 madres y 63 bebés, colectadas en un hospital con el MC implementado, y dos controles. Se incluyeron bebés prematuros (< 37 semanas), sin malformaciones, internados en UN; madres alfabetizadas que tuvieron contacto previo con PM, no usuarias de drogas ni hormonas. El estrés crónico materno y del PM fue evaluado por el Cortisol y DHEA de las uñas. La primera muestra de uñas maternas fue colectada en la tercera semana de vida del PM; la segunda muestra de las madres y de las uñas de los PM fue colectada tres meses después del parto. Las uñas fueron analizadas en Canadá. Para analizar el Cortisol y DHEA de las uñas de las madres se utilizó una técnica con una enzima de inmunoensayo, con la muestra de los bebés, cromatología líquida de alto desempeño con espectrometría de masa. Las escalas PSS10 y PSS:NICU fueron respondidas por las madres durante la admisión y el alta de los PM. **RESULTADOS:** El nivel de Cortisol y DHEA en las uñas de las madres no mostró una diferencia significativa entre los grupos canguro y control, sin embargo, diferir entre el tiempo, y el nivel de los esteroides en la gestación fue mayor en ambos grupos. Lo mismo ocurrió con la puntuación de la PSS-10 (la puntuación del canguro en la gestación (($p=0,846$) y el período post-parto ($p=0,465$) no difirió significativamente entre los dos grupos. El estrés indicado por la PSS:NICU durante la admisión fue moderado en los dos grupos. La mayor puntuación fue observada en la sub escala del papel de los padres. Al darle de alta, la puntuación fue significativamente menor ($p=0,00$) en el canguro que en el control. No hubo relación entre el estrés crónico (cortisol, la DHEA y la Cort: DHEA) y psicológico (PSS-10 durante la gestación y la PSS: UCIN el puerperio) o entre las dos medidas de estrés psicológico (PSS-10 y PSS: UCIN en el alta del hospital). El nivel de cortisol fue menor en PM sometido a canguro, sin embargo, no hubo diferencia significativa ($p = 0,08$). Difería significativamente DHEA - menos en el grupo control y la razón Cort:DHEA - menor en el grupo KMC. Análisis de la relación entre el estrés crónico se encuentra: una asociación positiva entre Cort:DHEA madre y PT ($p = 0,51$ canguro; $p = 0,43$ control). **CONCLUSIÓN:** El estudio nuestro que es posible la medida del cortisol y DHEA en las uñas de PM y en las uñas de las madres retrospectivamente. Los resultados sugiere que MC puede controlar y reducir el estrés crónico del niño y reducir el estrés psicológico en madres.

Descriptores: estrés psicológico, unidad de terapia intensiva neonatal, cortisol, madres, prematuro, método canguro, uñas, desidroepiandrosterona, gestantes.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 -	Sistema Nervoso Autônomo e Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, sistemas responsáveis pela resposta ao estresse	30
Figura 2 -	Eixo HHA resposta ao estresse e feedback negativo	31
Quadro 1 -	Estressores para o bebê apontados pelos profissionais que trabalham em unidade neonatal	37
Figura 3 -	Posição Canguru	44
Quadro 2 -	Cuidados desempenhados nas três etapas do Método Canguru no Brasil.	45
Figura 4 -	Resumo da Síntese hormônios esteroides.	50
Quadro 3 -	Métodos de análise do cortisol	52
Figura 5 -	Partes da unha - inteira e corte sagital	53
Figura 6 -	Resumo da aplicação das escalas	63
Quadro 4 -	Material oferecido para as mães no momento da alta hospitalar do bebê	64
Figura 7 -	Resumo da coleta de dados	67
Figura 8 -	Esquema de apresentação dos resultados	84
Figura 9 -	Participantes da pesquisa	85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) do cortisol nas unhas relativos à gestação (T1) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016	93
Gráfico 2 -	Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) de DHEA nas unhas relativos à gestação (T1) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016	94
Gráfico 3 -	Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) da razão Cort:DHEA nas unhas relativos à gestação (T1) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016	94
Gráfico 4 -	Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) de Cortisol nas unhas relativos ao puerpério (T2) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016.	97
Gráfico 5 -	Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) de DHEA nas unhas relativos ao puerpério (T2) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016	98
Gráfico 6 -	Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) da razão Cort:DHEA nas unhas relativos ao puerpério (T2) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016	98
Gráfico 7 -	Diagrama em caixa do cortisol das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (dados originais)	108
Gráfico 8 -	Diagrama em caixa do cortisol das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (transformação Inversa)	109
Gráfico 9 -	Diagrama em caixa do DHEA das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (dados originais)	109
Gráfico 10 -	Diagrama em caixa do DHEA das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (transformação Log10)	110
Gráfico 11 -	Diagrama em caixa da razão Cort:DHEA das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (dados originais)	110
Gráfico 12 -	Diagrama em caixa da razão Cort:DHEA das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (transformação Log10)	111

Gráfico 13 -	Diagrama em caixa do cortisol das unhas dos bebês PT nos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016	120
Gráfico 14 -	Diagrama em caixa do cortisol das unhas dos bebês PT dos grupos canguru e controle (dados transformados Log10), Ribeirão Preto, 2016	120
Gráfico 15 -	Diagrama em caixa da DHEA das unhas dos bebês PT dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016	120
Gráfico 16 -	Diagrama em caixa da DHEA das unhas dos bebês PT dos grupos canguru e controle (dados transformados Log10), Ribeirão Preto, 2016	121
Gráfico 17 -	Diagrama em caixa da razão Cort:DHEA das unhas do bebês PT dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016	121
Gráfico 18 -	Diagrama em caixa da razão Cort:DHEA das unhas do bebês PT dos grupos canguru e controle (dados transformados L10), Ribeirão Preto, 2016	121

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 -	Características sociodemográficas das mães, segundo grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	86
Tabela 2 -	Dados do pré-natal relacionados a gestação atual das mães, segundo grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	88
Tabela 3 -	Dados maternos relacionados a complicações na gestação atual, segundo grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	89
Tabela 4 -	Dados maternos relacionados ao estresse na gestação atual, segundo grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	90
Tabela 5 -	História gestacional pregressa de intercorrências apresentadas pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	91
Tabela 6 -	Valores originais de cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA (pg/mg) relativos à gestação (T1) das mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	92
Tabela 7 -	Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes entre os grupos canguru e controle em relação ao cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA na gestação (T1), Ribeirão Preto, 2016	93
Tabela 8 -	Escore médio de estresse percebido através da escala PSS-10 no Tempo 1 (T1) geral, segundo os grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	95
Tabela 9 -	Teste Mann-Whitney U referente a escala PSS-10 no Tempo 1 (T1), Ribeirão Preto, 2016 ^a	95
Tabela 10 -	Valores originais do cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA (pg/mg) no puerpério (T2) das mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	96
Tabela 11 -	Teste U de Mann-Whitney comparando os grupos ^a canguru e controle quanto aos valores do cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA no puerpério materno (T2), Ribeirão Preto, 2016	97
Tabela 12 -	Escores da escala PSS-10 relacionado ao estresse percebido no puerpério (T2) pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	99
Tabela 13 -	Teste Mann-Whitney U referente a escala PSS-10 no Tempo 2 (T2), Ribeirão Preto, 2016 ^a	99
Tabela 14 -	Escores da escala PSS:NICU, nas Métricas 1 (M1) e 2 (M2), relacionados ao estresse manifestado na primeira semana (T1) pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	100
Tabela 15 -	Mann-Whitney U referente a escala PSS:NICU no Tempo 1 de acordo com as Métricas 1 (M1) e 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016 ^a	101

Tabela 16 -	Escores da subescalas Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS:NICU, nas Métricas 1 (M1) e 2 (M2), relacionados ao estresse manifestado na primeira semana (T1) pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	101
Tabela 17 -	Tabela 17 - Mann-Whitney U das subescalas Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS:NICU no Tempo 1 de acordo com aa Métricas 1 (M1) e 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016	102
Tabela 18 -	Escores da escala PSS:NICU, nas Métricas 1 (M1) e 2 (M2), relacionados ao estresse manifestado na alta (T2) pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	102
Tabela 19 -	Mann-Whitney U referente a escala PSS:NICU no Tempo 2 de acordo com as Métricas 1 (M1) e 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016 ^a	103
Tabela 20 -	Escores da subescalas Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS: NICU, nas Métricas 1 (M1) e 2 (M2), relacionados ao estresse manifestado na alta (T2) pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	104
Tabela 21 -	Mann-Whitney U das subescalas Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS:NICU no Tempo 2 de acordo com as Métricas 1 (M1) e 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016 ^a	104
Tabela 22 -	Teste de Wilcoxon referente a diferença na escala PSS:NICU nos Tempos 1 e 2 (T2 – T1), obtidos pelas mães dos grupos canguru e controle nas métricas 1 (M1) e 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016 ^a	105
Tabela 23 -	Teste de Wilcoxon a diferença na subescala Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS:NICU nos Tempos 1 e 2 (T2 – T1), obtidos pelas mães dos grupos canguru e controle na métrica 1 (M1), Ribeirão Preto, 2016 ^a	106
Tabela 24 -	Teste de Wilcoxon a diferença na subescala Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS:NICU nos Tempos 1 e 2 (T2 – T1), obtidos pelas mães dos grupos canguru e controle na métrica 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016 ^a	106
Tabela 25 -	Dados originais de cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA em T1 e T2, Ribeirão Preto, 2016	107
Tabela 26 -	Dados transformados do cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA em T1 e T2, Ribeirão Preto, 2016	108
Tabela 27 -	Dados Wilcoxon do cortisol, DHEA e da razão Cort:DHEA (pg/mg) no T1 e T2 dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016 ^a	111

Tabela 28 -	Médias dos escores da escala PSS-10 apresentado pelas mães dos grupos controle e canguru na gestação (T1) e no puerpério (T2), Ribeirão Preto, 2016	112
Tabela 29 -	Dados Wilcoxon da escala PSS-10 no T1 e T2, Ribeirão Preto, 2016 ^a	113
Tabela 30 -	Dados descritivos dos PT dos grupos controle e canguru, Ribeirão Preto, 2016.	114
Tabela 31 -	Dados descritivos dos grupos canguru e controle relacionados ao nascimento e alta do PT da unidade neonatal, Ribeirão Preto, 2016	115
Tabela 32 -	Dados descritivos dos bebês PT relacionados ao Método Canguru, Ribeirão Preto, 2016	116
Tabela 33 -	Dados referente ao aleitamento materno exclusivo na alta e após 3 meses de vida dos bebês PT nos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	117
Tabela 34 -	Valores do cortisol, da DHEA e da razão Cort:DHEA (dados originais em pg/mg) dos bebês PT aos três meses de idade, segundo os grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	118
Tabela 35 -	Valores do cortisol, da DHEA e da razão Cort:DHEA (dados transformados – Log 10) dos bebês PT aos três meses de idade, segundo os grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016	119
Tabela 36 -	Teste de Mann-Whitney dos dados originais de cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA (pg/mg) dos bebês PT aos três meses de idade, segundo os grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016 ^a	119
Tabela 37 -	Teste t referente a relação entre o cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA das unhas dos bebês PT e o estresse vivenciados pela mãe na gestação, Ribeirão Preto, 2016	122
Tabela 38 -	Coeficiente de correlação de Sperman do estresse crônico (cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA em pg/mg) dos bebês do grupo canguru aos três meses de idade e do estresse crônico das mães na gestação (T1) e puerpério (T2), Ribeirão Preto, 2016	123
Tabela 39 -	Coeficiente de correlação de Sperman do estresse crônico (cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA) dos bebês do grupo controle aos três meses de idade e do estresse crônico das mães na gestação (T1) e puerpério (T2), Ribeirão Preto, 2016	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
CAISM	Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher
CL	Cromatografia Líquida
CL/MS	Cromatografia líquida com espectrometria de massa
CORT	Cortisol
Cort:DHEA	Relação/Razão Cortisol:Desidroepiandrosterona
CL	Cromatografia Líquida
CRH	Hormônio Liberador da Corticotrofina
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHEG	Doença Hipertensiva Específica da Gravidez
DP	Desvio Padrão
EERP	Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto
EIA	Enzimaimunoensaio
HES	Hospital Estadual de Sumaré
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HHA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HELLP	Síndrome Hellp (H: Hemólise; EL: Elevação Das Enzimas Hepáticas; LP: Baixa Contagem De Plaquetas).
IC	Idade corrigida
IG	Idade gestacional
NG/G	Nanograma Por Grama
NMOL/G	Nanomol Por Grama
MC	Método Canguru
PG/MG	Picograma por miligrama
PSF	Programa Saúde da Família
PSS/ PSS-10	Perceived Stress Scale / Perceived Stress Scale com 10 itens
PSS:NICU	Parental Stress Scale: Neonatal Intensive Care Unit
PT	Bebê Pré-termo ou Prematuro
RN	Recém-Nascido
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
UCIN	Unidade de Cuidados Intermediários Neonatal
UCINco	Unidade de Cuidados Intermediários Neonatal Convencional
UCINca	Unidade de Cuidados Intermediários Neonatal Canguru
UBS	Unidade Básica de Saúde
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alto desempenho com Espectrometria de Massa
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 Estresse	30
1.2 Estresse na gestação e parto prematuro	33
1.3 Estresse e o bebê pré-termo	35
1.4 Estresse e os pais do bebê pré-termo	38
1.5 Método Canguru para redução do estresse	40
1.6 Como medir o estresse	46
1.6.1 Medidas psicométricas de estresse	46
1.6.2 Medidas biológicas do estresse	48
2 OBJETIVOS	55
2.1 Objetivo geral	56
2.2 Objetivos específicos	56
3 MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1 Tipo de estudo	59
3.2 Local de estudo	59
3.3 Variáveis	61
3.4 Amostra	62
3.5 Coleta e processamento dos dados	62
3.5.1 Método de aplicação das escalas PSS e PSS:NICU	62
3.5.2 Método de coleta do material biológico	63
3.6 Análises dos dados	67
3.6.1 Análise dos dados coletados através das escalas	67
3.6.2 Análise do cortisol e DHEA em unhas (material biológico)	68
3.6.2.1 Análises Piloto do cortisol/DHEA das unhas	70
3.6.2.2 Análise do cortisol/DHEA das unhas das mães	78
3.6.2.3 Análise do cortisol/DHEA das unhas dos bebês PT	79
3.7 Análise estatística	80
3.8 Aspectos éticos	82
4 RESULTADOS	83
4.1 Caracterização das mães participantes	86
4.1.1 Dados gerais das mães	86
4.2 Estresse crônico na gestação materna	91

4.3 Estresse percebido pelas mães na gestação	95
4.4 Estresse crônico no puerpério materno	96
4.5 Estresse percebido pelas mães no puerpério	98
4.6 Estresse materno na hospitalização do bebê PT	99
4.6.1 Escala PSS:NICU no T1	100
4.6.1.1 Subescala da PSS:NICU no T1	101
4.6.2 Escala PSS:NICU no T2	102
4.6.2.1 Subescala da PSS:NICU no T2	103
4.7 Comparação do estresse materno na gestação e no puerpério	106
4.7.1 Cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA	107
4.7.2 Estresse percebido PSS-10 pelas mães na gestação e no puerpério	112
4.8 Correlação entre as medidas de estresse materno	113
4.8.1 Cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA com escalas PSS-10 e PSS:NICU	113
4.8.2 Escalas PSS:NICU e PSS-10	113
4.9 Caracterização e Estresse crônico no bebê PT	114
4.9.1 Caracterização dos bebês PT	114
4.9.2 Estresse crônico dos bebês PT no primeiro trimestre de vida	117
4.10 Correlação do estresse crônico do bebê PT e da mãe	122
4.11 Análise de regressão das variáveis maternas e do PT	124
5 DISCUSSÃO	126
6 CONCLUSÃO	143
REFERÊNCIAS	145
APÊNDICES	159
ANEXOS	189

Esta tese está revisada segundo a Nova Ortografia da Língua Portuguesa (2009), em vigor a partir de 1º de janeiro de 2009, no Brasil.

Apresentação

Atuando em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) há quase vinte anos, acompanhei o sofrimento dos pais diante da inesperada e longa internação de seus filhos prematuros. Observei, nesses anos, que os familiares se deparam com uma situação tão difícil e estressante que lhes causam dores comparáveis com uma dor física ao deixar seus filhos no hospital. Em uma conversa informal com uma mãe que acabara de ter alta hospitalar, que deixaria seu bebê pré-termo (PT) internado na unidade neonatal (UN), pude evidenciar a grandeza do sofrimento daquele momento. Essa mãe, portadora de uma recidiva de câncer de mama, me disse que todo o sofrimento que já teve devido à cirurgia, ao tratamento de quimioterapia e radioterapia não se comparava à dor que ela sentia naquele momento de ir para casa sem seu filho nos braços. Essa mãe estava sofrendo com a notícia da volta do câncer, mas me confidenciou que não tinha medo do que ainda passaria no novo tratamento, porém tinha muito medo de ir embora e de deixar seu filho no hospital. Fatos como este e muitos outros relatos que ouvi ao longo de minha carreira têm me motivado a buscar meios para aliviar a dor e o estresse de pais de bebês internados em UTIN, principalmente os pais e PT que, devido ao nascimento imprevisto e precoce, sofrem por meses na UN à espera da melhora e alta de seus filhos. Sem dúvida, essa separação também é muito dolorosa para o bebê. Em minha rotina de trabalho me comove o sofrimento desses pequenos, que, foram pegos de surpresa com saída precoce do ambiente tão confortante do útero para enfrentar a dura realidade da UN. A separação de seus pais, principalmente da mãe, é algo que causa muito estresse ao bebê. Se eles pudessem verbalizar essa dor, como a mãe que mencionei, poderíamos imaginar quão grande é o sofrimento de não ter sua mãe ao lado vinte quatro horas.

Durante os anos de trabalho, motivada pelo amor à profissão e pelas vivências, como a anteriormente mencionada, realizei pesquisas em diferentes áreas da neonatologia buscando melhorar o cuidado aos recém-nascidos e suas famílias. O foco dos meus estudos nos últimos anos tem sido o estresse. Validei, para o Brasil, em minha dissertação de mestrado, a escala *Parental Stress Scale: Neonatal Intensive Care Unit* (PSS:NICU) que é um instrumento que avalia o estresse de pais de bebês internados em UTIN. No estudo de validação da PSS:NICU para o Brasil, pude confirmar o que empiricamente era de meu conhecimento, que a UN está repleta de estressores para os pais de bebês ali internados (SOUZA; DUPAS; BALIEIRO, 2012) e que esse fato merece a atenção e pesquisas de profissionais de saúde a fim de minimizar suas consequências para o bebê e sua família. Com a escala PSS:NICU em mãos, meu desejo era continuar a trajetória de pesquisas a fim de buscar meios para reduzir o estresse dos pais em UN, pois sempre acreditei que ao cuidar dos pais, também estou

cuidando do bebê, porque, se os pais estiverem “doentes” como cuidarão de seus filhos? Tornei-me então parte do Grupo de Pesquisa em Enfermagem no Cuidado à Criança e ao Adolescente (GPECCA) e pude aprofundar meus conhecimentos sobre esse tipo de cuidado através de pesquisas orientadas pela Profa. Carmen G. Silvan Scochi e a parceria com Profa. Fay Warnock que, além dos estudos com criança, tem como expertise a análise do estresse crônico. Atrelado a isso, minha vivência como consultora do Ministério da Saúde do Brasil para o Método Canguru, fez-me compreender ainda mais a importância da utilização do Método para redução do estresse das mães e PT, na unidade neonatal. Assim, minha experiência profissional, os contatos com as professoras citadas e a participação no GPECCA e Ministério da Saúde foram de suma importância para o desenvolvimento desta pesquisa.

Cabe destacar que a realização do doutorado sanduiche sob supervisão do Profa. Fay Warnock e a oportunidade de acompanhar as análises das unhas das mães e bebês nos laboratórios da *University of British Columbia*, em Vancouver, no Canadá, foi extremamente importante para meu desenvolvimento como pesquisadora.

O presente estudo está disposto da seguinte forma: na introdução consta a uma revisão sobre estresse, destacando os estressores na gestação, estressores do bebê pré-termo e de seus pais. Logo a seguir, apresentamos o Método Canguru bem como suas vantagens, visto que o trabalho objetivou analisar seu efeito na redução do estresse dos participantes. Apontamos também os métodos de análise de estresse encontrados na literatura com destaque as escalas psicométricas PSS-10 e PSS:NICU e análise do cortisol e desidroepiandrosterona em unhas. A introdução e os objetivos demonstram a importância e ineditismo do tema estudado. Nos métodos constam o tipo de estudo, local da pesquisa, amostra e recrutamento dos participantes, os critérios de inclusão e exclusão. Também apresentamos as variáveis estudadas, coleta e processamento de dados, estudo piloto, método de análise e aspectos éticos. Para melhor compreensão dos resultados, esses foram exibidos em partes: iniciamos com os dados do estresse materno referente ao terceiro trimestre de gestação e os dados do estresse no puerpério (durante a internação do filho na unidade neonatal), seguido da comparação entre grupos (canguru e controle) e os tempos (gestação e puerpério). Logo após apresentamos os resultados das análises dos bebê pré-termo e o efeito do Método Canguru na redução do estresse. Finalizamos com a discussão dos resultados e apresentamos a conclusão do estudo. Após isso, disponibilizamos as referências, apêndices e anexos.

1 Introdução

O estresse tem sido foco de interesse em diferentes áreas de estudo devido às consequências no processo saúde-doença (MOAL, 2007). Ele atinge o indivíduo desde a concepção até a morte e, por isso, é importante que profissionais conheçam e compreendam o papel que desempenha em diferentes fases da vida, conheçam seus efeitos, bem como as estratégias clínicas para reduzir o impacto deste na saúde. O foco deste estudo é avaliar o estresse, no período pré e pós-natal, em mulheres que tiveram parto prematuro, e analisar o estresse dos seus bebês. A relevância do tema está relacionada ao fato de o parto prematuro ter sido associado ao estresse durante a gestação (TANDU-UMBA et al., 2014; CLASS et al., 2011; TEGETHOFF et al., 2010; WOODS et al., 2010; KHASHAN et al., 2009; TALGE et al., 2007; WADHWA, 2005) e que esse estresse produz graves consequências tanto para a mãe quanto para o filho (TANDU-UMBA et al., 2014; BEYDOUN; SAFTLAS, 2008; TALGE et al., 2007; MULDER et al., 2002).

Além da prematuridade, o baixo peso ao nascimento e morte perinatal também foram identificados como consequência do estresse materno (TANDU-UMBA et al., 2014), isso se dá devido a alteração da resposta do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) que ocorre na gravidez, visto que esta alteração no sistema neuroendócrino pode levar ao trabalho de parto prematuro, decorrente do aumento da liberação de CRH. Ocorre também o aumento de catecolaminas e, essa alteração, afeta a consistências dos vasos (tônus) aumentando o risco de pré-eclampsia, assim intensifica ainda mais a chance do parto prematuro. A alteração no eixo HHA com aumento dos glicocorticoides faz com que haja uma diminuição da imunidade da mulher, ficando mais susceptível às infecções sendo, as infecções vaginais, as mais comuns nessa população, representando mais um agravante para o risco de o parto ocorrer de forma prematura (LITTLETON et al., 2010).

O objetivo desta pesquisa não é apenas identificar o estresse nessa população, mas, também conhecer as implicações de um método recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para redução desse estresse. Assim, a intervenção avaliada será o Método Canguru. Esse método foi criado na Colômbia, em 1979, para recém-nascido pré-termo (PT) e de baixo peso, devido à falta de recursos humanos e tecnológicos (BRASIL, 2015), porém devido suas evidências, incluindo o seu importante papel na redução da morbi-mortalidade, ele tem sido utilizado em todo o mundo não só com PT, mas também como cuidado para bebês a termo (BALEY; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2015).

Para analisar a implicação desse do Método Canguru na redução do estresse há necessidade de uma ferramenta adequada para avaliá-lo. Identificou-se na literatura diferentes formas utilizadas para avaliações do estresse sendo as medidas psicométricas as mais

comumente usadas. Buscou-se instrumentos usualmente empregados para gestante, mães e PT. Para analisar o estresse em gestantes foi encontrada a Escala de Estresse Percebido – *Perceived Stress Scale* – PSS (STANEVA et al., 2015; TANDU-UMBA et al., 2014; ALDERDICE; LYNN; LOBEL, 2012); para avaliação dos pais, a Escala de Estresse Parental em Unidade de Cuidado Intensivo Neonatal – *Parental Stress Scale: Neonatal Intensive Care Unit* – PSS:NICU (SCHARPPIN et al., 2013). Foi pesquisado na literatura instrumento para analisar o estresse dos bebês, porém não encontramos uma ferramenta específica para esse fim. Encontrado o uso frequente de ferramentas para avaliar a dor e, consequentemente, a reação de estresse como, por exemplo, a escala *Premature Infant Pain Profile* – PIPP (RIBEIRO et al., 2013) e o Sistema de Codificação da Atividade Facial Neonatal – *Neonatal Facial Coding System*–NFCS (CASTRAL et al., 2012), dentre outras, porém, tais instrumentos não foram utilizados devido ao foco principal deste estudo ser o estresse e não a dor.

Embora as medidas psicométricas para avaliação do estresse sejam de inegável relevância, estudos têm indicado suas limitações. Nem sempre são utilizados os instrumentos psicométricos mais adequados e, nem sempre, o estresse é analisado como um todo, ou seja, os estressores, a percepção individual de estresse e as reações individuais para o evento (NAST et al., 2013). Às vezes o instrumento é capaz de avaliar o estresse na “população geral”, mas não é capaz de detectar o estresse “naquela população específica” (NAST et al., 2013), por isso é necessário escolher a escala com rigor metodológico, sendo a mais adequada para o público estudado. Para melhor analisar o estresse, indica-se também a inclusão de outra medida complementar.

A opção foi pela técnica de análise biológica, ideal para a contemplação da resposta individual à situação de estresse. Verificou-se na literatura que o cortisol é um marcador biológico, comumente utilizado para analisar o estresse em gestante (DAVIS et al., 2011), em puérperas (CASTRAL et al., 2012; KIMBERLY et al., 2011) e recém-nascidos (CASTRAL et al., 2012; DAVIS et al., 2011).

Como o foco desta pesquisa não é o estresse agudo, e sim o estresse prolongado, gerado por eventos estressantes na gestação e permanência da mãe e PT na unidade neonatal, buscou-se na literatura um método adequado para essa análise. Verificou-se que o estresse crônico tem sido analisado através do cabelo e, estudos mais recentes, tem utilizado a unha (MAIDANA; BRUNO; MESCH, 2013; WARNOCK et al., 2010). Pesquisas mostram que o melhor método de avaliação do estresse crônico é a análise do cortisol utilizando as unhas, pois essa é a medida menos invasiva, não sofre alteração durante a coleta, não requer

complexo armazenamento e é a mais eficaz (SILVA; EUNUMO, 2014; RUSSEL et al., 2012; LI et al., 2012; BEN KHELIL et al., 2011). Constatou-se também, a falta de literatura disponível sobre esse tipo de análise na gestação e no período neonatal em PT.

1.1 Estresse

Quando um indivíduo vivencia uma situação de estresse, rapidamente é ativado o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) simpático e acionado o Sistema Adrenomedular fazendo com que haja a liberação de catecolaminas em resposta à ameaça (Figura 1). As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e o glicocorticoide (cortisol) agem juntos para mobilizar energia, tanto armazenando como redistribuindo recursos com a finalidade de preparar o indivíduo para “regir” a situação de estresse. Para que o organismo comece a se defender é elevada a pressão arterial, o débito cardíaco e há liberação de substâncias necessárias nos tecidos, como por exemplo, a glicose, indispensáveis para enfrentar a ameaça na reação de luta ou fuga (RUSSELL et al., 2008).

Figura 1 - Sistema Nervoso Autônomo e Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, sistemas responsáveis pela resposta ao estresse

Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAggksAA/fisiologia-estresse>. Acesso em 23/12/2016.

O eixo HHA, também conhecido como Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), é acionado através do neurônio do núcleo paraventricular do hipotálamo e da secreção do hormônio liberador corticotrófico (HLC ou CRH) que atuam na hipófise anterior, liberando o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que age no córtex da glândula adrenal liberando o cortisol. O cortisol é um glicocorticóide que é secretado no cotidiano de forma pulsátil e segue o ciclo circadiano, sua liberação é maior pela manhã e menor quantidade à noite. A liberação ocorre duas a três vezes por hora, quando não está sob estresse. Porém, sob situação de ameaça, há uma secreção demasiada desse hormônio levando ao desequilíbrio homeostático. A secreção de glicocorticóides após o estresse promove a mobilização de energia armazenada e potencializa os efeitos do SNA simpático (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009; TSIGOS; CHROUSOS, 2002), sendo o pico de cortisol atingido em 20 a 40 minutos após o agente estressor ser acionado (HUNTER; MINNIS; WILSON, 2011; GOLDBERG et al., 2003). A duração e intensidade da resposta ao estresse é proporcionalmente compatível à ameaça causada pelo estressor (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). A mobilização de energia induzida pelo estresse deve persistir por tempo limitado para não comprometer o organismo. Após concluído o estímulo estressante, os glicocorticóides, através do feedback negativo, inibem a secreção de ACTH pela hipófise e HCL pelo hipotálamo, cessando a resposta ao estresse (Figura 2). Porém, se o estresse persistir, é mantida a excitabilidade do eixo HHA e o sistema simpático-adrenomedular conserva-se ativado, exacerbando a liberação do cortisol, adrenalina e noradrenalina no corpo do indivíduo levando a repercussões sistêmicas (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004).

Figura 2 - Eixo HHA resposta ao estresse e feedback negativo

A palavra “*stress*” era utilizada na física para análise da interação de força e resistência, Hans Selye foi quem a utilizou pela primeira vez na área de saúde. Ele chamou de Síndrome Geral de Adaptação o conjunto de esforços fisiológicos adaptativos apresentados diante da quebra do equilíbrio, ou seja, diante de situações de ameaça (SELYE, 1955). Definiu estresse como o resultado inespecífico de qualquer demanda sobre o corpo, seja de efeito mental ou somático e, como estressor, todo agente causador da reação de estresse seja de natureza física, mental ou emocional. Denominou *eustess* o estresse fisiológico em níveis aceitáveis e *distress* o estresse em níveis excessivos (patológico) (SELYE, 1976).

A primeira fase do estresse é chamada de reação de alarme na qual o corpo dá a resposta inicial ao agente estressor e prepara o indivíduo para lutar ou fugir. Se a causa do estresse persiste o organismo é levado à segunda fase: resistência, nesse momento o organismo tenta se reequilibrar (SELYE, 1955). Se alcança o equilíbrio a resposta bioquímica cessa, mas se persiste o organismo não consegue se reequilibrar, enfraquece e é dominado pelo agente estressor (SILVA; MARTINEZ, 2005; SELYE, 1955), levando o indivíduo à exaustão, na qual ocorre esgotamento psicológico e físico (SELYE, 1955).

A incapacidade de gerir o estresse pode ser resultado de uma inadequada resposta do eixo HHA em situações de exposição prolongada, isso pode causar danos à saúde física e emocional do indivíduo, bem como torná-lo vulnerável, gerando infecções, gastrites, hipertensão (TANDU-UMBA et al., 2014); agravando alguma doença pré-existente, promovendo o aparecimento de doenças como depressão, câncer ou doenças cardiovasculares (ORTIZ et al., 2014; DE KLOET; JOELS; HOLSBOER, 2005; JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004), podendo levar o indivíduo à morte (SELYE, 1955).

O estresse pode ser agudo ou crônico. Agudo é aquele tipo de situação que causa estresse de maneira pontual, momentânea e de curto período, enquanto o estresse crônico é aquele que persiste por longos períodos (ORTIZ et al., 2014). O estresse agudo pode durar dias ou semanas e o crônico pode durar semanas ou meses (KONDURU, 2011). Ambos são prejudiciais à saúde (ORTIZ et al., 2014).

As fontes geradoras de estresse podem ser externas ou internas. Estressores externos estão relacionados ao meio em que o indivíduo está inserido (LIPP, 2001), ou seja, presentes no cotidiano de cada um por meio de ameaça física ou de segurança pessoal, moral, financeira ou outra. Os estressores internos são as causas mais comuns da ansiedade humana, o que leva conseqüentemente à problemas patológicos (SILVA; MARTINEZ, 2005). Podem agir no organismo corroendo dia após dia, por exemplo, através de sentimento de culpa ou de rejeição,

por desavenças passadas, preocupações com o futuro, sonhos que não se pode alcançar, perfeccionismos, fantasias e problemas de afetividade (LIPP, 2001; LAZARUS, 1966). O estresse independe de classe social, gênero e idade (LIPP, 2001), mas pode sofrer influência das pressões repetitivas, como por exemplo, o indivíduo que sofre constantes pressões no trabalho por causa do chefe ou pelo tipo de atividade exercida, como o controlador de tráfego aéreo que num simples piscar de olhos pode causar a morte de várias pessoas, ou pressões diárias como a sofrida por um homem que assiste a dor do câncer da esposa a caminho da morte (SILVA; MARTINEZ, 2005).

Existem também os estressores que não são “reais”, ou seja, que ainda não ocorreram e têm menor risco de ocorrer, mas, que podem trazer problemas verdadeiros ao indivíduo. Exemplo disso é dizer que a pessoa pode ficar ansiosa devido ao medo de ser assaltado, medo de perder o emprego, de ser traído pelo namorado ou marido, ou qualquer outro fator não palpável naquele momento (SILVA; MARTINEZ, 2005), mas que faz pressão constante desencadeando a resposta exacerbada ao estresse.

Esses estressores podem ser psicológicos, emocionais, físicos ou socioeconômicos. Os estressores psicológicos podem ser causados devido ao confronto com um ambiente novo, por exemplo, devido a mudança para uma nova casa, a necessidade de conviver em lugares com grande quantidade de pessoas, como consultório médico ou hospitais lotados (DOUGLAS, 2010). Os estressores emocionais podem ser devido a doença na família; morte do parceiro, familiar ou outro ente querido; tensão familiar; problemas nas gestações anteriores ou história prévia de um bebê natimorto (TANDU-UMBA et al., 2014; CLASS et al., 2011; BEYDOUN; SAFTLAS, 2008). O estresse físico pode ser causado pela má alimentação, alterações imunológicas ou outro dano físico (DOUGLAS, 2010). Os estressores socioeconômicos podem ser devido a problemas com vizinhança (viver em um bairro pobre e ou/violento); problemas com trabalho (estresse no emprego ou desemprego); problemas financeiros, problemas com a rede familiar (sofrimento, doença ou uso de substâncias químicas); discriminação racial (pessoal, familiar ou amigo); desavenças com a rede de apoio (conflito entre a mulher e uma pessoa próxima em sua rede) (GIURGESCU et al., 2012). Enfim, os estressores podem atingir o indivíduo de diferentes formas em diferentes fases da vida, ocorrendo mesmo antes mesmo do nascimento até a morte, sendo que suas causas podem ser de origem variada.

1.2 Estresse na gestação e parto prematuro

Durante a gravidez a mulher vivencia várias mudanças físicas e psicossociais, as quais causam estresse. Somado a isso, a gestante também pode se confrontar com os estressores

acima mencionados, que podem atingi-la de forma aguda ou crônica. Quando experimentado de forma breve, o estresse provoca sintomas agudos e transitórios os quais ativam mecanismos apropriados para restaurar a homeostase, evitando quaisquer outros efeitos ou danos (DOUGLAS, 2010), porém, alguns estressores acometem a mulher ao longo da gestação de forma crônica, podendo ocasionar problemas maiores.

O estresse nesse período tem sido considerado como potencial fator contribuinte para resultados negativos da gravidez (CALVIN et al., 2008), causando riscos tanto para o feto ou bebê (TANDU-UMBA, 2014) quanto para a mãe (AYERS et al., 2016; BEYDOUN; SAFTLAS, 2008; TALGE et al., 2007), o que tem despertado o interesse de pesquisadores.

Doenças psicológicas como o estresse, a ansiedade, a depressão e a doença do pânico, durante a gestação, têm sido apontadas em vários estudos como condutoras ao parto prematuro (TANDU-UMBA et al., 2014; CLASS et al., 2011; TEGETHOFF et al., 2010; WOODS et al., 2010; KHASHAN et al., 2009; TALGE et al., 2007; ALDER et al., 2007; WADHWA, 2005).

A gravidade das consequências está ligada ao momento que esses insultos estressantes ocorrem. Pesquisa realizada para identificar o impacto do estresse pré-natal sobre o parto, utilizando uma amostra de base populacional na Suécia, mostrou que a exposição a estressores durante o quinto e sexto mês de gravidez provoca maiores efeitos adversos à gestação (CLASS et al., 2011). O estresse vivenciado no quarto e quinto mês de gravidez mostrou associação com nascimento de bebês mais imaturos (com menor idade gestacional); no quinto e sexto mês verificou-se maior associação com parto prematuro e baixo peso, sendo o quinto mês o maior risco para pequeno para idade gestacional – PIG (CLASS et al., 2011).

Importante salientar que evidências mostram que não só mulheres consideradas com alto risco na gravidez tem risco para parto prematuro. Estudo realizado por Lynn et al. (2011) revelou que mulheres saudáveis, com gravidez de baixo risco, que experimentaram uma gama de estressores na gestação também tiveram resultados negativos na gestação, inclusive parto prematuro.

Além das doenças psicológicas, a prematuridade pode ser causada por agente multifatorial, sendo apontados os seguintes fatores de risco: idade materna, aspectos socioeconômicos, fatores ambientais, falta de acompanhamento pré-natal, desvalorização do parto normal (RAMOS; CUMAN, 2009), violência doméstica (WOODS et al., 2010; RODRIGUES et al., 2008), uso de drogas (WOODS et al., 2010) e co-morbidades (WOODS et al., 2010). A alteração da resposta HHA ocorrida na gravidez, modificações no sistema neuroendócrino e no tônus vascular (risco para hipertensão, pré-eclâmpsia), imunidade alterada

(vulnerabilidade a infecções) são considerados agravantes de parto prematuro (LITTLETON et al., 2010).

1.3 Estresse e o bebê pré-termo

De acordo com OMS a estimativa de nascimento prematuro (antes de completar 37 semanas de idade gestacional) está em torno um para cada dez e cerca de 7% dos PT morrem por ano, devido a complicações (WHO, 2012). Dentre as complicações estão aquelas provenientes da “continuação” do desenvolvimento do PT ocorrer no meio extrauterino, ou seja, complicações iatrogênicas causadas pelo ambiente da unidade neonatal.

Quando o bebê nasce prematuramente, ele sofre com a súbita retirada do ambiente acolhedor e tranquilo do útero de sua mãe, que era totalmente favorável para seu crescimento (NASCIMENTO; MARANHÃO, 2010); sofre por ser afastado de sua mãe e ser colocado em um lugar onde falta aconchego, a claridade é excessiva, a temperatura instável, muito barulho, manipulação excessiva e é submetido a diversos procedimentos dolorosos (NASCIMENTO; MARANHÃO, 2010; ANTONUCCI et al., 2009).

A unidade neonatal expõe o bebê a diversos estressores. A luz, por exemplo, representa um grande estressor ao PT devido aos prejuízos no ciclo circadiano e suas consequências (ANTONUCCI et al., 2009). A exposição prolongada à luz altera o sono do bebê e essa alteração no ciclo sono-vigília, que é fundamental para o desenvolvimento do PT, traz prejuízos ainda maiores (RIVKEES et al., 2004 in LAI; BEARER, 2007). Ao contrário do ambiente escuro e quente do útero, as unidades neonatais, normalmente são bem claras, com luzes acesas por 24 horas, pois o ambiente requer constante vigilância à saúde do bebê internado. Essa exposição prolongada à luz pode causar efeitos adversos no PT (NASCIMENTO; MARANHÃO, 2010; ANTONUCCI et al., 2009; LAI; BEARER, 2007).

Além da claridade, o ambiente da unidade neonatal geralmente é frio e a termorregulação é um processo bem complexo para os bebês que nascem prematuros e que necessitam de um ambiente térmico neutro (ANTONUCCI et al., 2009), pois seu sistema imaturo encontra dificuldade em se manter (NASCIMENTO; MARANHÃO, 2010). A incubadora tem a função de fornecer um ambiente térmico neutro, porém nem sempre esse ambiente é estável devido às oscilações internas e externas, levando aos extremos de temperatura. Na incubadora, o PT pode, por exemplo ser levado à hipotermia porque perde temperatura para o meio, para os objetos e para o ar. Isso coloca sua vida em risco, pois causa vasoconstrição, aumento da atividade muscular, aumento do consumo de glicose que leva à hipoglicemia, redução da produção de surfactante com aumento da necessidade de oxigênio e

aumento do consumo de ácido láctico levando a acidose metabólica e suas implicações. Se a hipotermia persiste pode levar a prejuízos no crescimento, hemorragia intra-periventricular, infecções e até mesmo a morte (ANTONUCCI et al., 2009).

Na unidade neonatal, os bebês também são expostos a diferentes e estressantes ruídos (NASCIMENTO; MARANHÃO, 2010; ANTONUCCI et al., 2009), dentre eles estão: sons de equipamentos (ventiladores, monitores, aparelhos de fototerapia, nebulizadores e incubadoras); o fechar da portinhola das incubadoras, escrever em cima da incubadora, derrubar coisas no chão, conversar perto da incubadora, bater equipamentos na parede, fechar gavetas, (LAI; BEARER, 2007), vazamento de gases (ar comprimido/oxigênio), toque da campainha de telefone, bater de portas, abrir e fechar lixos, som de sapatos, lavagem de mãos, sons de conversas, alarmes, até mesmo o choro e agitação de outros bebês ou qualquer outro barulho que posso adentrar na incubadora (ANTONUCCI et al., 2009; ICHISATO; SCOCHI, 2006). A equipe que trabalha nas unidades neonatais sabe identificar os ruídos existentes (NAZARIO et al., 2015) por isso têm-se observado ações a fim de diminuir a intensidade dos barulhos e as unidades tem se mostrado menos ruidosas nos últimos anos, porém este continua sendo um grande problema e um fator agravante à saúde do bebê PT (ANTONUCCI et al., 2009).

Assim como os ruídos, a dor é outro causador de estresse conhecido pelos profissionais que trabalham nessas unidades. O estudo realizado por Newnham et al. (2009) mostrou que a equipe de saúde (médicos e enfermeiros que cuidam de PT) sabe identificar quais são os procedimentos realizados com os bebês que são considerados estressantes (Quadro 1), sendo que os citados como os mais dolorosos e consequentemente mais estressantes, foram os procedimentos invasivos como: inserções vasculares, exames de fundo de olho, cirurgia, punções lombares e intubação (NEWNHAM et al., 2009).

Quadro 1 - Estressores para o bebê apontados pelos profissionais que trabalham em unidade neonatal

Mudanças	Acesso venoso periférico	Acesso vascular Central	Ventilação
1. Troca de fraldas	8. Inserção de IV	16. Inserção de cateter umbilical arterial ou venoso	20. Intubação
2. Troca de posição	9. Tentativas múltiplas de inserção IV	17. Múltiplas tentativas de inserção de cateter umbilical arterial ou venoso	21. Inserção do tubo de CPAP nasal
3. Remoção do bebê da incubadora / berço (enrolado)	10. A remoção do IV	18. Remoção de cateter umbilical arterial ou venoso	22. Receber CPAP nasal
4. Remoção do bebê da incubadora / berço (não enrolado)	11. Flushing IV (para garantir a permeabilidade das IV)	19. Inserção do cateter percutâneo (PICC)	23. Inserção de Hudson Pronga
5. Higiene oral	12. Inserção do cateter arterial periférica		24. Aspiração do tubo TET
6. Higiene ocular	13. Múltiplas tentativas de inserção de cateter arterial		Nutrição
7. A aspiração do nariz e da boca	14. Remoção do cateter arterial		25. Inserção de sonda nasogástrica (SNG)
	15. Coleta de sangue por ex. gasometria		26. Aspiração gástrica via SNG
Alimentação	Procedimentos médicos	Cirurgia	Variados
27. Alimentação por SNG intermitente	32. Inserção dreno tórax (drenagem Pneumotórax)	34. Procedimento real	40. Punção de calcâneo
28. Alimentação por gavagem	33. Punção lombar	Radiologia	41. Instalação de sensores de monitores
29. Alimentação por mamadeira		35. Ecocardiograma	42. Aplicação do creme corporal
30. Alimentação por copo		36. ECG	43. Pesar o bebê
31. Sucção no peito		37. Ultrassom	44. Exame de fundo de olho
		38. TC / IRM	
		39. Raio X	

Fonte: Newnham, C.A.; Inder, T.E.; Milgrom, J. et al. Measuring preterm cumulative stressors within the NICU: The neonatal infant stressor scale / Early Human Development, v.85, p.549–555, 2009

Apesar dos causadores de dor e estresse ao PT serem conhecidos pela equipe da unidade neonatal, nem sempre são avaliados corretamente, incorrendo no inadequado manejo desses, aumentando os prejuízos para a saúde do bebê (SCOCHI et al., 2006).

Devido ao fato da unidade neonatal ser um ambiente que exige cuidados intensivos, a manipulação excessiva faz parte do cuidado e é um estressor que também atinge diariamente o PT. Esse fator pode intensificar os anteriormente citados e/ou causar dor, pois, ao realizar os cuidados necessários à saúde do bebê, muitas vezes a equipe não se atenta para o grau de prejuízos que isso pode causar. Uma análise realizada por Sousa, Silva e Araújo (2008) por meio de filmagens feitas durante 17 dias em uma unidade neonatal, demonstrou que, diariamente, o PT é extremamente manipulado. No estudo, os bebês foram manipulados cerca

de 45 vezes/dia e, em 24 horas, foi manipulado por cerca de 5 horas do dia. A manipulação excessiva e a exposição à dor repetitiva podem causar danos nos neurônios em desenvolvimento, causando alterações comportamentais evidenciadas por causa da ansiedade, alteração na sensibilidade à dor, transtorno de déficit de atenção, com repercussões futuras para a vida desse bebê (ANAND; SCALZO, 2000).

A manipulação excessiva e o ambiente da UTIN em geral, com sons altos e luminosidade, também alteram o padrão do sono, potencializando o estresse e aumentando os prejuízos no desenvolvimento do bebê. Se tivesse em contato com sua mãe esses prejuízos seriam minimizados, mas a privação do contato com a genitora na unidade neonatal, que é outro estressor, altera o eixo HHA que regula o cortisol e assim, favorece o aumento do estresse para o PT (FELDMAN; ROSENTHA; EIDELMAN, 2014).

Além dos estressores no ambiente da unidade neonatal serem prejudiciais ao PT, esses também afetam os pais.

1.4 Estresse e os pais do bebê pré-termo

Por se tratar de uma situação nova e inesperada, a separação abrupta faz com que os pais se sintam inseguros, pois de maneira inesperada e despreparada adentram para o mundo novo e desconhecido da unidade neonatal. Passam a viver em um ambiente estranho, com equipamentos assustadores e intensa movimentação das pessoas (SHAW et al., 2006). Além do estresse causado pela internação do seu bebê nesse ambiente ameaçador, os pais são afetados por estressores como a luminosidade, barulho e atividades no ambiente neonatal (TURNER et al., 2015).

Ter um bebê internado na unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN) é extremamente estressante (SHAW et al., 2009), pois essa unidade é comumente conhecida como o lugar onde as pessoas vão para morrer, e isso intensifica o estresse vivenciados pelos pais (TRONCHIN et al., 2005). Estudo realizado por Vanderbilt et al. (2009) avaliou a prevalência de sintomas de estresse pós-traumático agudo entre as mães de baixa renda, nos Estados Unidos, com filhos internados na UTIN (59 mães) comparados com mães de bebês na unidade neonatal comum (60 mães). Na primeira semana após o nascimento, todas as participantes foram avaliadas quanto ao estresse pós-traumático e depressão. As mães com bebês em UTIN mostraram maior prevalência de sintomas de estresse pós-traumático e depressão aguda (23%) do que aquelas com bebês na unidade neonatal comum (3%), além de apresentarem sintomas de gravidade para o transtorno de estresse agudo. Ter um recém-nascido na UTIN teve associação significativa com o número de sintomas agudos de estresse pós-traumático.

O nascimento prematuro é uma situação inesperada que provoca sentimentos de surpresa e confusão, levando os pais ao sofrimento por tentar entender o motivo do nascimento antes do tempo (GRIFFIN; WISHBA; KAVANAUGH, 1998), acrescido da dúvida se o bebê sobreviverá a essa fatalidade (TRONCHIN et al., 2005; FOWLIE; McHAFFIE, 2004).

Os pais ficam expostos a diferentes estressores por longo período durante toda a internação de seus filhos (TURAN; BASBAKKAL; OZBEK, 2008; TRONCHIN et al., 2005). O novo ambiente; aparência do bebê PT e a alteração do papel de mãe/pai estão entre os estressores vivenciado por eles (SOUZA, DUPAS e BALIEIRO, 2012). Além do ambiente desconhecido com sons, imagens e vivências assustadoras, citado anteriormente, os pais se chocam com o tamanho de seus filhos prematuros, pois o bebê real geralmente é totalmente diferente do que imaginado (TRONCHIN et al., 2005). O parto prematuro quebra o sonho do bebê perfeito idealizado durante a gestação, causando estresse e desapontamento nos pais (SHAW et al., 2006; RUIZ et al., 2005; TROCHIN et al., 2005; FOWLIE; McHAFFIE, 2004). Alguns chegam a elaborar o luto do filho prematuro vivo por causa da “morte” do bebê que imaginaram durante a gestação, levando-os a enfrentarem uma situação de crise que impõe grande esforço adaptativo, principalmente para as mães, por não estarem preparadas física e emocionalmente para esse evento (SCHAPPIN et al., 2013; TROCHIN et al., 2005). Com a morte do bebê idealizado, os pais geralmente se espantam com aparência de seus filhos, pois esses são muito diferentes do imaginado durante a gravidez. Geralmente os pais imaginam seus bebês “gordinhos e bonitinhos”, mas ao se depararem com bebês pequenos e muito distante da aparência dos bebês comumente vistos, se chocam, pois, muitos pais nem imaginavam existir bebês tão pequenos quanto os seus (TRONCHIN et al., 2005). Não se quer afirmar que os pais de bebê a termo não se estressam ao nascimento, mas apesar do nascimento a termo também ser considerado estressante, estudos mostram que os pais de PT apresentam estresse ainda maior do que esses (SCHAPPIN et al., 2013; LAU, 2003). Quanto menor o bebê maior o estresse dos pais de PT (SCHAPPIN et al., 2013; BHUTTA et al., 2002); estudos sugerem que essa diferença está relacionada com o tamanho e estado de saúde do bebê, pois quanto menor e mais imaturo, maior a chance de o bebê adoecer ou morrer e assim, maior o estresse dos pais (BHUTTA et al., 2002).

Não apenas o tamanho do bebê é fator estressor para os pais, mas também a aparência do PT. A observação de cortes ou lesões, a percepção de seus bebês estarem sentindo dor, tristeza e o fato do bebê mudar de cor (cianose ou palidez) são apontados como causadores de grande estresse nos pais (TURNER et al., 2015; SCHAPPIN et al., 2013).

O nascimento prematuro do bebê é um evento traumático devido ao abalo nas expectativas que os pais tinham sobre a paternidade/maternidade. Esse trauma não está apenas

relacionado com a aparência e as características infantis mas, principalmente, com a quebra das expectativas do papel de pais, incerteza prolongada e falhas no apoio institucional (LASIUK et al., 2013). Pesquisas destacam o fato dos pais não se reconhecerem e/ou não são reconhecidos como “pais” de seus bebês, na unidade neonatal, como um grande estressor (TURNER et al., 2015; SCHARPPIN et al., 2013; SOUZA; DUPAS; BALIEIRO, 2012; TURAN; BASBAKKAL; OZBEK, 2008). Por exemplo, o fato de não poder cuidar e alimentar o seu o bebê, ou seja, não poder assumir o seu papel de mãe é um fator de forte estresse para as genitoras, na unidade neonatal (TURNER et al., 2015). Estratégias centradas na família, como o Método Canguru, ajudam os pais a construir ou reconstruírem o “seu papel” como pais, e proporciona uma sensação moderadora em sua própria impotência (LASIUK et al., 2013) diante de seu filho PT internado na unidade neonatal. O Método Canguru permite que os pais cuidem e conheçam seus filhos, proporcionando também um ambiente seguro para o desenvolvimento do bebê nascido PT e/ou com baixo peso (BRASIL, 2013; CASTRAL et al., 2012; SCOCHI et al., 2003).

1.5 Método Canguru para redução do estresse

O Método Canguru foi desenvolvido na Colômbia por Reys Sanabria e Hector Martinez, objetivando melhora do vínculo mãe-bebê, melhor estabilidade térmica, melhor desenvolvimento do bebê, otimização da alta, redução dos custos no cuidado perinatal e redução da mortalidade (BRASIL, 2011). O contato pele a pele entre a mãe e filho era apenas um dos componentes do método, proposto por eles. O estímulo ao aleitamento materno, a alta planejada e precoce, o acompanhamento ambulatorial e a manutenção da posição canguru em casa também faziam parte do método mãe canguru preconizado pelos idealizadores (BRASIL, 2011).

Os alvos almejados pelos criadores do método têm sido confirmados em estudos ao longo dos anos. Pesquisas têm comprovado também que o cuidado canguru é propício para o crescimento e desenvolvimento saudável do bebê, contribui para a neuromaturação, melhora a maturidade autonômica e a resposta a dor, favorece a regulação ao estresse, regula o ritmo cardíaco e a termorregulação, produz estabilidade fisiológica, protege de infecções (ex. sepse), favorece o controle comportamental e desenvolve a interação mãe-bebê (FELDMAN; ROSENTHA; EIDELMAN, 2014).

Sendo a dor um dos maiores estressores na unidade neonatal para o bebê, é importante destacar que o Método Canguru tem papel importante na sua redução. A revisão sistemática realizada por Johnston et al. (2014) com 19 ensaios clínicos envolvendo 1594 PT demonstrou

que o contato pele a pele é eficaz em reduzir a dor em procedimentos dolorosos. Do mesmo modo, a pesquisa de revisão realizado por Warnock et al. (2010) que incluiu 12 estudos com recém-nascidos a termo e PT menores de 26 semanas, em contato pele a pele, que foram submetidos à punção de calcâneo ou a injeção intramuscular, também evidenciou a redução significativa das manifestações comportamentais de dor.

Devido ao fato de que os PT necessitam de subsídios para sua sobrevivência no meio extrauterino, salientamos a importância do Método Canguru em favorecer aspectos nutricionais. Lawn et al. (2010) analisaram 15 estudos, sendo nove ensaios clínicos e seis observacionais, com bebês com peso menor que 2.000g, e dentre as evidências, o estudo mostrou que o contato pele a pele produz resultados positivos na amamentação e ganho de peso do bebê. Ghavane et al. (2012) também comprovaram a melhora nos indicadores nutricionais em PT com peso menor 1.500g quando analisaram 140 PT, com 6-12 meses pós nascimento, num estudo randomizado comparando o cuidado canguru e o convencional em Madagascar.

A experiência de proporcionar contato pele a pele para seus recém-nascidos também traz benefícios aos pais, e esse resultado foi apresentado em uma revisão sistemática realizada por Andérzen-Carlsson, Lamy e Eriksson (2014) incluindo 29 estudos desenvolvidos em nove países, relatados por 401 mães e 94 pais. Os resultados mostraram o canguru como experiência reparadora, comovente, que traz ótimos sentimentos como felicidade, calma e paz. O canguru também tem o poder de amenizar emoções como os sentimentos de culpa e angústia por ter um filho PT e, também, produz encantamento por poder perceber o desenvolvimento de seus filhos. Além disso, o estudo mostrou que, para os pais, o contato pele a pele é gratificante, aguça o instinto natural de proteção ao bebê, é uma experiência de aprendizagem e favorece a devolução do papel de pais; melhora a autoestima; fortalece os laços e, enfim, intensifica o papel de família (ANDERZÉN-CARLSSON; LAMY; ERIKSSON 2014).

Além de ser positivo para a díade mãe-bebê, o canguru também favorece o sistema de saúde com diminuição da carga de trabalho, disponibilizando esse recurso humano para o cuidado de bebês mais graves (FELDMAN; ROSENTHA; EIDELMAN, 2014).

Estudos apontam também que o Método Canguru reduz o tempo de internação (FELDMAN; ROSENTHA; EIDELMAN, 2014; LAWN et al., 2010) e os custos da internação (ENTRINGER et al., 2013). Pesquisadores do Ministério da Saúde brasileiro realizaram uma análise dos custos relativos na unidade de cuidados intermediários neonatais canguru (UCINca), com recém-nascidos clinicamente estáveis e compararam com bebês com os alocados em unidade de cuidado intensivo convencional (UCINco). O estudo contou com amostra de seis maternidades municipais do Rio de Janeiro. Os resultados demonstraram que o custo diário da

UCINca foi de R\$353,53 e na UCINco de R\$394,22. O custo total da UCINca foi de R\$ 5.710.281,66 e na UCINco foi de R\$ 7.119.865,61. Houve diferença significativa entre os grupos, sendo gasto 25% menos na UCINca em comparação com a UCINco (ENTRINGER et al., 2013).

Uma importante implicação do Método Canguru com fortes evidências científicas está associada a redução da morbi-mortalidade neonatal. Em pesquisa realizada por Lawn et al. (2010), no período de 1970 a 2009, com 524 PT <2.000g, evidenciaram que o Método Canguru reduz significativamente a mortalidade neonatal. Dos 15 estudos analisados, foi feita meta análise com três ensaios clínicos e três estudos observacionais. O estudo mostrou significativa redução na mortalidade neonatal dos PT que vivenciaram o Método Canguru, sendo o risco relativo (RR) = 0,49, 95% IC 0,29-0,82 para os ensaios clínicos e RR= 0,68, 95% IC 0,58-0,79 para o estudo observacional. O estudo também avaliou a morbidade dos PT em cinco ensaios clínicos e demonstrou que essa foi menor no grupo canguru (RR= 0,34, 95% IC 0,17-0,65). O Método Canguru é altamente eficaz na redução da morbidade grave, principalmente as morbidades infecciosas (LAWN et al., 2010). Esse resultado positivo do Método Canguru para redução da morbidade e mortalidade também foi confirmado na meta análise realizada por Boundy et al. (2016). O estudo incluiu 124 estudos, sendo que 110 (89%) foram publicados entre os anos de 2000 a 2014 e os demais foram publicados entre 1988 a 1999; a maioria deles (68%) foi realizado com PT, 58% com bebês baixo peso (<2500g) e 19% muito baixo peso (≤ 1500 g). Comparando os bebês baixo peso, os bebês que vivenciaram o canguru tiveram 36% menor índice de mortalidade que aqueles com tratamento convencional (RR 0,64; 95%, IC 0,46 0,89). O estudo também mostrou redução em morbidades como infecções (sepses), hipoglicemia e hipotermia (BOUNDY et al., 2016). A revisão sistemática realizada por Conde-Aguedelo e Diaz-Rossello (2014) que incluiu 18 ensaios clínicos e 2751 recém-nascidos com peso <2500g, também comprovou que o Método Canguru reduz a mortalidade em bebês maiores.

Apesar das evidências de que o canguru reduz a morbimortalidade neonatal entre PT, ele permanece indisponível na maioria dos países de baixa renda. As barreiras encontradas na literatura são: desconhecimento da equipe sobre o método, descrédito nos benefícios, falta de informação necessária para implantação, falta de recursos humanos e de política governamental em vários países (ENGMANN et al., 2013). Diante da resistência de alguns países e as inúmeras evidências publicadas, a reunião da Convenção Mundial relacionada à saúde da criança que ocorreu em 2013, na Turquia, discutiu meios de acelerar a implementação do Cuidado Canguru em nível global, pois essa é uma forma de reduzir a morbimortalidade em PT,

podendo evitar cerca de 450 mil mortes a cada ano se alcançada uma cobertura universal do método (ENGMANN et al., 2013).

No Brasil, em 1997, no Instituto Integral Professor Fernando Figueira, antes chamado de Instituto Materno-Infantil de Pernambuco (IMIP), foi o precursor do Método Canguru na unidade neonatal, porém a técnica de contato pele a pele, já havia sido utilizada previamente no alojamento conjunto do Hospital Guilherme Alves, em Santos, no ano de 1991. Em 1999 a Área Técnica de Saúde da Criança elaborou o documento que foi base da Norma de Atenção Humanizada ao Recém-Nascido de Baixo Peso – Método Canguru, lançada nesse mesmo ano pelo Ministério da Saúde do Brasil. Em 2000 foi publicada a Portaria n. 693 aprovando o método, como política nacional e, em 2007, essa foi atualizada com a publicação da Portaria n. 1.683 (BRASIL, 2011).

“O Método canguru é uma intervenção biopsicossocial individualizada que inclui o bebê e família de forma a incentivar o contato pele a pele e a humanização em diferentes aspectos do cuidado neonatal” (BRASIL, 2015, p. 41).

Criado a partir dos princípios propostos por Sanabria e Martinez, o programa Método Canguru brasileiro abrange três etapas de cuidado, sendo que, as diferentes etapas favorecem o estabelecimento da amamentação, formação do vínculo mãe-bebê, inserção da mãe no cuidado e garantia do seguimento ambulatorial após alta (BRASIL, 2015; BRASIL, 2013; LAWN et al., 2010).

A primeira etapa inicia no pré-natal e segue com atendimento na UTIN e/ou na UCINco. Nessa fase os pais são acolhidos e incentivados a permanecer na unidade, prestando os cuidados possíveis aos seus filhos. A posição canguru é incentivada conforme a estabilidade dos bebês e a disponibilidade dos pais. O PT é retirado da incubadora, despido e colocado entre as mamas da mãe. Ele poderá estar conectado ao monitor cardiorrespiratório, se for necessário. Esse procedimento poderá ser feito no local onde o bebê está internado. Na segunda etapa, a mãe e o bebê permanecem na UCINca. O bebê é mantido na posição canguru pelo maior tempo possível (tempo que for prazeroso para ambos). A incubadora ou berço aquecido deve permanecer no local, para caso precise ser utilizada. Este período funcionará como um momento de aprendizado para a mãe cuidar de seu filho e observar seus sinais de risco após a alta hospitalar (BRASIL, 2015; BRASIL 2013). Salienta-se que a mãe não substitui a equipe de saúde e sim é “empoderada” para cuidar do seu filho. A terceira etapa ocorre extra-hospitalar, o bebê recebe alta do hospital, mas não recebe alta do Método Canguru e a posição canguru deve ser mantida pelo maior tempo possível. Nessa etapa o bebê e a família são acompanhados no ambulatório e unidade básica de saúde (cuidado compartilhado) até atingir o peso de 2.500g

(BRASIL, 2015) e os demais critérios de alta. À equipe cabe o papel de orientar, promover suporte emocional e encorajar as famílias em todas as fases do método. As atividades estão descritas no Quadro 2 (BRASIL, 2015, p. 58-60).

Para melhor esclarecimento, é essencial diferenciar o contato pele a pele, geralmente encontrado em trabalhos disponíveis na literatura, e o Método Canguru (Norma do Ministério da Saúde), utilizado na presente pesquisa. O contato pele a pele ou cuidado canguru ou método mãe canguru ou Método Canguru tem o mesmo significado que a posição canguru (Figura 3). Consiste em colocar o bebê levemente vestido (com fralda, podendo incluir gorro, luvas e meias), em decúbito prono na posição vertical, no peito nu da mãe ou pai (BRASIL, 2013). No Método Canguru, a posição canguru é apenas um dos itens do programa. Ela está presente em todas as etapas e não dispensa a realização das demais ações das três etapas. O contato pele a pele pode ser realizado por curtos períodos de tempo (BALEY; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2015), ou seja, geralmente com tempo determinado, porém, a posição canguru do Método Canguru é estimulada e realizada pelo maior tempo possível, sem limitação, enquanto for prazeroso para ambos (BRASIL, 2015).

Figura 3 - Posição Canguru

Fonte: Foto extraída do Manual Técnico do Método Canguru – Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_canguru_manual_tecnico_2ed.pdf. Consultado em 29/12/16

Quadro 2 - Cuidados desempenhados nas três etapas do Método Canguru no Brasil

1 - PRIMEIRA ETAPA	2 - SEGUNDA ETAPA	3 - TERCEIRA ETAPA
<p><i>1ª etapa: Período que se inicia no pré-natal da gestação de alto-risco seguido da internação do recém-nascido na Unidade Neonatal. Nessa etapa, os procedimentos deverão seguir os seguintes cuidados especiais:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Acolher os pais e a família na Unidade Neonatal. – Esclarecer sobre as condições de saúde do recém-nascido e sobre os cuidados dispensados, sobre a equipe, as rotinas e o funcionamento da Unidade Neonatal. – Estimular o livre e precoce acesso dos pais à Unidade Neonatal, sem restrições de horário. – Propiciar sempre que possível o contato com o bebê. – Garantir que a primeira visita dos pais seja acompanhada pela equipe de profissionais. – Oferecer suporte para a amamentação. – Estimular a participação do pai em todas as atividades desenvolvidas na Unidade – Assegurar a atuação dos pais e da família como importantes moduladores para o bem-estar do bebê. – Comunicar aos pais as peculiaridades do seu bebê e demonstrar continuamente as suas competências. – Garantir à puérpera a permanência na unidade hospitalar pelo menos nos primeiros cinco dias, oferecendo o suporte assistencial necessário. – Diminuir os níveis de estímulos ambientais adversos da unidade neonatal, tais como odores, luzes e ruídos. – Adequar o cuidar de acordo com as necessidades individuais comunicadas pelo bebê. – Garantir ao bebê medidas de proteção do estresse e da dor. – Utilizar o posicionamento adequado do bebê, propiciando maior conforto, organização e melhor padrão de sono, favorecendo assim o desenvolvimento. – Assegurar a permanência da puérpera, durante a primeira etapa: <p>Auxílio transporte, para a vinda diária à unidade pelos Estados e/ou Municípios – Refeições durante a permanência na unidade pelos Estados e/ou Municípios – Assento (Cadeira) adequado para a permanência ao lado de seu bebê e espaço que permita o seu descanso. – Atividades complementares que contribuam para melhor ambientação, desenvolvidas pela equipe e voluntários.</p>	<p><i>2ª etapa: Na segunda etapa o bebê permanece de maneira contínua com sua mãe e a posição canguru será realizada pelo maior tempo possível. Esse período funcionará como um “estágio” pré-alta hospitalar.</i></p> <p>2.1 São critérios de elegibilidade para a permanência nessa etapa:</p> <p>2.1.2 Do bebê – estabilidade clínica – nutrição enteral plena (peito, sonda gástrica ou copo) – peso mínimo de 1.250g.</p> <p>2.1.2 Da mãe – desejo de participar, disponibilidade de tempo e de rede social de apoio – consenso entre mãe, familiares e profissionais da saúde – capacidade de reconhecer os sinais de estresse e as situações de risco do recém-nascido. – conhecimento e habilidade para manejar o bebê em posição canguru. 2.2 Permitir o afastamento temporário da mãe de acordo com suas necessidades. 2.3 Acompanhar a evolução clínica e o ganho de peso diário. 2.4 Cada serviço deverá utilizar rotinas nutricionais de acordo com as evidências científicas atuais. 2.5 A utilização de medicações orais, intramusculares ou endovenosas intermitentes não contraindicam a permanência nessa etapa. 2.6 São critérios para a alta hospitalar com transferência para a 3ª etapa: – mãe segura, psicologicamente motivada, bem orientada e familiares conscientes quanto ao cuidado domiciliar do bebê – compromisso materno e familiar para a realização da posição pelo maior tempo possível – peso mínimo de 1.600g – ganho de peso adequado nos três dias que antecederem a alta – sucção exclusiva ao peito ou, em situações especiais, mãe e família habilitados a realizar a complementação – assegurar acompanhamento ambulatorial até o peso de 2500g – a primeira consulta deverá ser realizada até 48 horas da alta e as demais no mínimo uma vez por semana – garantir atendimento na unidade hospitalar de origem, a qualquer momento, até a alta da terceira etapa. </p>	<p><i>3ª etapa: Esta etapa se caracteriza pelo acompanhamento da criança e da família no ambulatório e/ou no domicílio até atingir o peso de 2.500g, dando continuidade à abordagem biopsicossocial.</i></p> <p>3.1 Ambulatório de acompanhamento São atribuições do ambulatório de acompanhamento: – realizar exame físico completo da criança tomando como referências básicas o grau de desenvolvimento, o ganho de peso, o comprimento e o perímetro cefálico, levando-se em conta a idade gestacional corrigida – avaliar o equilíbrio psicoafetivo entre a criança e a família e oferecer o devido suporte – Apoiar a manutenção de rede social de apoio – corrigir as situações de risco, como ganho inadequado de peso, sinais de refluxo, infecção e apneias – orientar e acompanhar tratamentos especializados – orientar esquema adequado de imunizações</p> <p>3.2 O seguimento ambulatorial deve apresentar as seguintes características: – ser realizado por médico e/ou enfermeiro, que, de preferência, tenha acompanhado o bebê e a família nas etapas anteriores – o atendimento, quando necessário deverá envolver outros membros da equipe interdisciplinar – ter agenda aberta, permitindo retorno não agendado, caso o bebê necessite – o tempo de permanência em posição canguru será determinado individualmente por cada diáde – após o peso de 2.500g, o seguimento ambulatorial deverá seguir as normas de crescimento e desenvolvimento do Ministério da Saúde</p>

Fonte: Brasil, 2015 p.58-60

1.6 Como medir o estresse

Nem todos os indivíduos terão as mesmas respostas quando expostos ao estresse e, assim, a análise do estresse deve ser feita de forma singular levando em conta questões particulares.

A avaliação do estresse pode ser feita por meio de instrumentos de medida (medidas psicométricas) e/ou através de medidas biológicas: saliva, sangue, urina, cabelo e unhas (MAIDANA; BRUNO; MESCH, 2013).

1.6.1 Medidas psicométricas de estresse

Para analisar o estresse de gestantes a literatura especializada expõe a Escala de Estresse Percebido (*Perceived Stress Scale* – PSS).

A PSS (ANEXO A) foi desenvolvida por Cohen e colaboradores, em 1983, para medir o estresse percebido, ou seja, como indivíduos percebem situações estressantes (COHEN; KAMARCK; MERMELSTEIN, 1983), sendo validada para o Brasil por Luft et al. (2007). A versão PSS-14 possui 14 itens classificados em uma escala de *Likert* variando de 0 a 4 pontos (0 = nunca, 1 = quase nunca, 2 = de vez em quando/as vezes, 3 = muitas vezes/quase sempre e 4 = muito frequentemente/sempre). A pontuação dos itens positivos é pontualmente invertida (4 = nunca, 3 = quase nunca, 2 = de vez em quando/as vezes, 1 = muitas vezes/quase sempre, 0 = muito frequentemente/sempre). A pontuação total pode ser obtida pela somatória dos escores dos itens, seguindo as orientações estabelecidas pelos autores da escala original, sendo que o total de pontos pode variar de 0 a 56. Quanto maior a pontuação, maior o nível de estresse. Os autores fizeram uma versão reduzida dessa escala com 10 itens a PSS-10, com a pontuação máxima de 40, seguindo o mesmo método que a escala de 14 itens, onde quanto maior a pontuação, maior o nível de estresse (LESAGE et al., 2012; LUFT et al., 2007).

A PSS é uma escala unidimensional que por meio de entrevista ou auto relato avalia a percepção de estresse, baseada no modelo transacional de um dos precursores de estudos de estresse. Ela avalia a resposta emocional cognitivamente mediada a um evento objetivo, como uma lista de eventos estressantes. É um questionário curto, de fácil aplicação e que foi validado em populações obstétricas. A escala conta com versão 10 e 14 itens. Essas escalas foram analisadas quanto às propriedades psicométricas por Lee (2012) e a PSS-10 mostrou-se

superior tanto em confiabilidade, quanto em validade e, por isso, recomendada para uso na prática e pesquisa (LEE, 2012). Em uma revisão realizada por Nast et al. (2013), foram identificadas 29 publicações avaliando aborrecimentos e distúrbios diários de forma retrospectiva durante algumas semanas, avaliando o estresse durante a gestação. A PSS foi identificada como ótimo instrumento, com excelente confiabilidade para amostra com gestantes e alta validade em participantes não grávidas (LUFT et al., 2007), e tem sido usada em vários países (LESAGE; BERJOT; DESCHAMPS, 2012). O resultado da PSS avalia o estresse, retrospectivamente, quatro e oito semanas antes da data da administração (KAIRA et al., 2007; COHEN; WILLIAMSON, 1988).

Para analisar o estresse das mães a escala de PSS:NICU (*Parental Stress Scale: Neonatal Intensive Care Unit*) foi escolhida. É um dos instrumentos mais utilizados para avaliar estresse de pais na unidade neonatal (SCHARPPIN et al., 2013), dimensionando os agentes estressores referentes ao ambiente da UTIN (ANEXO B). A estrutura da PSS:NICU foi baseada principalmente em estressores físicos e psicossociais obtidos no ambiente que apõem ou ultrapassam os limites do enfrentamento. Ela mede o estresse na UTIN relacionada ao ambiente, a aparência e comportamento do bebê e as mudanças no papel de pais de bebês doentes, internados na unidade neonatal (SCHARPPIN et al., 2013). É composta de 26 itens distribuídos em três subescalas: “sons e imagens”, “aparência e comportamento do bebê” e “alteração do papel dos pais”. A pontuação do estresse é aferida por uma escala tipo *Likert* que vai do 1 a 5, sendo que 1 significa não estressante e 5 extremamente estressante. Cada item na PSS:NICU questiona o pai ou a mãe se eles já passaram por uma situação específica, por exemplo, ver o bebê entubado ou perto de equipamento médico, ver a cor do filho modificar repentinamente ou ver o bebê parar de respirar. Então é solicitado àqueles que já passaram por isso a classificarem seu estresse em uma escala de *Likert* com pontuação de 1 a 5 (não estressante a extremamente estressante). A avaliação do estresse é feita através de três medidas para estabelecimento do nível de estresse: métrica 1, métrica 2 e métrica 3 e, para o cálculo dessas métricas, é utilizado a média estatística dos escores alcançados nas respostas dos pais. A medida ou a métrica 1 fornece o nível de estresse em que a situação ocorre ou Nível de Ocorrência de Estresse, no qual somente aqueles que relataram terem passado pela experiência, ou seja, escore de 2-5 receberam uma nota no item; os que relataram não terem experimentado são codificados como ausentes, recebendo nota zero. A métrica 2 calcula o nível geral de estresse do ambiente. Nessa medida os pais que não referiram ter tido estresse em um dos itens recebem nota 1, indicando que não houve estresse na situação. Para efeito de cálculo e obtenção da média em cada escala utiliza-se o número de itens na escala (MILES;

FUNK; CARLSON, 1993). Essa escala foi validada para o Brasil por esta pesquisadora (SOUZA; DUPAS; BALIEIRO, 2012)). Atenta-se para o fato que a escala inicialmente desenvolvida por Miles, Funk e Carlson, contava com quatro subescalas, porém foram validadas apenas três delas devido a baixa ocorrência de estresse identificado durante o processo de validação, sendo retirada a subescala Comunicação com Equipe e alguns itens das demais subescalas (MILES; FUNK; CARLSON, 1993). A PSS:NICU tem sido utilizada em vários estudos em diferentes países (SCHARPPIN et al., 2013), porém algumas publicações têm utilizado a versão de quatro subescalas. Conforme consulta com a autora Margarete Miles, após a validação da escala composta de três subescalas com 26 itens em 1993 (MILES; FUNK; CARLSON, 1993), não é mais recomendado o uso da PSS:NICU com quatro subescalas.

Em busca realizada, não se encontrou escalas psicométricas específicas para analisar o estresse de PT, por isso utilizamos somente a medida biológica (cortisol e desidoepiandrosterona), descrita a seguir.

1.6.2 Medidas biológicas do estresse

O método biológico disponível para medir o estresse, encontrado na literatura, é a desidroepiandrosterona (DHEA) que tem sido utilizada em estudos recentes e o cortisol, que é considerado um biomarcador padrão.

O cortisol é um glicocorticóide que é secretado de forma pulsátil no cotidiano seguindo o ciclo circadiano, sendo níveis elevados pela manhã, diminuindo gradualmente até a meia-noite, porém, por ocasião do estresse há uma explosão secretora. Em adultos, as situações estressantes alteram o ciclo e a forma pulsátil que o cortisol é secretado, podendo chegar ao seu nível máximo em 20-40 minutos após ocorrência do estresse e, depois disso, retorna para seus níveis basais quando a situação estressante é resolvida (HUNTER; MINNIS; WILSON, 2011). Em crianças, apesar de não seguirem um padrão de secreção bem estabelecido como no indivíduo adulto, o pico de cortisol também é atingido 20-40 minutos após agente estressor ser acionado (HUNTER; MINNIS; WILSON, 2011; GOLDBERG et al., 2003). O sistema gerador de ritmo circadiano do cortisol encontra-se desenvolvido entre a 31^a. e 34^a. semanas de gestação e embora a secreção deste esteroide seja detectada desde a primeira semana de vida, regulada pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, evidências apontam o aparecimento de um ritmo circadiano do cortisol, a partir da oitava a décima semana pós-natal. No PT o estabelecimento desse ritmo também ocorre em torno de oito

semanas após o nascimento, agindo de forma semelhante à dos bebês a termo, sob a influência de sincronizadores internos e externos (ANTONINI; JORGE; MOREIRA, 2000).

A desidroepiandrosterona (DHEA) também é um hormônio que é secretado em resposta à situação de estresse controlada pelo eixo HHA (IZAWA et al., 2008). Assim, como o cortisol, a DHEA segue o ritmo circadiano, sendo a secreção maior de manhã, diminuindo durante o dia e secreção mínima à noite, porém seu diferencial é que durante o sono profundo o DHEA apresenta elevação abrupta. A concentração de ambos oscila em paralelo, mas o DHEA não sofre o controle de feedback do eixo HHA (BEISHUIZEN; THIJS; VERMES, 2002). Estudos mostram que o efeito antagonista da DHEA, em relação aos glicocorticoides, protege o cérebro do estresse oxidativo, atuando como neuroprotetores relacionado à doenças degenerativas (CHARALAMPOPOULOS et al., 2008). O nível deste hormônio têm sido relacionado ao bem estar psicológico, e assim, alguns autores sugerem que, quanto maior o nível de DHEA melhor o estado psicológico da pessoa e, quanto menor o nível de DHEA, pior o estado psicológico da pessoa (VAN NIEKERK; HUPPERT; HERBERT, 2001), excluindo-se a possibilidade de morbididades que interferem na produção desse esteroide. O resumo da síntese de hormônios esteroides está apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Resumo da síntese de hormônios esteroides

Fonte:

http://www2.dq.fct.unl.pt/cafeiras/qpn1/proj/Pregnenolona/Publica%C3%A7%C3%A3o1_ficheiros/page0002.

Para medir o estresse agudo os métodos mais comuns são cortisol salivar (VANAELST et al., 2012), plasmático (sangue) e urinário (KAIRA et al., 2007). A saliva e o sangue refletem o nível de estresse momentâneo e a urina mostra dados das últimas 24 horas (STALDER; KIRSCHBAUM, 2012). Porém essas medidas não são utilizadas para avaliar o estresse crônico. A análise do estresse crônico é algo contemporâneo, sendo o cabelo (SILVA; EUNUMO, 2014) e a unha os novos métodos utilizados para este fim (MAIDANA; BRUNO; MESCH, 2013; WARNOCK et al., 2010).

Cirimele et al. (2000) foram os precursores nas investigações do cortisol no cabelo para análise do estresse crônico. Os pesquisadores usaram método de cromatografia líquida de alto desempenho com espectrometria de massa. Esse processo detectou e quantificou dez esteroides em humanos e mostrou que o ensaio é capaz de detectar cerca de 70% do cortisol infundidos na matriz do cabelo, com apenas baixa variação em testes repetidos (CIRIMELE et al., 2000). Apesar de o cabelo ser um marcador biológico adequado para o estresse crônico, o acúmulo de substâncias, o desgaste, a exposição a um meio ambiente quente, a lavagem com água quente e a exposição aos raios ultravioletas (LI et al., 2012) são fatores de grande limitação para sua utilização.

O mais recente e eficaz método usado para avaliar o estresse crônico é a análise do cortisol nas unhas (SILVA; EUNUMO, 2014; MAIDANA; BRUNO; MESCH, 2013, RUSSEL et al., 2012; WARNOCK et al., 2010). Estudos mostram que esta é a melhor maneira de analisar o estresse crônico (Quadro 3) porque é menos invasiva, de fácil coleta, não sofre alterações de nível durante a coleta, não requer complexa armazenagem e não necessita de medidas repetidas (SILVA; EUNUMO, 2014; LI et al., 2012; RUSSEL et al., 2012; BEN KHELIL et al., 2011; WARNOCK et al., 2010).

Apesar de ser uma nova medida, a unha é comprovadamente comparável com as medidas conhecidas. Izawa et al. (2015) investigaram a associação entre cortisol nas unhas, com cortisol salivar (medida repetida) e cortisol do cabelo em estudo de coorte retrospectivo. Identificaram associação moderada entre o nível de cortisol na amostra de saliva, de cabelo e de unhas, concluindo que a unha pode ser usada como um eficaz biomarcador do cortisol no modo retrospectivo (IZAWA et al., 2015). Tanto o cabelo como a unha têm o mesmo princípio de análise para o nível de estresse crônico e ambos têm estrutura anatômica semelhante, o que faz com que sua estrutura seja comparável. O bulbo piloso é considerado análogo à matriz e o córtex intermédio da unha, porém, a análise do cabelo pode ser afetada pelo uso de diferentes produtos (como os utilizados para colorir/tingir os cabelos); a exposição em água quente ou a temperaturas quentes (LI et al., 2012). Esse último pode ser fator limitante para estudos utilizando cabelo em um país clima quente como o Brasil.

Quadro 3 - Métodos de análise do cortisol

MATERIAL	SANGUE	URINA	SALIVA	CABELO	UNHAS
Coleta invasiva	Alta	Moderada	Baixa	Baixa	Não
Número de coletas	Repetidas	Repetidas	Repetidas	Única	Única
Exigências de armazenamento	Refrigeração freezer	Refrigeração freezer	Refrigeração freezer	Ar ambiente	Ar ambiente
Transporte	Complicado/ Congelado	Complicado/ Congelado	Complicado/ Congelado	Fácil Ar ambiente	Fácil Ar ambiente
Tempo de secreção do cortisol avaliado	Agudo Instantâneo	Agudo 12 a 24 horas de exposição ao estresse	Agudo Instantâneo	Crônico Meses (depende do tamanho do cabelo)	Crônico Meses
Limitações (fatores alteração/redução cortisol)	Coleta altamente invasiva. Grande chance de alterar (aumentar o nível de cortisol) no momento da coleta	Coleta pode (possivelmente) alterar o nível de cortisol	Coleta pode (possivelmente) alterar o nível de cortisol	Uso de tintas, acúmulo de substâncias; desgaste, exposição a ambiente quente, lavagem com água quente, exposição a raios ultravioleta, alteram resultado	Crescimento das unhas depende de fatores comportamentais e ambientais. Difícil sistematizar coleta

Fonte: Li et al. (2012); Warnock et al. (2010); Ben Khelil et al. (2011); baseada na proposta de Russel et al. (2012) e Silva; Eunumo (2014)

A limitação para utilização das unhas apontada por Warnock et al. (2010) é que o crescimento das unhas depende de fatores comportamentais e ambientais (nas temperaturas baixas há crescimento mais lento das unhas). Para estudos brasileiros os fatores ambientais não são problemas, pois, por ser um país tropical, as altas temperaturas persistem na maior parte do ano e isso favorece o crescimento das unhas (FRENZ; FRITSCH; HOCH, 2000 in GRUNDZÜGE, 2014).

As quatro principais estruturas das unhas são: matriz, raiz, corpo e bordo livre (Figura 5). Elas crescem em comprimento e espessura cerca de 0,1mm e 0,027/dia, respectivamente (PALMERI et al., 2000). Em média demora três meses para crescer da matriz até a borda livre (DE BERKER; ANDRE; BARAN, 2007). As unhas da mão crescem cerca de três vezes mais rápido do que as unhas dos dedos dos pés. O dedo médio da mão dominante cresce mais rápido num total de 3-4mm por mês. Diferentes fatores afetam a formação das unhas. Por exemplo, para o crescimento: calor e aumento da atividade física;

para o retardamento do crescimento: frio, alta altitude, inatividade física (sedentarismo) e idade (FRENZ; FRITSCH; HOCH, 2000 in GRUNDZÜGE, 2014).

Figura 5 - Partes da unha - inteira e corte sagital

Foto extraída do site: <http://www.auladeanatomia.com/novosite/sistemas/sistema-tegumentar/>
<http://glauciapodologa.blogspot.com.br/2011/04/anatomia-das-laminas-ungueaisunhas.html>
https://www.google.com.br/search?q=fingernail+physiology&biw=1366&bih=662&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjZj_Py84rRAhVBiZAKHW6OCdwQ_AUIBigB#imgsrc=otk3MKLOEQYnIM%3A Acesso em 23/12/2106

Durante a gravidez há um aumento do metabolismo, o que acelera o crescimento das unhas (DE DONCKER; PIERARD, 1994). O uso de algumas medicações como, agentes antifúngicos, na dose mais elevada, também induz o crescimento mais rápido da unha (FRENZ; FRITSCH; HOCH, 2000, in GRUNDZÜGE, 2014).

A dehidroepiandrosterona (DHEA) também pode ser medida nas unhas de adultos e crianças para avaliar o estresse crônico de forma retrospectiva, pois, assim como o cortisol, ela é controlada pelo eixo HHA que é secretada em resposta a situações de estresse (IZAWA et al., 2015; TEGETHOFF et al., 2011; WARNOCK et al., 2010). O estudo realizado por Warnock et al. (2010) utilizou a análise de ambos para avaliar estresse crônico de estudantes de uma universidade no Canadá. Foram coletadas unhas de 33 estudantes universitários, durante dois períodos diferentes no semestre escolar, momentos esses que os alunos poderiam estar vivenciando diferentes níveis de estresse. O estudo evidenciou que análise do cortisol e da DHEA nas unhas é um método eficaz para avaliar o estresse retrospectivo (WARNOCK et al., 2010).

Análise do estresse crônico em gestantes, mães e bebês

Estudos têm apontado para a utilização de duas diferentes metodologias para a análise do estresse crônico (SILVA; ENUMO, 2014; MAIDANA; BRUNO; MESCH, 2013), porém há deficiências na publicação de pesquisas na população de interesse do presente estudo (gestantes, mães e bebês PT) utilizando as unhas, que é o método apontado como mais eficaz por ser menos invasivo, de fácil coleta, não sofrer alterações na coleta e fácil armazenagem (SILVA; ENUMO, 2014; LI et al., 2012; RUSSEL et al., 2012; BEN KHELIL et al., 2011; WARNOCK et al., 2010).

O estresse crônico de fetos, no final da gravidez, foi avaliado através da análise da DHEA em unhas de bebês, em um estudo de coorte, que forneceu evidências sobre estresse retrospectivo utilizando unhas de 43 bebês com menos de 3 meses de idade. O estudo mostrou que o nível de DHEA pode representar um biomarcador não invasivo importante para avaliar o estresse intra-útero e, além disso, o estudo mostrou que é possível fazer essa análise em pequena quantidade de unha (TOGETHOFF et al., 2011).

Dada a relevância do assunto e, diante do exposto, tem-se como objetivo de estudo avaliar o estresse de gestantes, mães e bebês PT, internados na unidade neonatal, através da análise do cortisol e desidroepiandrosterona nas unhas para investigação do estresse crônico de forma retrospectiva, bem como a implicação do Método Canguru na redução desse estresse.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito do Método Canguru na redução do estresse psicológico materno através de escalas psicométricas e o estresse biológico crônico através dos níveis de cortisol e desidroepiandrosterona em unhas de mães e bebês pré-termo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o estresse biológico crônico retrospectivo ao último trimestre de gestação utilizando o exame do cortisol, desidroepiandrosterona e razão Cort:DHEA em unhas de mães de bebês PT.
- Avaliar o estresse biológico crônico materno retrospectivo referente ao puerpério, que inclui o período de internação do filho PT na unidade neonatal, utilizando o exame do cortisol, desidroepiandrosterona e razão Cort:DHEA em unhas.
- Comparar o estresse crônico materno retrospectivo ao terceiro trimestre de gestação e o puerpério com vivência na unidade neonatal, utilizando o exame do cortisol, desidroepiandrosterona e razão Cort:DHEA em unhas.
- Comparar os níveis desses esteroides na gestação e puerpério, em unhas de mães submetidas ao Método canguru com aquelas que receberam o cuidado convencional.
- Avaliar e comparar o estresse psicológico materno através da escala PSS-10 retrospectivo a gestação com aquele referente ao puerpério, que inclui a vivência da hospitalização do filho PT na unidade neonatal.
- Comparar estresse psicológico referente a gestação e puerpério, que inclui a vivência de internação do filho PT na unidade neonatal, em mães submetidas ao Método Canguru com aquelas que receberam o cuidado convencional.
- Avaliar o estresse psicológico materno através da escala PSS:NICU na admissão e alta do filho PT na unidade neonatal.
- Comparar o estresse psicológico materno através da escala PSS:NICU na admissão e alta do PT na unidade neonatal em mães submetidas ao Método Canguru com aquelas que receberam o cuidado convencional.
- Avaliar o estresse biológico crônico de bebês PT retrospectivo aos três meses pós nascimento prematuro, referente principalmente ao período que esse vivenciou a internação na unidade neonatal, utilizando a exame do cortisol, desidroepiandrosterona e razão Cort:DHEA em unhas.

- Comparar os níveis desses esteroides em unhas de PT submetidos ao Método Canguru com aqueles que receberam o cuidado convencional.
- Verificar associação entre os níveis de cortisol, desidroepiandrosterona e razão Cort:DHEA maternos na gestação com a escala de medida PSS-10 e no período puerperal com a escala de medida e PSS:NICU.
- Verificar associação entre esteróides maternos no puerpério, que inclui a vivência da internação, com os níveis esteroides do bebê PT na unidade neonatal.

3 Material e Métodos

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de estudo descritivo comparativo prospectivo. O descritivo apresenta em detalhes o fenômeno de interesse, mostrando a situação como ocorre no dia-a-dia, permitindo a identificação de diferenças ocorridas na prática atual, sem a manipulação de variáveis (SCHIMIDT; BROWN, 2012). O comparativo descreve os fenômenos como ocorrem em dois ou mais grupos. O estudo prospectivo acompanha os participantes partindo de um pressuposto e prossegue até o efeito presumido (POLIT et al., 2011). No presente estudo descreveu-se a utilização ou não do Método Canguru e comparou-se a implicação desse Método em reduzir o estresse de mães e seus bebês prematuros, assistidos em unidade neonatal de forma prospectiva.

3.2 Local de estudo

Os locais de estudo foram três hospitais-escola de referência terciária no atendimento à gestação e ao bebê de alto risco, sendo um hospital intervenção, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), e dois hospitais controle, Hospital Estadual de Sumaré (HES) e a Maternidade de Campinas. Com a finalidade de alcançar o número de participantes necessário para a pesquisa foram utilizados dois hospitais controle, com as mesmas características de atendimento.

O Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP foi escolhido por ter o Método Canguru implantado sistematicamente, sendo o primeiro hospital de referência nacional para atenção humanizada ao recém-nascido de baixo peso – Método Canguru, preconizado pelo Ministério da Saúde segundo Portaria n. 930 (BRASIL, 2013). Possui todas as fases do Método implantado. “A Unidade Neonatal do IMIP é formada por: Alojamento Conjunto, Unidade de Prematuros – Método Canguru, Berçário Interno e Berçário Externo de risco. A Unidade Neonatal de Alto-Risco é composta por 50 leitos, sendo 18 de cuidados intensivos e 32 semi-intensivos. A Unidade Neonatal funciona numa área física de 500m², oferecendo recursos técnicos e humanos para um atendimento adequado. O Berçário Externo de Risco tem 16 leitos, sendo 08 de unidade intermediária, o Berçário Externo de Risco recebe recém-nascidos de todo o Estado de Pernambuco. Referência para gestações de alto risco, o IMIP recebe um número elevado de recém-nascidos prematuros e de baixo peso. Anualmente são atendidos cerca de 2.000 bebês, que apresentam patologias complexas e, em alguns casos, com necessidade de cirurgia. Conta com sistemática avaliação auditiva / oftalmológica, da

motricidade oral, fisioterapia motora, terapia ocupacional e seguimento dos RN de risco. Realiza ainda acompanhamento psicológico para as mães de bebês de risco. Nas atividades de Ensino, oferece treinamento para residentes médicos / enfermagem”.

O Hospital Estadual de Sumaré (HES) e a Maternidade de Campinas estão localizados no interior do Estado de São Paulo e foram escolhidos como controle por atenderem os seguintes critérios de inclusão: hospitais-escola, referência terciária no atendimento à gestante e bebê de risco de alto risco e, não terem o Método Canguru implantado conforme preconizado na Portaria n. 930 do Ministério da Saúde.

A instituição controle foi o Hospital Estadual de Sumaré (HES) que é um hospital escola no interior do estado de São Paulo afiliado a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), referência terciária no atendimento a gestação de risco e atendimento ao bebê de alto risco, inclusive prematuros extremos. O hospital possui 12 leitos de UTIN e 12 leitos na Unidade de Cuidados Intermediários Neonatais (UCIN). A instituição estimula a presença de pais nas unidades neonatais. As acomodações para os pais se referem ao oferecimento de uma cadeira próxima ao leito neonatal e alimentação para mães que permanecem por maior tempo. Para os pais que moram na cidade onde se localiza o hospital é oferecido passe de ônibus pela assistente social e quando são de outras cidades, essa profissional atua como facilitadora entre prefeituras para o oferecimento de transportes através de ambulâncias ou ônibus para os pais. Não existe casa de apoio onde os pais possam ficar, mas sim um quarto com 04 camas para realização de um tipo de alojamento conjunto tardio com 04 leitos, onde as mães ficam com seus bebês por volta de três dias antes da alta, para orientações gerais pré-alta no cuidado do bebê PT. A média mensal de partos em 2013 foi 188.

A outra instituição controle, Maternidade de Campinas, é uma instituição Filantrópica sendo 64% dos pacientes do Sistema Único da Saúde (SUS). O hospital com 256 leitos, atende cerca de 40% dos nascimentos da cidade e região, 60% deles do SUS. É um hospital escola que é referência regional no atendimento a gestante e RN de risco. A UTIN conta com 40 leitos e a UCIN 25 leitos. A unidade neonatal destina 90% dos leitos ao SUS. Assim como o outro hospital controle, a maternidade estimula a presença de pais nas unidades neonatais. As acomodações para os pais também se referem ao oferecimento de uma cadeira próxima ao leito neonatal e alimentação para mães que permanecem por maior tempo. Para os pais que moram na cidade onde se localiza o hospital é oferecido passe de ônibus pela assistente social e quando são de outras cidades, essa profissional atua como facilitadora entre prefeituras para o

oferecimento de transportes através de ambulâncias ou ônibus para os pais. Não existe casa de apoio onde os pais possam ficar.

Nos dois hospitais controle, no momento da coleta, o Método Canguru não estava implantado conforme proposto pelo Ministério da Saúde, porém esses desempenharam cuidado humanizado ao recém-nascido e família incluindo ambiente com baixa luminosidade, ruído reduzido, ninho para PT e acolhimento aos pais, anteriormente mencionado. Apesar do contato pele a pele não fazer parte da rotina desses hospitais, pôde ser estimulado de forma espontânea pela equipe que tinha algum conhecimento prévio sobre o método e realizado pela mãe/pai.

Tanto o hospital intervenção, como os hospitais controle foram escolhidos por conveniência do pesquisador, respeitando os critérios de inclusão citados.

3.3 Variáveis

Variável Principal: o estresse crônico em gestantes, mães e bebês PT medido pelo Cortisol e Desidroepiandrosterona (DHEA) das unhas. O método utilizado para dimensionamento desses hormônios nas unhas tem como referência o estresse relativo a um período de três meses antes da coleta. Assim, temos o estresse crônico materno relativo ao último trimestre da gestação atual (primeira coleta) e ao puerpério no terceiro mês após o parto prematuro (segunda coleta), incluindo a vivência durante internação do filho PT na unidade neonatal; estresse crônico do bebê PT referente aos três meses pós-nascimento (coleta única), incluindo o período de hospitalização na unidade neonatal. Considerando que alguns bebês PT, especialmente os limítrofes, permaneceram poucos dias hospitalizados, os níveis desses esteroides maternos e infantis também podem ser influenciados pela vivência no ambiente domiciliar.

Variáveis secundárias: o estresse psicológico materno foi avaliado por duas escalas de medidas validadas no Brasil. O estresse percebido das mães no último mês da gestação e durante a permanência de seus filhos na unidade neonatal foi analisado através da Escala de Estresse Percebido versão com 10 itens (*Perceived Stress Scale – PSS-10*). O estresse causado pela internação dos seus filhos na unidade neonatal relacionado aos estressores ambientais, a aparência e comportamento do bebê PT e as mudanças no papel de pais de bebês foi analisado por meio da Escala de Estresse Parental em Unidade de Cuidado Intensivo Neonatal (*Parental Stress Scale: Neonatal Intensive Care Unit – PSS:NICU*).

3.4 Amostra

Critérios de inclusão: mães alfabetizadas, com capacidade para responder os instrumentos autoaplicáveis PSS:NICU e PSS, e filho PT com idade gestacional menor que 37 semanas avaliada pela data da última menstruação (DUM), Ballard ou New Ballard ou Capurro). No grupo intervenção as mães e os bebês PT permaneceram na enfermaria canguru por, no mínimo, sete dias.

Critérios de exclusão: mães usuárias de drogas e/ou hormônios, diagnóstico prévio de distúrbios psiquiátricos, endócrinos e/ou neurológicos, doenças de unhas e impossibilitadas de ver seus filhos na primeira semana de vida. Também foram excluídas as mães que tinham por hábito cortar as unhas com os dentes, comumente conhecido como “roer unhas”. Bebês malformados e bebê transferido para outra instituição foram excluídos do estudo.

O total de 118 mães atenderam os fatores de inclusão e exclusão e concordaram em participar da pesquisa, mas 59 delas foram eliminadas por diferentes motivos (descritos nos resultados). A amostra final foi de 59 mães (30 no hospital intervenção e 29 no controle), sendo que quatro delas tiveram filhos gemelares (2 no grupo intervenção e dois no grupo controle); assim a amostra contou com 63 bebês (32 no hospital intervenção e 31 no controle).

3.5 Coleta e processamento dos dados

As mães e seus bebês PT participantes do estudo foram recrutados na unidade neonatal, o mais precocemente possível, na primeira semana após o nascimento.

Atendidos os critérios de inclusão e após o consentimento informado, foram obtidos os dados demográficos das mães e dos PT e registrados em um instrumento planejado para esta pesquisa (APÊNDICE A). Os dados foram coletados por meio de levantamento dos prontuários do PT e da mãe e completados no contato com a mãe.

3.5.1 Método de aplicação das escalas PSS e PSS:NICU

A mãe, após a explicação recebida sobre o estudo, o consentimento, o convite para participar da pesquisa, assinatura dos termos de consentimento e do termo de assentimento livre e esclarecido (APÊNDICE B), foi orientada quanto ao preenchimento das escalas e a coleta das

unhas, conforme protocolo de coleta, que foi utilizado como folheto explicativo para mães e equipe da unidade neonatal (APÊNDICE C).

Os instrumentos autoaplicáveis foram respondidos no primeiro contato com a mãe e por ocasião da alta hospitalar do PT da unidade neonatal. À mãe foi dado o direito de responder as escalas no momento e local que lhe fossem mais convenientes, sendo que a maioria das mães respondeu os instrumentos na unidade neonatal, logo após o contato com a pesquisadora ou auxiliar de pesquisa. A Figura 6 descreve os momentos de aplicação das escalas.

Além das escalas de medida apresentadas, optou-se por incluir a questão dicotômica sobre a vivência de estresse durante a gestação, sendo a resposta SIM para um ou mais evento(s) e NÃO. Para as mães que preferiram não falar se vivenciaram ou não o estresse, durante a gestação, foi relatado como prefere não falar.

Figura 6 - Resumo da aplicação das escalas

3.5.2 Método de coleta do material biológico

Foi criado um protocolo de coleta das unhas da mãe e do bebê (APÊNDICE C) seguindo o modelo utilizado na pesquisa realizada por Warnock et al. (2010) descrito a seguir.

Primeira amostra – mãe

A mãe foi orientada quanto à maneira cortar as unhas dos dez dígitos das mãos direita e esquerda (cortar de forma reta, direta, sem curvas). Em caso de uso de esmaltes ou bases de unhas, foi solicitado que removesse o esmalte antes de cortá-las. Essas unhas foram desprezadas como amostra, pois, esse primeiro corte foi considerado como se estivesse padronizando o crescimento e o tamanho das unhas. Essas unhas não foram utilizadas para o estudo, porém foram mantidas para a realização do estudo piloto. Assim, as mães foram orientadas a deixarem as unhas crescerem por duas semanas, sem utilização de qualquer produto como esmaltes ou base e, após esse período, cortassem as unhas (de cada digital da mão direita e esquerda) e armazenassem em um recipiente hermético (saco plástico Ziploc®) que foi oferecido a elas. Os recipientes foram identificados com um número e as iniciais do nome da mãe armazenados em temperatura ambiente. Antes da alta do PT da unidade neonatal, foi fornecido o material para coleta da segunda amostra da mãe, seguindo o mesmo método, bem como o material para a coleta da amostra do bebê, apresentados no Quadro 4.

Quadro 4 - Material oferecido para as mães no momento da alta hospitalar do bebê

Material para a coleta de unhas das mães	Material para a coleta de unhas dos bebês
<ul style="list-style-type: none">✓ removedor de esmalte✓ algodão✓ cortador de unhas (para adulto)✓ sacos herméticos Ziploc®✓ etiqueta com datas dos cortes das unhas	<ul style="list-style-type: none">✓ cortador de unhas (para bebê) ou tesoura (para bebê)✓ sacos herméticos Ziploc®✓ etiqueta com datas dos cortes das unhas

Essa primeira amostra das unhas maternas foi utilizada para dimensionamento dos hormônios cortisol e DHEA tendo como referência o estresse crônico relativo ao último trimestre da gestação atual.

Segunda amostra – mãe

Após três meses de nascimento do PT foi coletada a segunda amostra das unhas das mães. Na semana em que cada bebê completou três meses foi realizado contato telefônico com a mãe. Nessa ocasião foi solicitada à mãe que removesse o esmalte e que cortasse as unhas conforme orientação fornecida no hospital. As unhas do primeiro corte (correspondente ao terceiro corte ao longo da pesquisa) foram desprezadas. Solicitado que as mães deixassem as unhas crescerem por duas semanas, sem utilização de qualquer produto (como esmaltes ou base). Após essas duas semanas, realizado novo contato telefônico e solicitado que a mãe cortasse as unhas de cada digital da mão direita e esquerda, colocando-as diretamente em saco hermético (saco plástico Ziploc®), previamente identificado, onde foram armazenadas as unhas.

No hospital intervenção foi agendado o retorno das mães e bebês, duas semanas após esse completar três meses, assim, seria possível auxiliá-las no corte e obter a amostra. Caso a mãe não comparecesse ao hospital, uma auxiliar de pesquisa ficou responsável por buscar as unhas na casa das mães que realizaram o corte da segunda amostra em casa. Isso ocorreu com três mães do hospital intervenção.

No caso das mães dos hospitais controle, como não fazem acompanhamento do PT no hospital, e sim nas unidades básicas de saúde, não foi agendado retorno. Todas as coletas foram realizadas na residência das mães e a pesquisadora ou uma auxiliar de pesquisa foi buscar as unhas.

As unhas maternas coletadas (duas amostras) foram mantidas no Brasil até que todas as unhas (mãe e bebê) fossem coletadas e, então, foram levadas para o Canadá para análise no laboratório da Universidade de British Columbia.

Essa segunda amostra das unhas maternas foi utilizada para dimensionamento dos hormônios cortisol e DHEA tendo como referência o estresse crônico no puerpério relativo aos três meses pós-parto prematuro com a vivência durante internação do filho PT na unidade neonatal e, em algumas delas, inclui também o pós alta quando a hospitalização do bebê teve curta duração.

Coleta do material biológico do bebê

Primeira amostra – bebê

Na última semana de internação do bebê no hospital, a mãe do PT foi orientada quanto ao procedimento de coleta das unhas do filho, mas não foram cortadas as unhas nessa ocasião. O corte das unhas do bebê foi feito pela mãe, na residência. Na semana em que o bebê completou três meses, foi realizado contato telefônico com a mãe para lembrá-la de cortar as unhas do bebê e tirar dúvidas. Devido a pequena quantidade de unha dos bebês, a amostra foi obtida através de três cortes, a fim de obter quantidade suficiente para análise. O primeiro corte foi ao completar três meses de vida, o segundo após sete dias e o terceiro após quatorze dias do primeiro corte. Foi feito contato telefônico nas datas dos cortes das unhas (coleta da amostra) para relembrar a mãe. As unhas dos três cortes do bebê foram armazenadas no mesmo recipiente plástico (saco hermético Ziploc®). A mãe cortou as unhas de cada digital da mão direita e esquerda do bebê. Foram identificados com um número e iniciais do nome da mãe. Quando, no momento do contato telefônico, alguma mãe expressou dúvida e necessidade de auxílio para coleta das amostras materna ou do bebê, a pesquisadora ou uma auxiliar de pesquisa foi até a residência para ajudá-la. As unhas dos PT (amostra única) foram mantidas no recipiente (saco hermético Ziploc®) em temperatura ambiente no Brasil até que todas as unhas fossem coletadas e, depois, levadas para o Canadá para análise no laboratório da Universidade de British Columbia. Essa amostra com três cortes das unhas do bebê PT foi utilizada para dimensionamento dos hormônios cortisol e DHEA tendo como referência o estresse crônico vivenciado desde o nascimento e hospitalização na unidade neonatal, embora em alguns bebês com período curto de internação também incluía níveis desses esteroides relativos ao estresse no domicílio. A síntese dos tempos e momentos de coletas dos dados relativos ao estresse (itens 3.5.1 e 3.5.2) materno na gestação e puerpério e do bebê PT está apresentada na Figura 7.

Figura 7 - Resumo da coleta de dados

3.6 Análises dos dados

3.6.1 Análise dos dados coletados através das escalas

Os dados foram inicialmente estruturados em uma planilha Excel, sendo digitadas duas vezes para garantir a confiabilidade dos mesmos. Posteriormente foram exportados para o software *Statistical Package for the Social Sciences* – SPSS versão 22.0 para a realização dos testes que foram feitos por um profissional de estatística.

As análises quantitativas dos escores obtidos pelos pais/mães nas escalas PSS:NICU e PSS-10 foram feitas por meio de estatística descritiva (média, mediana, desvio padrão). Foi comparado o estresse psicológico das mães dos PT do grupo canguru com o controle, na

primeira semana de internação na UTIN e na última semana antes da alta, mediante uso do teste de medidas repetidas e teste de Mann-Whitney.

Para o cálculo utilizando a escala PSS-10 empregou-se a somatória dos pontos, sendo que, quanto maior o resultado (escore), maior o nível de estresse, lembrando que o resultado da escala relativo ao estresse percebido de forma retrospectiva, referente a quatro e oito semanas antes da data da administração (KAIRA et al., 2007; COHEN, 1988).

Para análise da escala PSS:NICU foi utilizada a média estatística de pontos de acordo com a métrica 1 e métrica 2 para o avaliação do estresse materno. A medida ou a métrica 1 (M1) fornece o nível de estresse em que a situação ocorre ou Nível de Ocorrência de Estresse, no qual somente aqueles que relataram terem passado pela experiência, ou seja, escore de 2-5 receberam uma nota no item; os que relataram não terem experimentado são codificados como ausentes, recebendo nota zero. A métrica 2 (M2) calcula o nível geral de estresse do ambiente. Nessa medida (M2) os pais que não referiram ter tido estresse em um dos itens recebem nota 1, indicando que não houve estresse na situação. Para efeito de cálculo e obtenção da média em cada escala utiliza-se o número de itens na escala. Após a obtenção do escore médio de estresse esse foi decodificado conforme itens da escala, sendo que o escore 1 significa que não foi estressante; o escore 2 significa pouco estressante; 3 moderadamente estressante; 4 muito estressante e 5 extremamente estressante (MILES; FUNK; CARLSON, 1993).

3.6.2 Análise do cortisol e DHEA em unhas (material biológico)

Foram comparados os níveis de Cortisol/DHEA e estresse das mães e dos PT, submetidos ao Método Canguru com aqueles do grupo controle.

Grande parte do cortisol circula no sangue de forma conjugada (ligado) à proteína transcortina (CBG) e albumina, sendo que apenas uma pequena porcentagem (5 a 10%) pode ser encontrada em forma livre, e essa é a forma biologicamente ativa do hormônio (CASTRO; MOREIRA, 2003). Quando os níveis de cortisol estão elevados na corrente sanguínea, observa-se maior nível desse hormônio em sua forma livre, devido ao fato deste exceder a capacidade de ligação às proteínas. Quando acontece uma situação de ameaça, ocorre uma descarga de secreção desse hormônio em resposta ao estresse. Quando a ameaça cessa, ocorre o feedback negativo que faz com que ocorra a inibição da secreção de ACTH e HCL pelo

hipotálamo, cessando a resposta ao estresse (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009; JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004; TSIGOS; CHROUSOS, 2002).

Para avaliação da resposta do eixo HHA à situação de estresse pode-se utilizar diferentes formas do cortisol livre ou conjugado. A análise do estresse agudo pode ser feita através de sangue, saliva, urina e fezes, enquanto a análise do estresse crônico pode ser feita através do cortisol encontrado em tecidos do nosso corpo, como cabelo e unhas. A matriz das unhas tem capacidade de acumular esteroides como cortisol, testosterona e outras substâncias, portanto, tem sido utilizada como importante fonte de análises em pesquisas para diagnósticos de doenças (TEGETHOFF et al., 2011; WARNOCK et al., 2010; LEMOS; ANDERSON; ROBERTSON, 1999); análise do uso de drogas (SHEN et al., 2014) e outros.

A análise da resposta do eixo HHA, utilizando as unhas, depende da extração correta do cortisol e DHEA e análise adequada do material extraído. Utilizou-se a técnica de enzima imunoensaio (EIA) utilizado e proposto Warnock et al. (2010) para análise das unhas das gestantes e mães, pois o teste detecta o cortisol total, ou seja, tanto livre como o ligado à proteína, o que intensifica sua eficácia (CASTRO; MOREIRA, 2003). Warnock et al. (2010) são os precursores da utilização do método EIA para análise das unhas de adultos. Eles testaram dois métodos de extração do cortisol e DHEA das unhas, sendo que o primeiro método utilizando a unha total (unhas moídas) e outro somente parte da unha (50 miligramas do pó das unhas moídas). Ambos os métodos foram eficazes para extração dos esteroides e não foi observada diferença entre eles. Avaliaram cortisol e DHEA em unhas de estudantes universitários (18 a 24 anos) em dois diferentes momentos do ano letivo. A pesquisa analisou os esteroides nas unhas dos alunos no período que esses estariam vivenciando diferente momentos de estresse (pré e pós-provas) utilizando a técnica EIA (Kit Salimetrics Cortisol e DHEA) baseado na técnica de análise do estresse crônico em cabelos. O resultado foi satisfatório, sendo possível a análise desses esteroides em unhas de adultos.

A análise do material, coletado no Brasil, foi feita por laboratório especializado neste procedimento localizado no Canadá. Destaca-se a parceria com a pesquisadora Profa. Dra. Fay Warnock, professora assistente da *School of Nursing, University of British Columbia (UBC)*, que é um centro de excelência internacional em pesquisas e que agrega em sua estrutura laboratórios que processaram o material biológico.

3.6.2.1 Análises Piloto do cortisol/DHEA das unhas

Devido ao ineditismo do estudo com unhas de gestantes e bebês PT, optou-se por realizar testes-piloto em laboratórios filiado a Universidade de British Columbia no Canadá, antes de iniciar as análises das unhas oficialmente. O teste inicial foi pautado no protocolo utilizado por Warnock et al. (2010), porém ao encontramos dificuldade para analisar as unhas dos bebês, incluímos no teste piloto o método utilizado por Tegethoff et al. (2011). Realizamos um teste-piloto com as unhas das mães e três testes com as unhas dos PT. Após estabelecermos o protocolo com unhas de bebês, que foi algo mais complexo, fizemos o segundo e último piloto com as unhas das mães, adequando esse ao protocolo dos bebês, afim de utilizarmos um meio mais uniforme entre os participantes. Para extrair eficazmente os esteroides a partir das amostras de unhas, utilizamos um conjunto de ações físico-químicas afim de promover a retirada do material necessário para pesquisa. Foi utilizado solvente, tempo e temperatura adequados, conforme preconizado por pesquisas anteriores realizadas por Warnock et al. (2010) e Tegethoff et al. (2011). Foram necessários dois ciclos de extração para obtenção dos esteroides das unhas dos adultos (mães) e três ciclos para as unhas dos bebês (PT) para que fosse possível obter o máximo de esteroides para favorecer a análise. Os testes estão descritos a seguir.

Primeiro teste-piloto com unhas das mães

O primeiro teste-piloto com as unhas das mães foi realizado no laboratório 1 (Lab1) filiado a Universidade de British Columbia no Canadá. As unhas de 16 mães foram lavadas por duas vezes, com 5ml de isopropanol, por aproximadamente 1 minuto. O Isopropanol foi coletado e deixado as unhas secarem por 48 horas. Doze amostras das unhas secas foram moídas utilizando “moinho de esfera” o equipamento Retsch®, Haan, Düsseldorf, Germany com 25 Hz por dois minutos e meio. Quatro amostras das unhas secas foram cortadas pela metade. Metade das unhas foi moída e metade foi cortada em pequenos pedaços. Para moer o mesmo equipamento utilizado nas demais, por 2min30seg. Foi colocado o pó do total das unhas moídas em tubo (Falcon®; Franklin Lakes, NJ, USA). As unhas cortadas também foram colocadas em tubo (Falcon®; Franklin Lakes, NJ, USA). Os tubos foram pesados antes (calibrados). Um mililitro (ml) de methanol foi adicionado e os tubos foram agitados na máquina Labquake tube shaker (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) por 24 horas em

temperature ambiente. Depois de 24 horas as amostras foram agitadas e centrifugadas em velocidade de 10,000 rpm por 5 minutos. A amostra foi centrifugada e o volume do sobrenadante foi colocado em um novo tubo. O volume de 900 microlitros (μ l) do sobrenadante foi colocado em um novo tubo e evaporado, sob corrente de gás nitrogênio, até secar. Um mililitro de metanol foi adicionado no tubo da amostra e uma nova extração foi feita utilizando o mesmo processo de extração. Depois de completar a segunda extração, novecentos e cinquenta microlitros (μ l) do supernadante foram retirados e colocados no mesmo tubo da primeira extração. O material das duas extrações foi evaporado em corrente de gás nitrogênio e deixado por toda a noite, em lugar escuro e em ar ambiente. As amostras evaporadas foram ressuspensas em diluente de ensaio fornecida pelo fabricante do kit *Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay* e, o kit *Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay* que são imunoensaios (EIA), projetados e validados para a medição quantitativa do cortisol e DHEA, respectivamente. Salienta-se que a escolha pelo imunoensaio salivar foi devido ao fato deste ser mais sensível para a análise de baixas concentrações de cortisol e DHEA. Se a opção fosse pelo método utilizado para sangue, não haveria a garantia da obtenção da análise do cortisol das unhas das mães, pois nesses geralmente o sangue apresenta maior concentração desses hormônios, assim o método de análise é menos sensível que o utilizado para análise em saliva. Cortisol e DHEA foram analisados por ensaio utilizando os kits *Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay* e *Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay* de acordo com as instruções do fabricante (ANEXO C). A análise do cortisol e DHEA nas unhas das mães foram realizadas com sucesso.

Deparou-se com dificuldades para realizar a análise das unhas de bebês PT por meio do método EIA, usado com unhas dos adultos. A maior dificuldade foi devido à complexidade em extrair o cortisol e DHEA, pois não foi possível moer as unhas dos bebês PT, como proposto por Warnock et al. (2010), dada a fragilidade das mesmas. Isso dificultou a extração dos esteroides, o que levou a outro problema que foi a dificuldade de leitura dos esteroides pelo método de enzima imunoensaio (EIA). Apesar do alto poder de sensibilidade e detecção do EIA, não foi possível a análise utilizando essa técnica, pois, a baixa concentração do cortisol e DHEA extraídos não foram suficientes para realização do teste. Buscou-se na literatura outros estudos do estresse crônico em bebês.

Yamada et al. (2006) utilizaram como medida de estresse crônico o cabelo de bebês PT. O objetivo do estudo foi comparar o nível de cortisol capilar entre bebês a termo e PT submetidos ao estresse, devido a internação na unidade neonatal. Também comparou o

estresse de bebês a termo saudáveis com bebês a termo (de 25 a menos que 37 semanas de gestação), que ficaram internados por 30 dias, no mínimo, em UTIN níveis I e II). O estudo contou com amostra de 60 bebês. O método de avaliação do cortisol foi o Elisa. Os dados foram coletados na região central do Canadá. Os bebês que utilizaram corticoide não foram excluídos, apenas identificados tipo de corticoide, dose e tempo. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os bebês PT e a termo, porém foi observada importante associação entre o uso de respiradores e o estresse. O cortisol do PT foi de 1,97nmol/g (DP 2,04) e a termo 2,06 nmol/g (DP 2,05). Quanto maior o tempo que os bebês ficaram em ventilação mecânica, maior o nível de estresse (a cada dia a mais no respirador, foi observado um aumento de 0,2nmol/g do cortisol). Não foi constatada diferença significativa entre os PT cujas mães utilizaram corticoide profilático na gestação (37%). Ao comparar o bebê a termo saudável ao que ficou internado, foi constatada diferença estatisticamente significativa. Os bebês a termo que ficaram na UTIN tiveram maior nível de cortisol do que os que não passaram por internação na unidade neonatal.

Moore et al. (2015) utilizaram o sangue do cordão, coletado como parte de rotina, e incluíram outras medidas como a saliva e urina, para analisar a estabilidade individual do cortisol em neonatos. Participaram da pesquisa 31 PT (IG menor que 31 semanas). Foi utilizada a análise EIA.

O único estudo com unhas em bebês, encontrado na literatura, foi o realizado por Tegethoff et al. (2011), que analisaram unhas de bebês a termo para avaliar o estresse retrospectivo, ou seja, intra-útero (fetal). Foi explorada a possibilidade de quantificar o DHEA e DHEAS utilizando a técnica de cromatografia líquida (UPLC-MS/MS) avaliando a resposta fetal a eventos estressantes vivenciados pela mãe, durante a gravidez. Foram recrutados 80 bebês a termo, mas o DHEA foi quantificável em apenas 43 deles. Dentre esses, 11 mães foram identificadas como estressadas na gestação e 32 sem estresse. O método foi eficaz na análise do estresse crônico fetal, utilizando unhas de bebês.

O método de cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS) foi escolhido como alternativa para a análise das unhas dos PT devido a sua alta eficácia em separação e leitura dos componentes. A LC-MS, também conhecida como cromatografia líquida de alta desempenho com espectrômetro de massa (HPLC-MS; UPLC-MS/MS) é uma técnica que vem sendo utilizada para análise de esteroides em unhas de adultos e crianças. Tem-se, como exemplo, o estudo realizado por Bem Khelif et al. (2011) que teve como objetivo principal comprovar a aplicabilidade da técnica para análise do cortisol, cortisona,

DHEA e DHEAS nas unhas de adultos. Os autores quantificaram esses esteroides nas unhas de dez mulheres adultas (utilizando 1mg de unha) e foram os precursores da técnica UPLC-MS-MS para essa análise em unhas. Segundo Warnock et al. (2010), a EIA tem maior sensibilidade e ampla detecção para análise dos níveis de cortisol e DHEA do que a cromatografia líquida (WARNOCK, 2010), porém, o presente estudo mostrou a eficácia da cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS), para análise do conteúdo de esteroides extraídos das unhas dos bebês PT, através testes-piloto com as unhas dos bebês descritos a seguir.

Primeiro teste-piloto com unhas dos bebês

O primeiro teste-piloto com as unhas dos bebês foi realizado no laboratório 1: *Laboratory of Dr. Joanne Weinberg/ Dept. of Cellular & Physiological Sciences/ Life Sciences Center* (Lab1), filiado a Universidade de British Columbia no Canadá.

Para a análise das unhas dos bebês foi seguido o mesmo modelo proposto por Warnock et al. (2010), porém com ajustes para as unhas dos bebês, pois, o moinho de esfera (equipamento Retsch®, Haan, Düsseldorf, Germany) não pôde ser utilizado para moer as unhas dos bebês por serem muito finas e em pequena quantidade. Foram realizados experimentos com outros equipamentos para tentar moer as unhas, porém, sem sucesso. Houve o teste em cortar as unhas em pequenos pedaços, mas, por serem finas e pequenas, houve perdas de unhas. Optou-se então por deixar as unhas inteiras, com modificações na quantidade de isopropanol.

A amostra das unhas para o piloto foi de dois bebês a termo e um PT, proveniente de todos os dígitos da mão esquerda e direita, coletadas em apenas um corte.

As unhas foram lavadas por duas vezes, com 1ml de isopropanol, por aproximadamente 1 minuto. O isopropanol foi coletado e deixado as unhas secarem, por 48 horas, e colocando as unhas inteiras em tubo (Falcon®; Franklin Lakes, NJ, USA). Os tubos foram pesados antes (calibrados). Um mililitro (ml) de metanol foi adicionado e os tubos foram agitados na máquina *Labquake tube shaker* (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canadá) por 24 horas, em temperatura ambiente. Depois de 24 horas as amostras foram agitadas e centrifugadas em velocidade de 10,000 rpm por 5 minutos. A amostra foi centrifugada e o volume do supernatante foi colocado em um novo tubo. O volume de 900 microlitros do supernatante foi colocado em um novo tubo e evaporado, sob corrente de gás nitrogênio, até secar. Um mililitro de metanol foi adicionado no tubo da amostra e uma nova extração foi feita utilizando o mesmo

processo de extração. Depois de completar a segunda extração, novecentos e cinquenta microlitros (μ l) do supernadante foram retirados e colocados no mesmo tubo da primeira extração. O material das duas extrações foi evaporado em corrente de gás nitrogênio e deixado por toda a noite, em ambiente escuro e em ar ambiente. As amostras evaporadas foram ressuspensas em diluente de ensaio fornecido pelo fabricante EIA. Cortisol e DHEA foram analisados por ensaio utilizando os kits *Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay* e *Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay* de acordo com as instruções do fabricante.

Não se alcançou sucesso no primeiro teste-piloto para extração e análise do cortisol e DHEA realizado. O teste deixou a dúvida se a extração nas unhas do bebê foi adequada, pois não foi possível moer as unhas (devido ser finas e em pequena quantidade), como a técnica utilizada para as unhas das mães. Ao deixar as unhas inteiras a extração foi menor do que a esperada. Assim buscou-se um meio que auxiliasse na extração do cortisol e DHEA das unhas e, um método mais sensível para fazer a análise do material extraído, ou seja, um método que faria a análise de pequena quantidade de cortisol e DHEA, extraído nas unhas dos bebês PT. Houve a opção por realizar um novo estudo piloto com unhas de um bebê.

Segundo teste-piloto com unhas dos bebês

Foi realizado no laboratório 2: Vancouver Prostate Centre (Lab2), filiado à Universidade de British Columbia, no Canadá.

O segundo piloto foi feito com unhas de um bebê a termo e um PT, proveniente de todos os dígitos da mão esquerda e direita, coletadas em apenas um corte. Utilizou-se o protocolo desenvolvido por Warnock et al. (2010) adaptado para unhas dos bebês para extração do cortisol e DHEA. Foi acrescentado ao protocolo a técnica de sonificação, utilizada por Garth Warnock et al. (1997), para tentar obter melhor extração do cortisol e DHEA nas unhas dos bebês. A técnica de análise foi modificada, ao invés da análise de imunoensaio (EIA) utilizando os kits *Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay* e *Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay*, optou-se pela técnica de cromatografia líquida de alto desempenho com espectrometria de massa. Essa técnica foi utilizada em cabelos, por Cirimele et al. (2000), para análise do estresse crônico utilizando o cortisol capilar. O método de cromatografia líquida de alto desempenho com espectrometria de massa é capaz de detectar cortisol e DHEA, que foi alvo do desse estudo, além de outros esteroides não utilizados.

Foram feitas algumas modificações no protocolo inicial devido o Laboratório 2 já ter o método próprio para análise utilizando a cromatografia líquida. Destaca-se que, apesar do laboratório fazer esse tipo de exame com frequência, essa foi a primeira vez que a análise foi realizada com unhas, ou seja, somente foi utilizado devido o protocolo desse estudo.

Unhas de um bebê a termo (uma) e um bebê PT (uma) foram rapidamente lavadas, uma vez, com 1ml de metanol. O metanol foi coletado e não se deixou as unhas secarem (a secagem é necessária para moer as unhas, como não foram moídas, não foi preciso). Foram colocadas as unhas inteiras em tubo (Falcon®; Franklin Lakes, NJ, USA). Os tubos foram pesados antes (calibrados). Um mililitro (ml) de metanol foi adicionado. Realizada a sonificação por 30 minutos. Após a sonificação os tubos foram agitados na máquina *Labquake tube shaker* (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) por 24 horas, em temperatura ambiente. Depois de 24 horas, as amostras foram agitadas e centrifugadas, em velocidade de 10,000 rpm por 5 minutos. A amostra foi centrifugada e o volume do supernatante foi colocado em um novo tubo. O volume de 900 microlitros do supernatante foi colocado em um novo tubo e evaporado sob corrente em centrífuga até secar. Um mililitro de metanol foi adicionado no tubo da amostra e uma nova extração foi feita, utilizando o mesmo processo de extração. Depois de completar a segunda extração, novecentos e cinquenta microlitros do supernatante foram retirados e colocados no mesmo tubo da primeira extração. O material das duas extrações foi evaporado em centrífuga. As amostras evaporadas foram ressuspensas em diluente preparado no laboratório. Cortisol e DHEA foram analisados por meio do método de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC/MS) ou cromatografia líquida de alto desempenho com espectrometria de massa (HPLC ou CLAE). O segundo piloto realizado mostrou eficácia em extração e análise nas unhas de bebê a termo e PT.

Terceiro teste-piloto com unhas dos bebês

Como foi realizado um piloto com apenas unhas de um bebê a termo e um PT optou-se em fazer mais um teste-piloto. Esse piloto foi realizado no mesmo laboratório que o piloto 2, ou seja, no Lab2. Do protocolo utilizado no piloto 2, apenas alterou-se a utilização do produto para lavar as unhas, utilizando o mesmo usado para lavar as unhas das mães, o isopropanol.

A unhas foram rapidamente lavadas, uma vez, com 1ml de isopropanol. O isopropanol foi coletado e não foi deixado as unhas secarem (a secagem é necessária para

moer as unhas, como não foram moídas, não foi preciso). Foram colocadas as unhas inteiras em tubo (Falcon®; Franklin Lakes, NJ, USA). Os tubos foram pesados antes (calibrados). Um mililitro (ml) de metanol foi adicionado. Realizada a sonificação por 30 minutos. Após a sonificação os tubos foram agitados na máquina *Labquake tube shaker* (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) por 24 horas, em temperatura ambiente. Depois de 24 horas, as amostras foram agitadas e centrifugadas em velocidade de 10,000 rpm, por 5 minutos. A amostra foi centrifugada e o volume do supernatante foi colocado em um novo tubo. O volume de 900 microlitros do supernatante foi colocado em um novo tubo e evaporado sob corrente em centrífuga, até secar. Um mililitro de metanol foi adicionado no tubo da amostra e uma nova extração foi feita utilizando o mesmo processo de extração. Depois de completar a segunda extração, novecentos e cinquenta microlitros do supernatante foram retirados e colocados no mesmo tubo da primeira extração. O material das duas extrações foi evaporado em centrífuga. As amostras evaporadas foram ressuspensas em diluente preparado no laboratório. Cortisol e DHEA foram analisados por meio do método de cromatografia líquida de alto desempenho com espectrometria de massa (CL/MS). O terceiro piloto realizado mostrou eficácia em extração e análise nas unhas de bebê a termo e PT.

Segundo teste-piloto com unhas das mães

O segundo teste-piloto com as unhas das mães foi realizado nos Lab1 e La2, ambos filiados a Universidade de British Columbia, no Canadá.

Para que se ter um protocolo mais próximo, tanto para mãe como para o bebê, foi utilizado um novo teste-piloto com unhas de 20 mães utilizando o mesmo protocolo de extração do cortisol e DHEA, utilizado por Warnock et al. (2010), porém acrescido da técnica de sonificação utilizada por Garth Warnock et al. (1997), mas, foi mantida a análise com os kits *Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay* e *Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay*, pois esses foram capazes de fazer a análise do cortisol e DHEA no primeiro teste-piloto. Além disso é a uma técnica com evidências em estudos anteriores (WARNOCK et al., 2010).

A amostra utilizada neste teste foram unhas de 20 mães que concordaram em participar da pesquisa, assinaram o TCLE, porém, não foram obtidos todos os cortes necessários para o seguimento do estudo. As unhas foram provenientes da primeira amostra (da terceira semana após o nascimento do bebê).

Utilizou-se o modelo proposto por Warnock et al. (2010) somado à sonificação utilizada por Warnock (1997). Unhas das mães foram lavadas, por duas vezes, com 5ml de isopropanol por aproximadamente 1 minuto. O isopropanol foi coletado e deixado as unhas secarem por 48 horas. Vinte amostras das unhas secas foram moídas utilizando “moinho de esfera” o equipamento Retsch®, Haan, Düsseldorf, Germany com 25 Hz, por três minutos e meio. Foi dividido o pó, do total das unhas moídas, em dois tubos (Falcon®; Franklin Lakes, NJ, USA). Os tubos foram pesados antes (calibrados). Um mililitro (ml) de metanol foi adicionado. Um dos tubos contendo metade do pó das unhas seguiu o protocolo utilizado para extração do cortisol e DHEA utilizado para os bebês, ou seja, realizada sonificação por 30 minutos e, após, os tubos foram agitados na máquina *Labquake tube shaker* (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canadá) por 24 horas, em temperatura ambiente. Depois de 24 horas as amostras foram agitadas e centrifugadas, em velocidade de 10,000 rpm por 5 minutos. A amostra foi centrifugada e o volume do supernatante foi colocado em um novo tubo. O volume de 850 microlitros do supernatante foi colocado em um novo tubo e evaporado em centrífuga até secar. Mil microlitros (um mililitro) de metanol foram adicionados no tubo da amostra e uma nova extração foi feita, utilizando o mesmo processo de extração. Depois de completar a segunda extração, mil microlitros (um mililitro) do supernatante foram retirados e colocados no mesmo tubo da primeira extração. O material das duas extrações foi evaporado em centrífuga. As amostras evaporadas foram ressuspensas em diluente de ensaio fornecida pelo fabricante *Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay* e *Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay*. Cortisol e DHEA foram analisadas por imunoensaio (*Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay* e *Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay*) de acordo com as instruções do fabricante.

A outra metade do pó das unhas seguiu o primeiro piloto, ou seja, os tubos foram agitados na máquina *Labquake tube shaker* (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) por 24 horas em temperatura ambiente. Depois de 24 horas as amostras foram agitadas e centrifugadas em velocidade de 10,000 rpm, por 5 minutos. A amostra foi centrifugada e o volume do supernatante foi colocado em um novo tubo. O volume de 900 microlitros do supernatante foi colocado em um novo tubo e evaporado sob corrente de gás nitrogênio até secar. Um mililitro de metanol foi adicionado no tubo da amostra e uma nova extração foi feita utilizando o mesmo processo de extração. Depois de completar a segunda extração, 950 microlitros do supernatante foram retirados e colocados no mesmo tubo da primeira extração. O material das duas extrações foi evaporado em corrente de gás nitrogênio e deixado por toda

a noite em ambiente escuro, em ar ambiente. As amostras evaporadas foram ressuspensas em diluente de ensaio fornecida pelo fabricante *Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay* e *Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay*. Cortisol e DHEA foram analisadas por ensaio EIA (*Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay* e *Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay*) de acordo com as instruções do fabricante.

Não foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alto desempenho com espectrometria de massa, pois a técnica inicialmente utilizada foi eficaz para a análise. O segundo piloto foi realizado apenas para testar a diferença na extração do cortisol e DHEA das unhas e não para testar a análise.

O segundo piloto mostrou que não há necessidade de sonificação quando utilizada a técnica de moer unhas, pois, quando as unhas são moídas, a extração é feita de maneira adequada. O piloto não mostrou melhor análise quando utilizada a sonificação nas unhas moídas.

Para melhor entendimento dos passos utilizados para extração e análise das unhas utilizando, o método EIA e LC-MS, foram inseridas ilustrações (fotos feitas durante as análises laboratoriais) nos apêndices dessa tese (APÊNDICE D).

3.6.2.2 Análise do cortisol/DHEA das unhas das mães

As análises das 118 amostras foram feitas no Lab1, em dois momentos diferentes. A primeira análise foi feita com as unhas da primeira amostra, sendo 29 mães do grupo controle e 30 mães do grupo intervenção. A segunda análise foi feita com as unhas da segunda amostra (59 amostras). Nas duas análises realizadas, os técnicos do laboratório não tinham conhecimento sobre quais unhas eram do controle ou intervenção, ou seja, foi feita a análise cega das amostras.

As unhas da primeira amostra das 59 mães (30 do hospital intervenção e 29 do controle), provenientes da primeira amostra (da terceira semana após o nascimento do bebê), foram colocadas em um tubo plástico e foram lavadas, por uma vez, com 5ml de isopropanol, por aproximadamente 2 minutos. O Isopropanol foi coletado e deixado as unhas secarem por 48 horas. As unhas secas foram moídas utilizando “moinho de esfera” o equipamento Retsch®, Haan, Düsseldorf, Germany com 25 Hz por três minutos e meio. Os tubos foram pesados antes (calibrados). Cinquenta miligramas de pó de unhas foram transferidos para um tubo plástico.

Um mililitro (ml) de metanol foi adicionado. Os tubos contendo o pó das unhas foram novamente pesados para obtenção da quantidade adequadas das unhas.

A seguir os tubos contendo as unhas foram agitados na máquina *Labquake tube shaker* (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) por 24 horas, em temperatura ambiente. Depois de 24 horas as amostras foram agitadas e centrifugadas em velocidade de 10,000 rpm, por 5 minutos. A amostra foi centrifugada e o volume do supernatante foi colocado em um novo tubo. O volume de 850 microlitros do supernatante foi colocado em um novo tubo e evaporado em centrífuga até secar. Mil microlitros (um mililitro) de metanol foram adicionados nos tubos das amostras e a segunda extração foi feita utilizando o mesmo processo descrito anteriormente. Depois de completar a segunda extração, 1000 microlitros (um mililitro) do supernatante foram retirados e colocados no mesmo tubo da primeira extração. O material das duas extrações foi evaporado em centrífuga, sob corrente de gás nitrogênio. As amostras evaporadas foram ressuspensas em diluente de ensaio fornecido pelo fabricante *Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay* e *Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay*. Cortisol e DHEA foram analisados por imunoensaio (*Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay* e *Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay*), de acordo com as instruções do fabricante.

As unhas das 59 mães, 30 unhas do hospital intervenção e 29 do controle, provenientes da segunda amostra coletados três meses após o nascimento do bebê, foram analisadas seguindo o protocolo proposto por Warnock et al. (2010) apresentado no Apêndice D.

Optamos apresentar os resultados das análises dos níveis do Cortisol e DHEA em picograma por miligrama (pg/mg) visto ser essa a unidade de medida mais utilizada em estudos encontrados sobre o assunto. Eventualmente citamos nos resultados alguns dados em nanomol por grama (nmol/g) para comparações com algumas informações encontradas na literatura, facilitando o entendimento dos leitores.

3.6.2.3 Análise do cortisol/DHEA das unhas dos bebês PT

Foi realizada a análise das amostras de 63 bebês (com três meses de vida), sendo 31 dos hospitais controle e 32 do hospital intervenção. As unhas foram colocadas em um tubo plástico e foram lavadas rapidamente, uma vez, com 1ml de isopropanol. O isopropanol foi coletado e não foi deixado as unhas secarem (a secagem é necessária para moer as unhas, como não foram moídas não foi preciso). Foram utilizadas todas as unhas provenientes dos três cortes totalizando em média 10,02mg. Foram colocadas as unhas inteiras em tubo de

vidro. Os tubos foram pesados antes (calibrados). Um mililitro (ml) de metanol foi adicionado. Realizada a sonificação por 30 minutos. Após a sonificação os tubos foram agitados na máquina *Labquake tube shaker* (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) por 24 horas, em temperatura ambiente. Depois de 24 horas, as amostras foram agitadas e centrifugadas em velocidade de 10,000 rpm, por 5 minutos. A amostra foi centrifugada e o volume do supernatante foi colocado em um novo tubo. O volume de 900 microlitros do supernatante foi colocado em um novo tubo e evaporado sob corrente em centrífuga até secar. Um mililitro de metanol foi adicionado no tubo da amostra e uma nova extração foi feita utilizando o mesmo processo de extração já utilizado. Depois de completar a segunda extração, 950 microlitros do supernatante foram retirados e colocados no mesmo tubo da primeira extração. O material das duas extrações foi evaporado em centrífuga sob corrente de gás nitrogênio. As amostras evaporadas foram ressuspensas em diluente preparado no laboratório. Cortisol e DHEA foram analisados por meio do método de cromatografia líquida de alto desempenho, com espectrometria de massa (CL/MS).

O protocolo e ilustrações da extração e análise do cortisol e DHEA nas unhas das mães e dos bebês PT utilizados nessa pesquisa, bem como o método de Warnock et al. (2010), estão apresentadas no Apêndice D.

Nesta variável também apresentamos os resultados das análises dos níveis do Cortisol e DHEA em picograma por miligrama (pg/mg) visto ser essa a unidade de medida mais utilizada em estudos encontrados sobre o assunto. Ainda, eventualmente citamos alguns dados em nanomol por grama (nmol/g) para comparações com algumas informações encontradas na literatura, facilitando o entendimento dos leitores.

3.7 Análise estatística

Inicialmente os dados maternos e dos bebês PT foram descritos através de frequências absolutas e percentuais (variáveis qualitativas) e por meio de medidas como média, desvio-padrão, mínimo, mediana e máximo (variáveis quantitativas).

Para as comparações entre grupos e tempos envolvendo variáveis quantitativas foi proposto o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Os modelos lineares de efeitos mistos são utilizados na análise de dados em que as respostas estão agrupadas (mais de uma medida para um mesmo indivíduo) e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (SCHALL, 1991).

Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos apresentam distribuição normal com média 0 e variância σ^2 constante.

O coeficiente de Correlação Intraclass é uma medida composta por uma razão de variâncias e é interpretado como a proporção de variabilidade total atribuída ao objeto medido (LAUREANO, 2011).

No presente estudo ela é dada por $ICC = \frac{\sigma_i^2}{(\sigma_i^2 + \sigma^2)}$ onde σ_i^2 é a variabilidade intra-indivíduo e σ^2 é a variabilidade residual do modelo. Quanto mais próximo o ICC estiver de 1 maior a proporção da variabilidade devido aos indivíduos.

Nas situações em que tal pressuposto não foi observado foram utilizadas transformações na variável resposta.

Para determinar a melhor transformação para as variáveis do estudo (Cortisol, DHEA e razão Cortisol/DHEA) foi utilizada a transformação de Box-Cox (BOX e COX, 1964). Este método consiste em aplicar a seguinte transformação: $x'_\lambda = \frac{x^\lambda - 1}{\lambda}$, onde x denota a variável original de interesse, representa a variável transformada e λ representa o parâmetro de transformação aplicado. Os valores mais comuns adotados para λ (lambda) são: 1 nesse caso não precisa efetuar transformação; -1 indica que deve ser usada a transformação inversa; 0 indica que deve ser usada a transformação logarítmica; 2 indica que deve ser usada a transformação quadrática (BOX; COX, 1964).

Juntamente com a estimativa de λ (lambda) também é calculado um intervalo de confiança de 95% para a correspondente estimativa. O pico do gráfico indica qual é o valor ótimo de λ (lambda) que resulta na melhor transformação possível enquanto que, o intervalo de confiança de 95% para a estimativa correspondente, denota a faixa possível de valores que ele pode assumir. As análises de Box-Cox foram feitas com o programa R versão 3.2.3

A fim de relacionar duas variáveis quantitativas foi proposto o coeficiente de correlação de Spearman (ρ), que quantifica esta relação. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação, o valor 1 indica uma relação perfeita e o valor -1 também indica uma relação perfeita, mas inversa, ou seja, quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é esta relação entre as duas variáveis (PALLANT, 2010).

Para a comparação dos escores das subescalas de Aparência do bebê, Sons e Imagens e Papel de pais, foi utilizada a Análise de Variância Não Paramétrica. Essa análise foi proposta por Akritas e Brunner (1997), é baseada no conceito de efeito relativo de tratamento.

Essa medida representa a probabilidade de uma observação selecionada aleatoriamente do conjunto, classificada em uma categoria de ordem mais elevada do que uma observação selecionada aleatoriamente a partir de todo o conjunto de dados (SINGER, 2004). Em todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ($\alpha \leq 0,05$).

3.8 Aspectos éticos

Atendendo aos dispositivos da Resolução 466/12, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EERP/USP), após anuência dos hospitais (IMIP e HES), cenários de recrutamento e coleta dos dados da pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no dia 11 de fevereiro de 2015, CAAE 38019314.9.0000.5393 (ANEXO D), parecer número 950.835, a emenda feita para inclusão de um novo hospital controle e alteração no título, tendo aprovação no dia 17/06/2015, parecer número 1.110.796.

Aos participantes do estudo foi garantido sigilo/anonimato dos nomes e o direito a desistirem de sua participação em qualquer momento do estudo, sem qualquer prejuízo ou modificação no atendimento à saúde do seu filho na unidade neonatal. Às mães que concordaram em participar da pesquisa foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No caso das mães adolescentes foi solicitada a assinatura do TCLE, aos seus pais ou responsáveis, e o termo de assentimento da participante. No caso dos bebês, os pais assinaram os TCLE e em casos de menores, após assentimento materno foi assinado o TCLE pelos avós ou responsáveis (APÊNDICE B).

O encaminhamento do material coletado no Brasil para o Canadá seguiu as orientações contidas na Resolução 441 de 12 de maio de 2011 e feita comunicação na ANVISA e consulado do Canadá no Brasil, para transporte de material biológico para o exterior. Após a análise laboratorial, feita no Canadá, as amostras foram mantidas em biorrepositório da *University of British Columbia* por cinco anos. Esses dados poderão ser utilizados por novas pesquisas desde que se obtenha um novo TCLE e que haja concordância das pesquisadoras responsáveis pelo estudo.

4 Resultados

Para melhor compreensão dos resultados, esses serão apresentados em partes. Descrevemos os resultados referentes ao estresse materno na gestação e no puerpério, seguido da comparação entre grupos e tempos e, por fim, são exibidos os resultados das análises dos bebês PT, conforme síntese esquematizada na Figura 8. Os resultados são precedidos dos dados gerais e caracterização dos participantes, cujo delineamento amostral está apresentado na Figura 9.

Figura 8 - Esquema de apresentação dos resultados

Participantes da pesquisa

Foram convidadas a participar da pesquisa 118 mães que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão, sendo 59 do hospital intervenção e 59 do hospital controle (37 do controle 1 e 22 no controle 2). No hospital intervenção foram excluídas 29 mães, 20 delas devido dificuldade no seguimento, 03 por óbito do PT, 03 receberam alta sem passar pela unidade canguru, 02 desistiram por piora do estado de saúde do bebê e 01 por uso de drogas relatado pelo companheiro. No hospital controle 1, 12 mães foram excluídas por dificuldades no seguimento, 02 devido óbito do filho PT, 01 desistiu de participar porque não queria ficar sem esmalte por 14 dias e 01 devido uso de hormônio (Puram T4). No hospital controle 2, 14 mães foram excluídas por ausência do segundo corte das unhas e 2 desistiram de participar devido piora do estado de saúde do bebê. Foram excluídas do hospital controle 1 e 2 um total de 30 mães no controle (Figura 9).

Figura 9 - Participantes da pesquisa

4.1 Caracterização das mães participantes

4.1.1 Dados gerais das mães

No presente estudo identificamos que, de modo geral a maioria das mães participantes reside em área urbana (98,4%), é casada ou tem um companheiro com relação estável (51 – 86,4%), completou o ensino médio (26 – 44,1%) e exerce atividade remunerada fora do lar (33 – 55,9%) com renda familiar predominante de até 02 salários mínimo (26 – 61,0%). A idade média das mães foi de 28 anos (DP 7,14) sendo a idade mínima de 15 e máxima de 42 anos.

Como método de prevenção de doença pulmonar preconizado pela OMS, a maior parte das mães (29 – 49,2%) recebeu de 1 a 3 doses de corticoide ao final da gestação diante do risco de parto prematuro.

Os dados sociodemográficos maternos estão apresentados por grupo (canguru e controle) na Tabela 1.

Tabela 1 - Características sociodemográficas das mães, segundo grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Grupo		Características	f	%	% válida	% acumulativa
Estado civil						
Controle	Válido	solteira	3	10,3	10,3	10,3
		casada	14	48,3	48,3	58,6
		união consensual/união estável	12	41,4	41,4	100
		Total	29	100	100	
Canguru	Válido	solteira	5	16,7	16,7	16,7
		casada	11	36,7	36,7	53,3
		união consensual/união estável	14	46,7	46,7	100
		Total	30	100	100	
Escolaridade						
Controle	Válido	ensino fundamental incompleto	3	10,3	10,3	10,3
		ensino fundamental completo	2	6,9	6,9	17,2
		ensino médio incompleto	1	3,4	3,4	20,7
		ensino médio completo	15	51,7	51,7	72,4
		ensino superior incompleto	2	6,9	6,9	79,3
		ensino superior completo	3	10,3	10,3	89,7
		não informado	3	10,3	10,3	100
		Total	29	100	100	

- continua -

- continuação -

Características		f	%	% válida	% acumulativa
Grupo					
Canguru	Válido	ensino fundamental incompleto	8	26,7	26,7
		ensino médio incompleto	6	20,0	46,7
		ensino médio completo	11	36,7	83,3
		ensino superior incompleto	1	3,3	86,7
		ensino superior completo	4	13,3	100
		Total	30	100	
Ocupação					
Controle	Válido	do lar	7	24,1	24,1
		empregada (trabalha fora)	17	58,6	82,8
		desempregada	1	3,4	86,2
		estudante	4	13,8	100
		Total	29	100	
Canguru	Válido	não informado	7	23,3	23,3
		do lar	6	20,0	43,3
		empregada (trabalha fora)	16	53,3	96,7
		estudante	1	3,3	100
		Total	30	100	
Renda Mensal					
Controle	Válido	não informado	4	13,8	13,8
		1 ou menos salário mínimo	2	6,9	20,7
		2 salários mínimo	12	41,4	62,1
		3 ou 4 salário mínimo	10	34,5	96,6
		4 ou mais salários mínimo	1	3,4	100
		Total	29	100	
		não informado	1	3,3	3,3
Canguru	Válido	1 ou menos salário mínimo	12	40,0	43,3
		2 salários mínimo	10	33,3	76,7
		3 ou 4 salário mínimo	6	20,0	96,7
		4 ou mais salários mínimo	1	3,3	100
		Total	30	100	

A maioria das participantes (57 – 96,6%) realizou pré-natal, o número médio de consultas foi cinco, sendo que a maior parte delas (24 – 40,7%) fez os acompanhamentos exclusivamente em unidade básica de saúde (UBS) e hospital (11 – 18,6%) em estabelecimento particular/convênio e as demais realizaram na atenção básica juntamente com outro órgão (hospital, convênio ou particular).

Na Tabela 2 apresentamos os dados por grupo canguru e controle.

Tabela 2 - Dados do pré-natal relacionados a gestação atual das mães, segundo grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Pré-natal			f	%	% válida	% acumulativa
Grupo						
Fez pré-natal						
Controle	Válido	não	1	3,4	3,4	3,4
		sim	28	96,6	96,6	100
		Total	29	100	100,0	
Canguru	Válido	não	1	3,3	3,3	3,3
		sim	29	96,7	96,7	100
		Total	30	100	100	
Local pré-natal						
Controle	Válido	hospital	4	13,8	14,3	14,3
		UBS	20	69,0	71,4	85,7
		convênio/particular	4	13,8	14,3	100
		Total	28	96,6	100	
	Ausente	Sistema	1	3,4		
Total		29	100			
Canguru	Válido	hospital	7	23,3	25,0	25,0
		UBS	4	13,3	14,3	39,3
		hospital + UBC	1	3,3	3,6	42,9
		PSF	8	26,7	28,6	71,4
		PSF+UBS	1	3,3	3,6	75,0
		PSF+hospital	1	3,3	3,6	78,6
		PSF+convênio/particular	2	6,7	7,1	85,7
		convênio/particular	4	13,3	14,3	100
	Total	28	93,3	100		
	Ausente	Sistema	2	6,7		
Total		30	100			

Do total de 59 mães, 37 (62,7%) delas relataram algum tipo de complicações na gravidez atual, sendo a hipertensão (28,8%) e infecção urinária (18,6%) os problemas mais comuns; 09 delas (15,3%) foram internadas durante a gestação.

Os dados maternos relacionados as complicações na gestação atual de acordo com os grupos (controle e canguru) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados maternos relacionados a complicações na gestação atual, segundo grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Grupo		Dados gestacionais		F	%	% válida	% acumulativa
História de complicação na gestação atual							
Controle	Válido	Não	12	41,4	41,4	41,4	
		Sim	17	58,6	58,6	100	
		Total	29	100	100		
Canguru	Válido	Não	10	33,3	33,3	33,3	
		Sim	20	66,7	66,7	100	
		Total	30	100	100		
Hipertensão na gestação atual (HAS, DHEG, SH, Eclâmpsia)							
Controle	Válido	Não	24	82,8	82,8	82,8	
		Sim	5	17,2	17,2	100	
		Total	29	100,0	100,0		
Canguru	Válido	Não	18	60,0	60,0	60,0	
		Sim	12	40,0	40,0	100	
		Total	30	100	100		
Infecção urinária na gestação atual							
Controle	Válido	Não	21	72,4	72,4	72,4	
		Sim	8	27,6	27,6	100	
		Total	29	100,0	100,0		
Canguru	Válido	Não	27	90,0	90,0	90,0	
		Sim	3	10,0	10,0	100	
		Total	30	100	100		
Hospitalização na gestação atual							
Controle	Válido	Não	26	89,7	89,7	89,7	
		Sim	3	10,3	10,3	100	
		Total	29	100,0	100,0		
Canguru	Válido	Não	24	80,0	80,0	80,0	
		Sim	6	20,0	20,0	100	
		Total	30	100	100		

HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica; DHEG = Doença Hipertensiva Específica da Gravidez; SH = Síndrome Hellp.

As participantes da pesquisa foram questionadas sobre a vivência de estresse durante a gestação com questão dicotômica (sim ou não) e a maioria delas respondeu afirmativamente, 33 (55,9%), sendo que os estressores mais comuns relatados foram: 08 (13,6%) problemas com o pai do bebê, 04 (6,8%) problemas no trabalho e 03 (5,1%) problemas financeiros.

A Tabela 4 contém dados sobre estresse vivenciado na gestação atual nos grupos canguru e controle.

Tabela 4 - Dados maternos relacionados ao estresse na gestação atual, segundo grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Grupo	Estresse na gestação		f	%	% válida	% acumulativa
Estresse na gestação relatado pela mãe						
Controle		Não	7	24,1	35,0	35,0
		Sim	13	44,8	65,0	100
		Total	20	69,0	100	
	Ausente	Sistema	9	31,0		
		Total	29	100		
Canguru		Não	8	26,7	28,6	28,6
		Sim	20	66,7	71,4	100
		Total	28	93,3	100	
	Ausente	Sistema	2	6,7		
		Total	30	100		
Estresse com pai do bebê durante a gestação						
Controle		Não	26	89,7	89,7	89,7
		Sim	3	10,3	10,3	100
		Total	29	100	100	
Canguru		Não	25	83,3	83,3	83,3
		Sim	5	16,7	16,7	100
		Total	30	100	100	
Estresse financeiro durante a gestação						
Controle		Não	28	96,6	96,6	96,6
		Sim	1	3,4	3,4	100
		Total	29	100	100	
Canguru		Não	28	93,3	93,3	93,3
		Sim	2	6,7	6,7	100
		Total	30	100	100	
Estresse no trabalho durante a gestação						
Controle		Não	27	93,1	93,1	93,1
		Sim	2	6,9	6,9	100
		Total	29	100	100	
Canguru		Não	28	93,3	93,3	93,3
		Sim	2	6,7	6,7	100
		Total	30	100	100	

Dados clínicos gerais referentes a história gestacional pregressa mostraram que 16,9% das mães tiveram história de aborto, 8,5% natimorto e 13,6% parto prematuro anterior. Quando distribuídos esses dados por grupo (canguru e controle), verificamos que o grupo canguru apresentou maior número de intercorrências nas gestações anteriores (aborto, natimorto, parto prematuro), conforme constam na Tabela 5.

Tabela 5 - História gestacional pregressa de intercorrências apresentadas pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

História gestacional			F	%	% válida	% acumulativa
Grupo						
Aborto anterior sim ou não						
Controle		Não	19	65,5	90,5	90,5
		Sim	2	6,9	9,5	100
		Total	21	72,4	100	
	Ausente	Sistema	8	27,6		
		Total	29	100		
Canguru		Não	21	70,0	72,4	72,4
		Sim	8	26,7	27,6	100
		Total	29	96,7	100	
	Ausente	Sistema	1	3,3		
		Total	30	100		
Natimorto anterior sim ou não						
Controle		Não	21	72,4	100	100
		Sim	0	0,0		
		Sistema	8	27,6		
	Total	29	100			
Canguru		Não	24	80,0	82,8	82,8
		Sim	5	16,7	17,2	100
		Total	29	96,7	100	
	Ausente	Sistema	1	3,3		
		Total	30	100		
Parto prematuro em gestação anterior						
Controle		Não	21	72,4	100	100
		Sim	0	0,0		
		Sistema	8	27,6		
	Total	29	100			
Canguru		Não	21	70,0	72,4	72,4
		Sim	8	26,7	27,6	100
		Total	29	96,7	100	
	Ausente	Sistema	1	3,3		
		Total	30	100		

4.2 Estresse crônico na gestação materna

Conforme citado anteriormente, optamos apresentar os resultados das análises dos níveis do Cortisol e DHEA em picograma por miligrama (pg/mg) visto ser essa a unidade de medida mais utilizada em estudos encontrados sobre o assunto. Eventualmente citamos alguns dados em nanomol por grama (nmol/g) para comparações com algumas informações encontradas na literatura, facilitando o entendimento dos leitores. Reforçando-se que esses

resultados da primeira amostra de unhas referem-se ao estresse submetido nos últimos três meses antes da coleta, portanto, no último trimestre da gestação (T1).

Foi possível fazer a análise do cortisol nas unhas das 59 mães participantes da pesquisa, mas um valor extremo não foi reconhecido pelo equipamento de medida (participante n. 53 no T1). A DHEA foi analisada nas unhas de todas as 59 mães, porém, dois valores extremos foram reconhecidos (>3000 pg/mg), mas não se sabe se esse valor foi erro de análise, pois o valor exato não foi fornecido pelo equipamento de medida, portanto, foram excluídos (participantes n. 54 no T1 e n. 39 no T2). Os demais *outliers*, cujos números foram identificados na pesquisa, foram mantidos no estudo, visto que, após análise retirando esses valores, não mostrou alteração estatística nos resultados.

O cortisol gestacional médio geral das 59 participantes foi de 11,31 pg/mg (DP 30,14), sendo o mínimo 2,68 e máximo 202,21 pg/mg. A DHEA médio foi de 43,69 pg/mg (DP 38,34), sendo o mínimo 11,95 e máximo 234,27 pg/mg. A relação média da razão Cort:DHEA foi de 0,58 pg/mg (DP 1,84), mínimo de 0,02 e máximo de 10,22 pg/mg. Transformando tais dados em outra unidade de medida, o cortisol gestacional médio geral foi de 0,3121 nmol/g (DP 0,0831 nmol/g) e a DHEA médio foi de 0,1514 nmol/g (DP 0,1329 nmol/g) e a razão Cort:DHEA foi de 0,3354 nmol/g (DP 1,1023 nmol/g).

Os valores de cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA em picograma por miligrama (pg/mg) apresentados no Tempo 1 (T1) relativos à gestação das mães dos grupos canguru e controle constam na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores originais de cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA (pg/mg) relativos à gestação (T1) das mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Grupo	N Obs	N	$\bar{x}$	DP	IC 95 (%) $\bar{x}$		Mín	1º Q	Mediana	3º Q	Máx
CORT											
Canguru	30	29	13,05	36,65	-0,89	26,99	2,98	4,36	5,2	6,43	202,21
Controle	29	29	9,57	22,37	1,07	18,08	2,68	3,6	5,73	6,93	125,34
DHEA											
Canguru	30	29	43,87	33,39	31,16	56,57	13,9	24,31	32,99	47,62	172,05
Controle	29	29	43,51	43,32	27,03	59,99	11,95	15,55	35,02	48,53	234,27
CORT:DHEA											
Canguru	30	28	0,3	0,58	0,07	0,52	0,02	0,11	0,16	0,22	3,18
Controle	29	29	0,54	1,87	-0,17	1,25	0,03	0,09	0,16	0,26	10,22

$\bar{x}$ = média aritmética; DP = Desvio Padrão; Min = mínimo; Max = máximo; Q = quartil; T1= tempo 1

Com base no teste U de Mann-Whitney de amostras independentes, constatamos que não diferença estatisticamente significativa entre os grupos canguru e controle em relação ao Cortisol ($p=0,67$), DHEA ($p=0,52$) e razão Cort:DHEA ($p=0,92$) na gestação (Tabela 7). Apesar disso, nos Gráficos 1 a 3 observamos maior variabilidade do cortisol do grupo canguru e da DHEA e razão Cort:DHEA no grupo controle.

Tabela 7 - Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes entre os grupos canguru e controle em relação ao cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA na gestação (T1), Ribeirão Preto, 2016

	Cortisol T1 (pg/mg)	DHEA T1 (pg/mg)	Cort:DHEA T1 (pg/mg)
Mann-Whitney U	393,000	380,000	428,000
Wilcoxon W	828,000	815,000	893,000
Z	-0,428	-0,630	-0,106
Sig. Assint. (2 caudas)	0,67	0,52	0,92

a. Variável de agrupamento: grupo controle e canguru

Gráfico 1 - Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) do cortisol nas unhas relativos à gestação (T1) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016

Gráfico 2 - Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) de DHEA nas unhas relativos à gestação (T1) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016

Gráfico 3 - Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) da razão Cort:DHEA nas unhas relativos à gestação (T1) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016

4.3 Estresse percebido pelas mães na gestação

ESCALA PSS-10 no T1

Na Tabela 8 apresentamos o escore médio de estresse percebido através da escala PSS-10, no tempo 1 (T1) relacionado ao último trimestre de gestação, apontado por todas as mães participantes e a distribuição desses escores entre os grupos canguru e controle. Na comparação entre grupos, constatamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os escores ($p > 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 8 - Escore médio de estresse percebido através da escala PSS-10 no Tempo 1 (T1) geral, segundo os grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Grupo	N	N	$\bar{x}$	DP	IC 95(%)		Mín	1ºQ	Mediana	3ºQ	Máx
	Obs				$\bar{x}$						
canguru	30	30	19,63	6,89	17,06	22,2	6	15	20,5	25	32
controle	29	28	19,68	7,07	16,94	22,42	6	15	18	24	37

$\bar{x}$ = média aritmética; DP = Desvio Padrão; Mín = mínimo; Max = máximo; Q = Quartil

Tabela 9 - Teste Mann-Whitney U referente a escala PSS-10 no Tempo 1 (T1), Ribeirão Preto, 2016^a

PSS-10 TOTAL - Tempo 1	
Mann-Whitney U	407,500
Wilcoxon W	813,500
Z	-0,195
Sig. Assint. (2 caudas)	0,846

a. Variável de agrupamento: grupo controle e canguru

4.4 Estresse crônico no puerpério materno

O estresse crônico no puerpério, apresentado a seguir, foi dimensionado por meio da dosagem dos níveis de cortisol e DHEA na segunda coleta de unhas das mães referente aos três meses pós-parto prematuro (T2), incluindo a vivência na internação do bebê PT e no domicílio.

CORTISOL, DHEA E RAZÃO CORT: DHEA

O cortisol médio no puerpério (T2) foi de 6,20 pg/mg (DP 8,29), sendo o mínimo 0,53 e máximo 58,43 pg/mg. A DHEA médio foi de 2,47 pg/mg (DP 23,78), sendo o mínimo de 1,64 e máximo de 127,19 pg/mg. A razão média de Cort:DHEA foi de 0,240 pg/mg (DP 0,0308), mínimo de 0,030 e máximo de 2,061 pg/mg. Ao transformar a unidade de medida, o cortisol puerperal médio foi de 0,0171 nmol/g (DP 0,0228) e a DHEA médio foi de 0,1125 nmol/g (DP 0,0824) e a razão Cort:DHEA 0,1930 nmol/g (DP 0,2471).

Na Tabela 10 exibimos os valores do cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA em picograma por miligrama (pg/mg) no puerpério materno (T2), nos grupos canguru e controle.

Tabela 10 - Valores originais do cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA (pg/mg) no puerpério (T2) das mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Grupo	N Obs	N	$\bar{x}$	DP	IC 95 (%) $\bar{x}$		Mín	1ºQ	Mediana	3ºQ	Máx
CORT											
Canguru	30	30	7,22	10,69	3,22	11,21	1,79	3,29	4,24	5,39	58,43
Controle	29	29	5,15	4,66	3,38	6,92	0,53	3,08	3,95	5,37	24,35
DHEA											
Canguru	30	29	34,42	26,4	24,38	44,47	9,99	17,33	21,18	53,91	127,19
Controle	29	29	30,52	21,12	22,48	38,55	1,64	18,51	24,8	34,77	113,69
Cort:DHEA											
Canguru	30	29	0,27	0,39	0,12	0,42	0,03	0,1	0,16	0,26	2,06
Controle	29	29	0,22	0,2	0,14	0,29	0,03	0,12	0,15	0,2	0,98

$\bar{x}$ = média aritmética; DP = Desvio Padrão; Mín = mínimo; Max = máximo; Q = Quartil

Comparamos os grupos canguru e controle quanto aos valores do Cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA no puerpério (T2), utilizando o Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos canguru e controle (Tabela 11).

Tabela 11 - Teste U de Mann-Whitney comparando os grupos^a canguru e controle quanto aos valores do cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA no puerpério materno (T2), Ribeirão Preto, 2016

	Cortisol T2 (pg/mg)	DHEA T2 (pg/mg)	Cort:DHEA T2 Relação (pg/mg)
Mann-Whitney U	386,000	418,000	435,000
Wilcoxon W	821,000	853,000	900,000
Z	-0,743	-0,039	0,000
Sig. Assint. (2 caudas)	0,458	0,969	1,000

a. Variável de agrupamento: grupo controle e canguru

A maior variabilidade quanto aos níveis de cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA no puerpério materno (T2) foi verificada no grupo canguru (Gráficos 4 a 6).

Gráfico 4 - Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) de Cortisol nas unhas relativos ao puerpério (T2) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016.

Gráfico 5 - Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) de DHEA nas unhas relativos ao puerpério (T2) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016

Gráfico 6 - Valores do nível médios e respectivos intervalos de confiança (95%) da razão Cort:DHEA nas unhas relativos ao puerpério (T2) das mães dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016

4.5 Estresse percebido pelas mães no puerpério

Conforme descrito anteriormente, a PSS-10 tem como referência o estresse percebido pelas mães em período anterior de 4 a 8 semanas, portanto, a segunda coleta realizada por ocasião da alta do filho PT da unidade neonatal corresponde ao período de puerpério materno.

ESCALA PSS-10 NO T2

Apresentamos o escore médio da escala PSS-10 das participantes dos grupos canguru e controle quanto ao estresse percebido relacionado ao estresse na alta da unidade neonatal (Tabela 12). Não foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos canguru e controle (Tabela 13).

Tabela 12 - Escores da escala PSS-10 relacionado ao estresse percebido no puerpério (T2) pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Grupo	N Obs	N	$\bar{x}$	DP	IC 95 (%) $\bar{x}$		Mín	1° Q	Mediana	3° Q	Máx
Canguru	30	26	16,42	6,87	13,65	19,2	0	12	17,5	22	26
Controle	29	27	18,11	5,95	15,76	20,47	6	14	18	23	31

$\bar{x}$ = média aritmética; DP = Desvio Padrão; Mín = mínimo; Max = máximo; Q = Quartil

Tabela 13 - Teste Mann-Whitney U referente a escala PSS-10 no Tempo 2 (T2), Ribeirão Preto, 2016^a

	PSS-10 TOTAL Tempo 2
Mann-Whitney U	310,000
Wilcoxon W	661,000
Z	-0,731
Sig. Assint. (2 caudas)	0,465

a. Variável de agrupamento: grupo controle e canguru

4.6 Estresse materno na hospitalização do bebê PT

Apresentamos do estresse materno relativo a vivência durante a hospitalização do filho PT na unidade neonatal coletado pela escala PSS:NICU e respectiva subescala, em dois momentos: na primeira semana após o nascimento prematuro (T1) e na última semana antes da alta do bebê PT (T2).

Na análise do estresse vivenciado pelas mães na unidade neonatal utilizando o escore total da escala PSS:NICU na primeira semana de internação do filho PT (T1), verificamos que o nível médio de estresse foi de 3,19 (DP 1,05) e 3,08 (DP 1,04), utilizando a métrica 1 (M1) e métrica 2 (M2), respectivamente. Reaplicando a escala na última semana de internação do filho na unidade neonatal (T2), a média de escore de estresse foi de 2,50 (DP 1,40) e 2,18 (DP 1,18), utilizando a métrica 1 (M1) e métrica 2 (M2), respectivamente. Assim, no geral, o nível de estresse foi moderado na primeira semana de internação do bebê PT e entre moderado e pouco estresse na alta hospitalar.

4.6.1 Escala PSS:NICU no T1

Os dados relativos ao estresse vivenciados pelas mães dos grupos canguru e controle durante a primeira semana de internação do bebê PT na unidade neonatal (T1), com base no escore total da escala PSS:NICU, estão apresentados na Tabela 14. O escore médio de estresse demonstrado pelas mães do grupo canguru foi de 3,17 (DP 1,26) e 3,1 (DP 1,25), utilizando as métricas 1 (M1) e 2 (M2), respectivamente, enquanto no grupo controle foi de 3,22 (DP 0,8) e 3,07 (DP 0,79), utilizando as métricas 1 (M1) e 2 (M2), respectivamente. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos canguru e controle no T1 (Tabela 15).

Tabela 14 - Escores da escala PSS:NICU, nas Métricas 1 (M1) e 2 (M2), relacionados ao estresse manifestado na primeira semana (T1) pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

	Grupo	N Obs	N	$\bar{x}$	DP	IC 95 (%) para $\bar{x}$		Mín	1º Q	Mediana	3º Q	Máx
M1	Canguru	30	30	3,17	1,26	2,7	3,64	1	2,12	3,34	4,32	4,94
	Controle	29	28	3,22	0,8	2,91	3,53	1,71	2,67	3,39	3,83	4,53
M2	Canguru	30	30	3,1	1,25	2,64	3,57	1	2,03	2,93	4,31	4,94
	Controle	29	28	3,07	0,79	2,77	3,38	1,7	2,48	3,18	3,76	4,53

$\bar{x}$ = média aritmética; DP = Desvio Padrão; Mín = mínimo; Máx = máximo; Q = Quartil, Métrica 1 (M1) = nível de Ocorrência de Estresse, Métrica 2 (M2) = nível geral de estresse do ambiente.

Tabela 15 - Mann-Whitney U referente a escala PSS:NICU no Tempo 1 de acordo com as Métricas 1 (M1) e 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016^a

	PSS:NICU M1	PSS:NICU M2
Mann-Whitney U	408,000	404,000
Wilcoxon W	814,000	810,000
Z	-0,187	-0,249
Sig. Assint. (2 caudas)	0,852	0,803

a. Variável de agrupamento: grupo controle e canguru

4.6.1.1 Subescala da PSS:NICU no T1

A análise das subescalas da PSS:NICU em mães dos grupos canguru e controle mostrou que em ambos os grupos o maior gerador de estresse foi a subescala alteração no papel de pais, tanto no uso métrica 1 (M1) como métrica 2 (M2), atingindo escores 4 compatíveis com muito estresse (Tabela 16). Não houve diferença significativa entre os grupos canguru e controle (Tabela 17).

Tabela 16 - Escores da subescalas Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS:NICU, nas Métricas 1 (M1) e 2 (M2), relacionados ao estresse manifestado na primeira semana (T1) pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Variável	Grupo	N	$\bar{x}$	DP	Erro padrão da média
Sons e imagens					
M1	Canguru	30	2,74	1,36	0,25
	Controle	28	2,45	0,84	0,16
M2	Canguru	30	2,73	1,31	0,24
	Controle	28	2,33	0,86	0,16
Aparência e comportamento do bebê					
M1	Canguru	30	2,96	1,55	0,28
	Controle	28	3,16	0,98	0,19
M2	Canguru	30	2,86	1,50	0,27
	Controle	28	2,87	1,00	0,19
Alteração do papel de pais					
M1	Canguru	30	3,81	1,33	0,24
	Controle	28	4,04	1,02	0,19
M2	Canguru	30	3,71	1,33	0,24
	Controle	28	4,03	1,04	0,20

Métrica 1 (M1) = nível de Ocorrência de Estresse; Métrica 2 (M2) = nível geral de estresse do ambiente.

Tabela 17 - Mann-Whitney U das subescalas Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS:NICU no Tempo 1 de acordo com as Métricas 1 (M1) e 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016

	Sons imagens M1	Aparência bebe sub M1	Alteração Papel pais M1	Sons imagens M2	Aparência bebe sub M2	Alteração Papel pais M2
Mann-Whitney U	354,500	398,500	410,000	356,000	406,000	390,000
Wilcoxon W	760,500	863,500	875,000	762,000	871,000	855,000
Z	-1,021	-0,335	-0,157	-0,998	-0,218	-0,471
Sig. Assint. (2 caudas)	0,307	0,738	0,875	0,318	0,827	0,638

a. Variável de agrupamento: grupo controle e canguru; Métrica 1 (M1) = nível de Ocorrência de Estresse; Métrica 2 (M2) = nível geral de estresse do ambiente.

4.6.2 Escala PSS:NICU no T2

Por ocasião da alta do bebê PT da unidade neonatal (T2), o escore médio de estresse demonstrado pelas mães do grupo canguru foi de 1,66 (DP 1,25) e 1,31 (DP 0,4), utilizando as Métricas 1 (M1) e 2 (M2), respectivamente. O escore médio de estresse demonstrado pelas mães do grupo controle foi de 3,46 (DP 0,86) e 3,16 (DP 0,98), utilizando as métricas 1 (M1) e 2 (M2) respectivamente (Tabela 18). O resultado mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos canguru e controle, sendo maior os escores no grupo controle, no momento da alta do PT da unidade neonatal (Tabela 19).

Tabela 18 - Escores da escala PSS:NICU, nas Métricas 1 (M1) e 2 (M2), relacionados ao estresse manifestado na alta (T2) pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

	Grupo	N Obs	N	$\bar{x}$	DP	IC 95 (%) para $\bar{x}$		Mín	1° Q	Mediana	3° Q	Máx
M1	Canguru	30	28	1,66	1,25	1,18	2,14	0	0,71	1,22	2,46	4,61
	Controle	29	25	3,46	0,86	3,11	3,82	1,58	2,80	3,75	4,01	4,90
M2	Canguru	30	28	1,31	0,40	1,16	1,47	1	1	1,14	1,54	2,54
	Controle	29	25	3,16	0,98	2,76	3,57	1,21	2,48	3,35	3,96	4,90

$\bar{x}$ = média aritmética; DP = Desvio Padrão; Min = mínimo; Max = máximo; Q = quartil; Métrica 1 (M1) = nível de ocorrência de estresse; Métrica 2 (M2) = nível geral de estresse do ambiente.

Tabela 19 - Mann-Whitney U referente a escala PSS:NICU no Tempo 2 de acordo com as Métricas 1 (M1) e 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016^a

	PSS:NICU M1	PSS:NICU M2
Mann-Whitney U	89,000	27,000
Wilcoxon W	495,000	433,000
Z	-4,653	-5,781
Sig. Assint. (2 caudas)	0,000	0,000

a. Variável de agrupamento: grupo controle e canguru; Métrica 1 (M1) = nível de ocorrência de estresse; Métrica 2 (M2) = nível geral de estresse do ambiente.

4.6.2.1 Subescala da PSS:NICU no T2

Da análise das subescalas da PSS:NICU na alta do bebê PT da unidade neonatal (T2), o maior causador de estresse nas mães do grupo controle foi em relação ao Papel dos pais, tanto na métrica 1 (4,12 – DP 0,89) como na métrica 2 (3,77 – DP 1,11), caracterizando a vivência materna como muito estresse (Tabela 20).

No geral, as mães do grupo canguru apresentaram pouco ou nenhum estresse nas três subescalas da PSS:NICU, com escores médios variando de 1,24 (DP 0,39) a 1,92 (DP 1,36), obtidos, respectivamente, na métrica 2 da subescala Sons e imagens do ambiente neonatal e na métrica 1 em Aparência e comportamento do bebê PT.

Foi constatada diferença significativa entre os grupos canguru e controle ($p=0,00$) nas três subescalas da PSS:NICU (Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais) (Tabela 21).

Tabela 20 - Escores da subescalas Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS: NICU, nas Métricas 1 (M1) e 2 (M2), relacionados ao estresse manifestado na alta (T2) pelas mães dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Variável	Grupo	N	$\bar{x}$	DP	Erro padrão da média
Sons e imagens					
M1	Canguru	28	1,48	1,23	0,23
	Controle	25	3,07	1,04	0,21
M2	Canguru	28	1,24	0,39	0,07
	Controle	25	2,90	1,03	0,21
Aparência e comportamento do bebê					
M1	Canguru	28	1,92	1,36	0,26
	Controle	25	3,19	1,14	0,23
M2	Canguru	28	1,40	0,53	0,10
	Controle	25	2,82	1,21	0,24
Alteração do papel de pais					
M1	Canguru	28	1,58	1,68	0,32
	Controle	25	4,12	0,89	0,18
M2	Canguru	28	1,30	0,47	0,09
	Controle	25	3,77	1,11	0,22

Métrica 1 (M1) fornece o nível de estresse em que a situação ocorre ou nível de ocorrência de estresse; Métrica 2 (M2) calcula o nível geral de estresse do ambiente.

Tabela 21 - Mann-Whitney U das subescalas Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS: NICU no Tempo 2 de acordo com as Métricas 1 (M1) e 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016^a

	Sons imagens M1	Aparência bebê sub M1	Alteração papel pais M1	Sons imagens M2	Aparência bebê sub M2	Alteração papel pais M2
Mann-Whitney U	99,500	172,500	92,000	40,500	93,000	19,500
Wilcoxon W	505,500	578,500	498,000	446,500	499,000	425,500
Z	-4,493	-3,170	-4,626	-5,616	-4,608	-5,991
Sig. Assint. (2 caudas)	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000

a. Variável de agrupamento: grupo controle e canguru, Métrica 1 (M1) fornece o nível de estresse em que a situação ocorre ou nível de ocorrência de estresse; Métrica 2 (M2) calcula o nível geral de estresse do ambiente.

4.6.3 Comparação da escala PSS:NICU no T1 e T2

Investigamos a diferença dos escore da escala PSS:NICU apresentado pelas mães durante o tempo de internação do bebê na unidade neonatal, ou seja, entre o tempo 1 (primeira semana do PT na unidade neonatal) e o tempo 2 (alta do PT) através do teste não paramétrico Wilcoxon (*Wilcoxon Signed Ranks Test*), nos grupos canguru e controle. A diferença negativa dos escores da PSS:NICU entre T2 e T1 sinaliza que tanto as mães do grupo canguru como aquelas do controle apresentaram menos estresse por ocasião da alta do bebê PT em comparação com o obtido na primeira semana de internação do PT na unidade neonatal, utilizando as métricas 1 e 2. Todavia, a diferença no escore não foi significativa no grupo controle ($p>0,05$), mas o escore médio da escala PSS:NICU na alta foi significativamente diferente daquele na primeira semana do PT na unidade neonatal no grupo canguru, tanto na métrica 1 quanto na métrica 2 ($p=0,000$) (Tabela 22).

Tabela 22 - Teste de Wilcoxon referente a diferença na escala PSS:NICU nos Tempos 1 e 2 (T2 – T1), obtidos pelas mães dos grupos canguru e controle nas métricas 1 (M1) e 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016^a

Grupo		PSS:NICU T2 - T1 M1	PSS:NICU T2 - T1 M2
Controle	Z	-1,399 ^b	-0,700 ^b
	Sig. Assint. (2 caudas)	0,162	0,484
Canguru	Z	-3,916 ^c	-4,349 ^c
	Sig. Assint. (2 caudas)	0,000	0,000

a. Wilcoxon Signed Ranks Test; b. Com base em postos negativos; c. Com base em postos positivos.

Comparamos também a diferença dos escores das subescalas da PSS:NICU apresentados pelas mães nos tempos 1 e 2 (T2 – T1) através do teste não paramétrico Wilcoxon (*Wilcoxon Signed Ranks Test*) nos grupos canguru e controle. Os resultados mostraram que no grupo canguru os escores das três subescalas na alta foram significativamente diferentes daqueles obtidos na primeira semana de internação do PT na unidade neonatal, na M1 ($p=0,00$). O grupo controle não mostrou diferença entre os tempos nas subescalas Alteração do papel de pais e Aparência e comportamento do bebê ($p>0,05$), porém na subescala Sons e imagens a diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,005$).

Nas tabelas 23 e 24 apresentamos os dados dos testes Wilcoxon realizados utilizando a métrica 1 e 2 respectivamente.

Tabela 23 - Teste de Wilcoxon a diferença na subescala Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS:NICU nos Tempos 1 e 2 (T2 – T1), obtidos pelas mães dos grupos canguru e controle na métrica 1 (M1), Ribeirão Preto, 2016^a

Grupo		Sons imagens T2 – T1 M1	Aparência bebê T2 – T1 M1	Alteração papel pais T2 – T1 M1
Controle	Z	-2,809 ^b	-0,243 ^c	-0,139 ^c
	Sig. Assint. (2 caudas)	0,005	0,808	0,889
Canguru	Z	-3,439 ^c	-3,286 ^c	-3,836 ^c
	Sig. Assint. (2 caudas)	0,001	0,001	0,000

a. Wilcoxon Signed Ranks Test; b. Com base em postos negativos; c. Com base em postos positivos.

Tabela 24 - Teste de Wilcoxon a diferença na subescala Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais da PSS:NICU nos Tempos 1 e 2 (T2 – T1), obtidos pelas mães dos grupos canguru e controle na métrica 2 (M2), Ribeirão Preto, 2016^a

Grupo		Sons imagens T2 – T1 M2	Aparência bebê T2 – T1 M2	Alteração papel pais T2 – T1 M2
Controle	Z	-2,435 ^b	-0,081 ^c	-1,186 ^c
	Sig. Assint. (2 caudas)	0,015	0,935	0,236
Canguru	Z	-4,003 ^c	-3,943 ^c	-4,358 ^c
	Sig. Assint. (2 caudas)	0,000	0,000	0,000

a. Wilcoxon Signed Ranks Test; b. Com base em postos negativos; c. Com base em postos positivos.

4.7 Comparação do estresse materno na gestação e no puerpério

As comparações feitas referem-se ao estresse crônico (cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA) e ao estresse percebido pelas mães (PSS-10) na gestação (T1) e no puerpério (T2).

4.7.1 Cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA

Os valores médios dos níveis de cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA identificados nas unhas das mães foram submetidos à transformação. Para determinar a melhor transformação para as variáveis do estudo foi utilizada a análise de Box-Cox. Para as correspondentes variáveis das mães, os resultados dos gráficos que tiveram no intervalo de confiança para λ (lambda) a inclusão do 0 foi considerado favorável à transformação logarítmica. A variável cortisol (em T1) mostra que o intervalo de confiança compreendeu o valor de -1, indicando que nesse caso a transformação inversa é a mais adequada. Enquanto que para as variáveis DHEA e razão Cort:DHEA (em T2) a transformação logarítmica mostrou-se a mais adequada pois nessas duas variáveis do estudo o intervalo de confiança para λ (lambda) compreendeu o valor 0, o que indica que a transformação logarítmica pode ser utilizada.

Apresentamos na Tabela 25 os dados originais do cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA das unhas das mães no T1 e T2 e, na Tabela 26, os dados transformados.

Tabela 25 - Dados originais de cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA em T1 e T2, Ribeirão Preto, 2016

	Tempo	N	$\bar{x}$	DP	Erro padrão da média
Canguru					
Cortisol	T1	29	13,05	36,65	6,81
	T2	30	7,22	10,69	1,95
DHEA	T1	29	43,87	33,39	6,20
	T2	29	34,42	26,40	4,90
Cort:DHEA	T1	30	0,30	1,85	0,34
	T2	30	0,27	0,39	0,07
Controle					
Cortisol	T1	29	9,58	22,37	4,15
	T2	29	5,15	4,66	0,87
DHEA	T1	29	43,51	43,32	8,04
	T2	29	30,51	21,12	3,92
Cort:DHEA	T1	29	0,54	1,87	0,35
	T2	29	0,22	0,20	0,04

Tabela 26 - Dados transformados do cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA em T1 e T2, Ribeirão Preto, 2016

	Tempo	N	$\bar{x}$	DP	Erro padrão da média
Canguru					
Cortisol (Inversa)	T1	29	0,19	0,07	0,02
	T2	30	0,25	0,13	0,01
DHEA (Log10)	T1	29	1,56	0,33	0,065
	T2	29	1,44	0,32	0,059
Cort:DHEA (Log10)	T1	30	-0,74	0,47	0,087
	T2	30	-0,78	0,31	0,058
Controle					
Cortisol (Inversa)	T1	29	0,20	0,08	0,06
	T2	29	0,31	0,32	0,02
DHEA (Log10)	T1	29	1,51	0,26	0,049
	T2	29	1,39	0,29	0,054
Cort:DHEA (Log10)	T1	29	-0,75	0,52	0,096
	T2	29	-0,78	0,38	0,069

$\bar{x}$ = média; DP = Desvio Padrão; Inversa = transformação inversa; Log10 = transformação logarítmica 10

Nos gráficos *boxsplot* 7 a12 constam os valores originais e transformados do cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA.

Gráfico 7 - Diagrama em caixa do cortisol das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (dados originais)

Gráfico 8 - Diagrama em caixa do cortisol das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (transformação Inversa)

Gráfico 9 - Diagrama em caixa do DHEA das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (dados originais)

Gráfico 10 - Diagrama em caixa do DHEA das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (transformação Log10)

Gráfico 11 - Diagrama em caixa da razão Cort:DHEA das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (dados originais)

Gráfico 12 - Diagrama em caixa da razão Cort:DHEA das unhas das mães nos grupos canguru e controle em T1 e T2 (transformação Log10)

Comparamos o estresse crônico apresentado na gestação (T1) e no período puerperal (T2) utilizando o teste Wilcoxon com os dados originais (Tabela 27). O resultado mostrou que o cortisol ($p=0,028$) e a DHEA ($p=0,034$) das unhas das mães do grupo canguru apresentaram diferença estatisticamente significativa. Nas mães do grupo controle foi verificada diferença significativa apenas entre o cortisol do puerpério em relação a gestação ($p=0,007$). A razão Cort:DHEA entre esses dois períodos não diferiu significativamente no grupo canguru ($p=0,530$) e nem no controle ($p=0,538$).

Tabela 27 - Dados Wilcoxon do cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA (pg/mg) no T1 e T2 dos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016^a

Grupo		Cortisol T2 – T1	DHEA T2 – T1	Cort:DHEA T2 – T1
Controle	Z	-2,714 ^b	-1,741 ^b	-0,616 ^b
	Sig. Assint. (2 caudas)	0,007	0,082	0,538
Canguru	Z	-2,195 ^b	-2,118 ^b	-0,627 ^c
	Sig. Assint. (2 caudas)	0,028	0,034	0,530

a. Wilcoxon Signed Ranks Test; b. Com base em postos positivos; c. Com base em postos negativos.

Realizado as análises dos tempos e grupos utilizando Modelos Mistos. As estimativas do cortisol, DHEA e da razão Cort:DHEA mostraram que para o Tempo T2 o aumento médio no inverso do cortisol foi de 0,0848 pg/mg em relação ao tempo T1; a variância intra-indivíduo do inverso do cortisol foi de 0,0040. O Tempo 2 foi significativamente menor que o T1, porém, não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$) (transformação inversa). Para o logaritmo da DHEA tem-se que para o Tempo T2 a redução média foi de 0,1179 pg/mg em relação ao T1; a variância intra-indivíduo do logaritmo da DHEA foi de 0,0281. O Tempo 2 foi significativamente menor que o T1, mas não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos (transformação Log10). Para o Tempo T2 a redução média no logaritmo da razão Cort:DHEA foi de 0,0324; a variância intra-indivíduo do logaritmo da razão Cort:DHEA foi de 0,0810. Não foi constada diferença significativa entre tempos e grupos (transformação Log 10).

4.7.2 Estresse percebido PSS-10 pelas mães na gestação e no puerpério

Da análise do estresse percebido pelas mães na gestação e no puerpério ou alta do bebê PT da unidade neonatal, utilizando a escala PSS-10, verificamos que na gestação o escore foi um pouco maior que no período puerperal, tanto no grupo controle quanto no grupo canguru (Tabela 28), mas a diferença não foi estatisticamente significativa no grupo canguru ($p=0,091$) e nem no controle ($p=0,273$) (Tabela 29).

Tabela 28 - Médias dos escores da escala PSS-10 apresentado pelas mães dos grupos controle e canguru na gestação (T1) e no puerpério (T2), Ribeirão Preto, 2016

Variável	Grupo	N	$\bar{x}$	DP	Erro padrão da média
PSS-10 no T1	Controle	28	19,68	7,066	1,335
	Canguru	30	19,63	6,886	1,257
PSS-10 no T2	Controle	27	18,11	5,951	1,145
	Canguru	26	16,42	6,871	1,348

Tabela 29 - Dados Wilcoxon da escala PSS-10 no T1 e T2, Ribeirão Preto, 2016^a

Grupo		PSS-10 T2 – T1
Controle	Z	-1,096 ^b
	Sig. Assint. (2 caudas)	0,273
Canguru	Z	-1,690 ^b
	Sig. Assint. (2 caudas)	0,091

a. Wilcoxon Signed Ranks Test; b. Com base em postos positivos.

4.8 Correlação entre as medidas de estresse materno

4.8.1 Cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA com escalas PSS-10 e PSS:NICU

Investigamos as relações entre as variáveis cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA e a escala PSS-10 na gestação (T1) por meio do teste de Spearman e o resultados obtidos não mostraram associações estatisticamente significantes, conforme descrito a seguir: a escala PSS-10 não mostrou associação com o cortisol T1 ($\rho = -0,086$; $p = 0,524$), a DHEA T1 ($\rho = -0,048$; $p = 0,725$) e a razão Cort:DHEA ($\rho = -0,015$; $p = 0,909$) analisando significância em duas extremidades.

Sobre o estresse materno no puerpério (T2) investigamos as relações entre o cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA e a escala PSS:NICU nas métricas 1 e 2, por meio do coeficiente de correlação de Spearman, e constatamos inexistência de correlação entre as comparações realizadas: escala PSS:NICU na M1 com cortisol ($\rho = -0,147$; $p = 0,294$), com DHEA ($\rho = -0,034$; $p = 0,813$) e com a razão Cort:DHEA/T2 ($\rho = 0,032$; $p = 0,822$); PSS:NICU na M2 com cortisol ($\rho = -0,189$; $p = 0,175$), com DHEA ($\rho = -0,012$; $p = 0,931$) e com a razão Cort:DHEA ($\rho = 0,011$; $p = 0,940$).

4.8.2 Escalas PSS:NICU e PSS-10

Aos analisar as relações entre as duas escalas psicométricas por ocasião da alta do PT (T2), não foi constatada correlação entre o estresse vivenciado na unidade neonatal expresso pela PSS:NICU no M1 e o estresse percebido pelas mães por meio da escala PSS-10 ($\rho = 0,07$; $p = 0,59$) e nem no estresse PSS:NICU no M2 e PSS-10 ($\rho = 0,12$; $p = 0,41$).

4.9 Caracterização e Estresse crônico no bebê PT

4.9.1 Caracterização dos bebês PT

Dentre os bebês 63 PT participantes da pesquisa, a maioria nasceu de parto cesáreo (59,4%), sexo masculino (54,0%) e peso médio de nascimento de 1.633g (DP 0,54). A média do índice Apgar no primeiro e quinto minuto foi de 7 e 8, respectivamente, e a idade gestacional média foi 32,4 semanas sendo a mínima de 26 e máxima de 36,4 semanas. O método mais utilizado para cálculo da idade gestacional no foi Capurro (27,0%), seguido do ultrassom gestacional (25,4%). A maior parte dos bebês foi classificada como adequada para idade gestacional (65,1%). A maioria dos bebês foi internada na UTIN (74,6%) e recebeu oxigenoterapia durante a internação (76,2%). A caracterização desses bebês PT dos grupos canguru (32) e controle (31) constam nas Tabelas 30 e 31.

Tabela 30 - Dados descritivos dos PT dos grupos controle e canguru, Ribeirão Preto, 2016.

Dados PT			F	%
Grupo				
Sexo				
Controle	Válido	masculino	19	61,3
		feminino	11	35,5
		Total	30	96,8
	Ausente	Sistema	1	3,2
	Total		31	100
Canguru	Válido	masculino	15	46,9
		feminino	16	50,0
		Total	31	96,9
	Ausente	Sistema	1	3,1
	Total		32	100
Peso por idade gestacional				
Controle	Válido		2	6,5
		PIG	7	22,6
		AIG	22	71,0
		Total	31	100
			4	12,5
Canguru	Válido	PIG	9	28,1
		AIG	19	59,4
		Total	32	100

$\bar{x}$ = média, DP = Desvio Padrão; DUM = data última menstruação; USG = ultrassom gestacional; PIG = pequeno para idade gestacional; AIG = adequado para idade gestacional; IG = idade gestacional.

Tabela 31 - Dados descritivos dos grupos canguru e controle relacionados ao nascimento e alta do PT da unidade neonatal, Ribeirão Preto, 2016

Variável	Grupo	N	Média	Desvio padrão	Min	Max
Idade gestacional (semanas)	controle	31	33,1	2,9	26	36,4
	canguru	27	31,6	2,5	27,3	36,0
Peso de nascimento (g)	controle	31	1.822	617	660	2.975
	canguru	30	1.43850	0,371572	625	2330
Peso de alta (dias)	controle	27	2.235	275	1905	2780
	canguru	27	2.058	289	1695	2.975
Duração da internação na unidade neonatal (dias)	controle	25	28,3	26,8	3	103
	canguru	23	35,0	22,8	13	92

Especificamente aos bebês PT do grupo canguru, os dados relativos a permanência na unidade canguru (UCINca) estão apresentados na Tabela 32. O peso médio na admissão na UCINca foi de 1.611g (DP 0,54) e a idade do PT quando foi transferido para a UCINca variou de 01 dia de vida a máximo 89 dias, sendo que a média foi de 15,42 dias (DP 18,02); o tempo de internação médio nessa unidade foi 17,54 dias. As mães e bebês permaneceram na UCINca no mínimo 07 e no máximo 51 dias, sendo a média 19,11 dias (DP 12,84). A maior parte (12 – 40,0%) das mães colocou o bebê em posição canguru por 10-19 horas, estimando-se que a maioria dos bebês vivenciou no mínimo 70 horas de canguru por semana (10 horas x 7 dias da semana) e no máximo 133 horas (19 horas x 7 dias da semana); 22 (37,3%) referiram colocar o filho em contato pele a pele em casa.

Tabela 32 - Dados descritivos dos bebês PT relacionados ao Método Canguru, Ribeirão Preto, 2016

	N	Min	Max	$\bar{x}$	DP
Peso bebê na admissão na UCINca (g)	27	1.230	2.290	1.611	0.247
Tempo de internação na UCINca (dias)	25	7	51	19,11	12,84
	f	%	% válida	% acumulativa	
Fez canguru em casa	Não	26	44,1	44,1	44,1
	Sim	22	37,3	37,3	81,4
	Ausente	11	18,6	18,6	100
	Total	59	100	100	
Horas canguru/dia	f	%			
1 a 2 horas	1	3,3			
10 a 19 horas	12	40,0			
20 horas ou mais	7	23,3			
5 a 9 horas	9	30,0			
Menos de 1 hora	1	3,3			
Total	30	100			

$\bar{x}$ = média; DP = desvio padrão; DUM = data da última menstruação; UCINca = unidade de cuidados intermediários neonatais canguru

Analisado o índice de aleitamento materno exclusivo (AME) nos grupos canguru e controle no momento da alta do bebê da unidade neonatal e no terceiro mês de vida. Verificado que, no grupo controle, predominou o aleitamento materno não exclusivo (complementação com fórmula láctea), sendo 70,8% na alta hospitalar do PT e 86,4% aos três meses de vida (Tabela 33). A taxa de aleitamento materno exclusivo (AME) foi maior entre os bebês do grupo canguru na alta (64,0% vs 29,2%) e aos três meses de vida (33,3% vs 13,4%), em comparação com aqueles do grupo controle. O início do aleitamento em seio materno em ambos os grupos foi em média aos 15 dias de vida não influenciando assim, os resultados citados.

Tabela 33 - Dados referente ao aleitamento materno exclusivo na alta e após 3 meses de vida dos bebês PT nos grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Grupo	Variável	F	%	% válida	% acumulativa
AME alta					
Controle	Não	17	54,8	70,8	70,8
	Sim	7	22,6	29,2	100
	Total	24	77,4	100	
	Ausente	7	22,6		
	Total	31	100		
Canguru	Não	9	28,1	36,0	36,0
	Sim	16	50,0	64,0	100
	Total	25	78,1	100	
	Ausente	7	21,9		
	Total	32	100		
AME 3 meses após nascimento					
Controle	Não	19	61,3	86,4	86,4
	Sim	3	9,7	13,6	100
	Total	22	71,0	100	
	Ausente	9	29,0		
	Total	31	100		
Canguru	Não	16	50,0	66,7	66,7
	Sim	8	25,0	33,3	100
	Total	24	75,0	100	
	Ausente	8	25,0		
	Total	32	100		

AME = aleitamento materno exclusivo; Ausente = ausente no sistema

4.9.2 Estresse crônico dos bebês PT no primeiro trimestre de vida

Utilizando a técnica do CL/MS identificamos a presença de dez esteroide nas unhas dos bebês PT, são eles: DHEA, Androstenediona, Testosterona, Androsterona, Pregnenolona, Progesterona, Prega-3-,20-dione, 17-OH-pregnenolone, 5-pregna-3-ol-20-one e cortisol 387. O foco nesta pesquisa foi apenas a análise do cortisol e da DHEA.

Foi possível analisar o cortisol nas unhas de 62 bebês devido perda de uma amostra que foi acidentalmente derramada após o primeiro ciclo de extração da DHEA. Para análise dos dados, inicialmente realizamos o teste para avaliação da distribuição de dados através do teste Kolmogorov Smirnov e o resultado mostrou que os dados não seguem distribuição normal. Realizado testes de análise de distribuição Box-Cox e transformação logarítmica (log).

Foi realizado a transformação dos dados originais das variáveis cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA dos PT. A explicação da escolha dessas transformações após aplicar o método de análise Box-Cox. O pico do gráfico indica qual é o valor ótimo de λ (lambda) que

resulta na melhor transformação possível, junto com um intervalo de confiança de 95% para a estimativa correspondente. Verificamos que nas três variáveis do estudo o intervalo de confiança para λ compreende o valor 0, o que indica que a transformação logarítmica 10 pode ser utilizada para as três variáveis do estudo.

A transformação logarítmica comumente utilizada para análise de esteroides torna sua distribuição normal para que sejam feitas as análises paramétricas. Os dados originais do cortisol e transformados (Log 10), bem como da DHEA e da razão Cort:DHEA estão apresentados nas Tabelas 34 e 35. Realizado o teste de Mann-Whitney dos dados originais e o teste t Student para os dados transformados. Não foi constatado diferença significativa entre grupos canguru e controle quanto ao cortisol ($p=0,085$), apesar desse nível ser menor no grupo canguru. A distribuição da DHEA e razão Cort:DHEA entre os bebês foi significativamente diferente entre o grupo canguru e controle ($p<0,01$), sendo a DHEA ($p=0,011$) menor no grupo controle e razão Cort:DHEA ($p=0,000$) menor nos bebês que permaneceram em canguru durante a hospitalização (Tabela 36).

Tabela 34 - Valores do cortisol, da DHEA e da razão Cort:DHEA (dados originais em pg/mg) dos bebês PT aos três meses de idade, segundo os grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Grupo		N	Mín	Máx	$\bar{x}$	DP
Controle	Cortisol	31	6,87	124,9	20,27	20,61
	DHEA	31	8,94	195,2	75,84	60,59
	Cort:DHEA	31	0,04	9,74	0,74	1,73
Canguru	Cortisol	31	3,25	37,62	14,84	8,77
	DHEA	32	13,45	921,2	198,74	232,0
	Cort:DHEA	31	0,01	0,47	0,16	0,14

Tabela 35 - Valores do cortisol, da DHEA e da razão Cort:DHEA (dados transformados – Log 10) dos bebês PT aos três meses de idade, segundo os grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016

Variável Grupo	N obs	N	$\bar{x}$	DP	IC 95 (%) para $\bar{x}$		Mín	1º Q	Mediana	3º Q	Máx
Cortisol*											
Canguru	33	32	15,45	9,29	12,1	18,8	3,25	9,81	11,93	18,53	37,62
Controle	31	31	20,27	20,61	12,7	27,8	6,87	11,5	15,25	20,75	124,93
DHEA*											
Canguru	33	33	198,28	228,42	117,3	279,2	13,45	59,9	112,12	183,31	921,23
Controle	31	31	75,84	60,59	53,6	98,1	8,95	25,9	54,29	127,37	195,21
Cort:											
DHEA*											
Canguru	33	32	0,16	0,14	0,11	0,21	0,01	0,07	0,1	0,21	0,47
Controle	31	31	0,74	1,73	0,11	1,38	0,04	0,13	0,32	0,64	9,74

*Transformação Log10

Tabela 36 - Teste de Mann-Whitney dos dados originais de cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA (pg/mg) dos bebês PT aos três meses de idade, segundo os grupos canguru e controle, Ribeirão Preto, 2016^a

	Cortisol pg/mg	DHEA pg/mg	Cort:DHEA pg/mg
Mann-Whitney U	358,000	311,000	231,000
Wilcoxon W	854,000	807,000	727,000
Z	-1,725	-2,543	-3,513
Sig. Assint. (2 caudas)	0,085	0,011	0,000

a. Variável de agrupamento: grupo controle e canguru

Gráfico 13 - Diagrama em caixa do cortisol das unhas dos bebês PT nos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016

Gráfico 14 - Diagrama em caixa do cortisol das unhas dos bebês PT dos grupos canguru e controle (dados transformados Log10), Ribeirão Preto, 2016

Gráfico 15 - Diagrama em caixa da DHEA das unhas dos bebês PT dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016

Gráfico 16 - Diagrama em caixa da razão DHEA das unhas dos bebês PT dos grupos canguru e controle (dados transformados Log10), Ribeirão Preto, 2016

Gráfico 17 - Diagrama em caixa da razão Cort:DHEA das unhas dos bebês PT dos grupos canguru e controle (dados originais), Ribeirão Preto, 2016

Gráfico 18 - Diagrama em caixa da razão Cort:DHEA das unhas dos bebês PT dos grupos canguru e controle (dados transformados L10), Ribeirão Preto, 2016

Analizamos também os dados dos esteroides dos PT comparando com aqueles das mães que relataram estresse na gestação, respondendo sim à questão dicotômica sobre estresse no período gestacional. Identificamos que as mães que responderam sim, quanto a vivência de estresse na gestação, não mostrou diferença estatisticamente significativa no nível de cortisol. Nas mães estressadas (n=37) o valor do cortisol após a transformação Log 10 foi de 1,14 pg/mg e nas não estressadas (n=14) foi de 1,19 pg/mg. Quanto a DHEA, entre as mães que relataram estresse (n=37) a média foi de 1,99 (DP 0,36) pg/mg e entre as não estressadas (n=15) a média foi de 1,74 pg/mg (DP 0,54) e a razão Cort:DHEA foi de -0,85 (DP 0,51) e -0,60 (DP 0,70), respectivamente. Apesar de apresentarem diferenças entre os níveis dos esteroides essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 37).

Tabela 37 - Teste t referente a relação entre o cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA das unhas dos bebês PT e o estresse vivenciados pela mãe na gestação, Ribeirão Preto, 2016

	Estresse na gestação relatado pela mãe	N	$\bar{x}$	DP	Erro padrão da $\bar{x}$	Test t	Sig (2 extremidades)
Cortisol Log 10	Não	14	1,19	0,36	0,096	0,571	0,571
	Sim	37	1,14	0,22	0,037	0,464	0,649
DHEA Log 10	Não	15	1,74	0,54	0,139	-1,659	0,103
	Sim	37	1,99	0,47	0,078	-1,573	0,129
Cort:DHEA Log 10	Não	14	-0,60	0,70	0,186	1,433	0,158
	Sim	37	-0,85	0,51	0,084	1,247	0,228

4.10 Correlação do estresse crônico do bebê PT e da mãe

No presente estudo o grupo canguru mostrou associação positiva entre o cortisol da mãe e cortisol do bebê (ρ ou $p=0,40$). Associação positiva também foi constatada na DHEA da mãe e do bebê ($p=0,42$). Na razão Cort:DHEA da mãe ocorreu moderada associação entre cortisol ($p=0,55$) e razão Cort:DHEA do bebê ($p=0,51$) (Tabela 38).

Tabela 38 - Coeficiente de correlação de Sperman do estresse crônico (cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA em pg/mg) dos bebês do grupo canguru aos três meses de idade e do estresse crônico das mães na gestação (T1) e puerpério (T2), Ribeirão Preto, 2016

Estresse	PT	Cortisol do bebê	DHEA do bebê	Cort:DHEA do bebê
Materno				
T1				
Cortisol (pg/mg)	Coef	-0,10	0,18	-0,35
	Sig	0,62	0,32	0,06
	N	30	31	30
DHEA (pg/mg)	Coef	-0,07	0,19	-0,27
	Sig	0,71	0,31	0,14
	N	30	31	30
Cort:DHEA (pg/mg)	Coef	0,07	0,10	-0,05
	Sig	0,70	0,61	0,81
	N	29	30	29
T2				
Cortisol (pg/mg)	Coef	0,40	0,01	0,05
	Sig	0,02	0,94	0,80
	N	31	32	31
DHEA (pg/mg)	Coef	-0,23	0,42	-0,50
	Sig	0,22	0,02	<0,01
	N	31	31	31
Cort:DHEA (pg/mg)	Coef	0,55	-0,26	0,51
	Sig	<0,01	0,16	<0,01
	N	31	31	31

Coef = coeficiente de correlação, Sig = significância 2 extremidades; N = número participantes

O grupo controle apresentou associação positiva apenas entre a razão Cort:DHEA da mãe e razão Cort:DHEA do bebê ($\rho = 0,43$) e associação negativa moderada ($\rho = -0,32$) entre razão Cort:DHEA da mãe e DHEA do bebê (Tabela 39).

Tabela 39 - Coeficiente de correlação de Sperman do estresse crônico (cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA) dos bebês do grupo controle aos três meses de idade e do estresse crônico das mães na gestação (T1) e puerpério (T2), Ribeirão Preto, 2016

Estresse Materno		PT	Cortisol do bebê	DHEA do bebê	Cort:DHEA do bebê
T1					
Cortisol	Coef		0,02	-0,17	0,16
	Sig		0,91	0,35	0,39
	N		31	31	31
DHEA	Coef		-0,09	0,23	-0,31
	Sig		0,64	0,22	0,09
	N		31	31	31
Cort:DHEA	Coef		0,15	-0,27	0,37
	Sig		0,43	0,14	0,04
	N		31	31	31
T2					
Cortisol	Coef		0,12	-0,19	0,25
	Sig		0,51	0,31	0,18
	N		31	31	31
DHEA	Coef		-0,13	0,17	-0,24
	Sig		0,48	0,36	0,20
	N		31	31	31
Cort:DHEA	Coef		0,27	-0,32	0,43
	Sig		0,14	0,08	0,02
	N		31	31	31

Coef = coeficiente de correlação, Sig = significância 2 extremidades; N = número participantes

4.11 Análise de regressão das variáveis maternas e do PT

Para maior esclarecimento dos dados e refinamento estatístico, realizamos testes de regressão múltipla utilizando variáveis dependentes, controlando para os fatores de confusão. Foram considerados fatores de confundidores maternos o uso de corticoides pela gestante, complicações na gestação, hipertensão, infecção do trato urinário, tipo de parto (vaginal, cesárea), estado civil, escolaridade, aborto anterior, parto prematuro anterior, número de gestações, tipo de gestação (única ou gemelar), internação na gravidez, uso de fumo, estresse com pai do bebê, estresse financeiro e estresse no trabalho durante a gestação. Os fatores neonatais foram: uso de corticoide materno, idade gestacional, peso de nascimento, tempo de

internação e peso de alta da unidade neonatal. A análise de regressão utilizando os dados do cortisol e DHEA maternos (dados transformados) foi realizada com essas variáveis citadas, porém nenhuma delas foi preditiva para os valores dos esteroides. Quanto aos dados do bebê PT, apenas o peso na alta mostrou resultado preditivo para os níveis de esteroides. O peso de alta da unidade neonatal mostrou relação estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5 Discussão

A grande contribuição deste estudo foi a concretização da análise dos hormônios cortisol e DHEA em unhas de mães e bebês PT internados em unidade neonatal, como resposta do eixo HHA à situação de estresse crônico vivenciado no último trimestre da gestação e no período puerperal materno e do nascimento até os primeiros três meses de vida do PT. O estudo mostrou que a análise da resposta do eixo HHA, utilizando as unhas, depende da extração correta do cortisol e da DHEA e análise adequada do material extraído. Empregou-se a técnica de EIA com análise parcial das unhas, ou seja, utilizou-se em média 50 miligramas de pó de unha moída, a mesma quantidade utilizada no estudo realizado por Warnock et al. (2010) para unhas de adultos, e a técnica da cromatografia líquida com espectrômetro de massa (CL/MS) nas unhas dos bebês PT, a mesma técnica usada por Tegethoff et al. (2011), porém utilizando unhas inteiras (10 miligramas). Cabe assinalar que, a dificuldade em moer as unhas do PT, e a necessidade de usar unhas inteiras, não foi apropriada de extrair o material necessário para análise através da técnica de EIA, assim a alternativa utilizada foi a CL/MS a qual foi eficaz para o exame do cortisol e da DHEA em unhas de bebês PT.

Neste estudo, os resultados mostraram ser possível avaliar o estresse crônico utilizando unhas de mulheres com a técnica de EIA, referentes a dois momentos de exposição ao estresse – gestação e puerpério, estando essa em consonância com Izawa et al. (2015) que reiteraram os resultados obtidos por Warnock et al. (2010), confirmando que a técnica utilizada é eficiente para analisar o cortisol e a DHEA em unhas. Izawa et al. (2015) realizaram dois estudos com adultos, sendo que um analisou o estresse de homens de meia idade e idosos e o outro investigou profissionais enfermeiros, fisioterapeutas, terapeutas ocupacionais e cuidadores.

Já o método da CL/MS foi eficaz para analisar as unhas dos bebês no presente estudo, também utilizado em unhas de adultos por Ben Khelif et al. (2011) e Higashi et al. (2016), que alcançaram resultados positivos na análise do estresse crônico, porém, não foram encontradas pesquisas em PT.

No presente estudo investigamos a resposta biológica e psicológica ao estresse em dois momentos distintos, sendo eles, o último trimestre da gestação e o puerpério materno que inclui vivências com a internação do bebê PT na unidade neonatal no domicílio. A importância de se investigar a ocorrência e o grau do estresse durante esses períodos justifica-se pelo fato de que, quando experimentado de forma breve, esse provocará apenas sintomas agudos e transitórios, que irão ativar mecanismos apropriados para restaurar a homeostase, evitando quaisquer outros efeitos ou danos (DOUGLAS, 2010), mas, se esse estresse for

persistente poderá ocasionar problemas maiores para a mãe e para o bebê. O estresse gestacional, por exemplo, pode conduzir a complicações de saúde na gestante, sendo que a ocorrência dessas complicações somadas ao estresse podem conduzir ao nascimento prematuro (WAKEEL et al., 2013).

Neste estudo, a maioria das mães dos PT relatou complicações de saúde na gestação, sendo o problema mais comum, a hipertensão. Os dados estão de acordo com o estudo realizado por Wakeel et al. (2013), no qual 70% das mães de PT apresentaram complicações na gestação, sendo a hipertensão o problema de saúde mais comum. No estudo de Wakeel et al. (2013) a hipertensão foi apontada como causadora da prematuridade, evidência apoiada pelo estudo de Littleton et al. (2010). Não podemos afirmar na presente pesquisa que o estresse levou às complicações de saúde, e concluir que essas complicações conduziram ao parto prematuro, pois, esse não foi o foco do estudo, porém, podemos destacar a necessidade de prestar um cuidado pré-natal abrangente que inclua avaliações clínica e psicológica adequadas da gestante, identificando aspectos relativos a exposição e fatores causadores de estresse e intervenção precoce.

Além de complicações físicas, a maioria das mães relatou complicações psicológicas, ou seja, a vivência de estresse durante a gestação, sendo que o estressor apontado como o mais comum se refere à problemas na relação com o pai do bebê. Este resultado está em consonância com a pesquisa realizada Tandu-Umba et al. (2014) que também identificou a tensão com o companheiro, como maior gerador de estresse na gestação.

Outro estressor importante identificado no nosso estudo refere-se a dificuldades financeiras vivenciadas pela gestante, corroborando com os achados dos estudos realizados por Ayers et al. (2016) e Burns et al. (2015), que também identificaram problemas econômicos/financeiros como estressores comuns na gestação.

Tanto os estressores derivados de problemas com o companheiro, como aqueles de ordem financeira, são apontados como fatores de risco para a mãe e o bebê, pois são geradores do estresse crônico que, além de conduzir ao nascimento prematuro e de baixo peso, também pode intensificar o risco de morte do bebê no período perinatal (TANDU-UMBA, 2014) e causar Síndrome de Estresse pós-traumático materno (AYERS et al., 2016).

Assim, os resultados negativos ligados a esses estressores reforçam a necessidade de avaliação cuidadosa da equipe quanto à situação psicológica e econômica da gestante. Hobel et al. (2008) chamam atenção para que, em algumas situações, a intervenção para redução do estresse, quando iniciada no pré-natal, pode ser considerada tardia e que não minimizam os

riscos para mãe e bebê, portanto, esse cuidado deve ser iniciado antes mesmo da gravidez como, por exemplo, em programas de planejamento familiar.

Ao ser avaliado o estresse biológico por meio das unhas, no último trimestre de gestação, o cortisol médio das gestantes foi de 11,31 pg/mg (DP 30,14), havendo grande variabilidade sendo o mínimo de 2,68 pg/mg e o máximo de 202,21 pg/mg. Há escassez de pesquisas, utilizando análise das unhas, então a alternativa encontrada foi a utilização da estrutura corporal mais parecida e que também seja capaz de analisar o estresse crônico de forma retrospectiva. Uma alternativa possível e aceita internacionalmente refere-se ao uso do cabelo. Tendo clareza dos limites decorrentes das diferenças nos delineamentos das pesquisas e nos métodos empregados para o dimensionamento de materiais biológicos, trazemos os resultados de pesquisa realizada por Braig et al. (2015), na Alemanha, com grávidas no último trimestre da gestação, mediante análise da concentração do cortisol no cabelo de 768 mães de bebês nascidos a termo, de forma retrospectiva, empregando a técnica de cromatografia líquida de alto desempenho com espectrômetro de massa. O cortisol médio encontrado pelos autores foi de 9,4 pg/mg (DP 10,6), variando de 0,3 a 80,3 pg/mg, portanto, próximo aos do último trimestre da gestação (T1). Todavia, destaca-se a maior variabilidade nos níveis do cortisol gestacional médio geral das 59 participantes desta pesquisa, retrospectivo ao último trimestre da gestação das mães dos PT (T1).

Investigamos também, a diferença entre o estresse gestacional (T1) e o puerperal (T2), vivenciado durante a internação do filho PT na unidade neonatal e no ambiente domiciliar. Na comparação do estresse biológico entre esses dois momentos, identificado que o nível de cortisol foi maior no último trimestre de gestação. Os achados da presente pesquisa estão de acordo com o estudo realizado por D'Anna-Hernandez et al. (2011), que avaliou o estresse crônico na gestação e puerpério utilizando o cortisol capilar e o cortisol salivar. As amostras de cabelos foram coletadas a cada trimestre da gestação (15, 26 e 36 semanas) e as amostras de saliva foram coletadas em cinco momentos da gestação (14, 18, 23, 29, 34 semanas), correspondendo a diferentes trimestres da gestação. No puerpério foram coletadas seis semanas após o parto e, em três diferentes momentos do dia, 30 minutos após acordar, no almoço e 10 horas depois de acordar. As participantes apresentaram menor cortisol (salivar e capilar) no primeiro trimestre de gestação do que no segundo trimestre. O maior nível de cortisol foi identificado no terceiro trimestre de gestação.

Resultados similares foram identificados por Smy et al. (2016) ao comparar o cortisol capilar durante a gestação e puerpério, em estudo de coorte retrospectivo, com três

grupos de gestantes, sendo dois grupos de gestantes asmáticas (com e sem tratamento) e um grupo de não asmáticas. Os autores constataram aumento do cortisol nos diferentes trimestres de gestação, sendo o terceiro trimestre o período de maior nível; o cortisol no puerpério foi menor que na gestação.

No presente estudo, além da concentração do cortisol, também identificamos que a DHEA foi maior na gestação do que no puerpério, mas não foram identificadas pesquisas comparando a presença desse esteroide nos dois tempos, em unhas ou cabelos.

Visto que, tanto o nível de cortisol quanto a DHEA e a razão Cort:DHEA foram maior na gestação, os dados sugerem que o estresse crônico retrospectivo ao último trimestre gestacional foi maior do que estresse no período de internação do PT na unidade neonatal. Porém ao compararmos estes resultados com os apontados pelos estudos citados, nota-se que isto pode ser uma ocorrência fisiológica, pois, no processo de evolução da gravidez, o corpo da mulher passa por importantes alterações no sistema endócrino (NEVES; MEDINA; DELGADO, 2007). Dentre outros hormônios, é observado alteração nos níveis de ACTH, que apresenta um aumento significativo no final do primeiro e último trimestres da gravidez (GENAZZANI et al., 1975), atingindo entre a 7ª e 10ª semana da gestação e entre a 33ª e 37ª semana, concentrações cerca de quatro e cinco vezes superiores àquelas do período anterior à gravidez, respectivamente (*apud* NEVES; MEDINA; DELGADO, 2007). Esse aumento da ACTH é mais intenso no momento do parto (15 vezes) devido ao estresse e, imediatamente após ocorre sua redução (cerca de 24 horas) até os níveis anteriores a gravidez, em 24 horas após o parto (OKAMOTO et al., 1989). Em decorrência da hiperestrogenemia, a produção hepática de CBG (*cortisol-binding globulin*) aumenta cerca do dobro, resultando em decréscimo da depuração do cortisol e, conseqüentemente, a concentração plasmática de cortisol total triplica na 26ª semana da gestação. Tanto a taxa de produção de cortisol aumenta como a fração livre do cortisol plasmático (*apud* NEVES; MEDINA; DELGADO, 2007).

A produção adrenal de DHEA e DHEAS (sulfato de desidroepiandrosterona) também está aumentada cerca de duas vezes na gestação, todavia, o nível sérico de DHEAS reduz para um terço até metade daqueles níveis anteriores à gravidez, devido ao aumento da 16-hidroxilação e à utilização de sulfato de 16-hidroxidi-hidroepiandrosterona pela placenta para formação de estrogênios (*apud* NEVES; MEDINA; DELGADO, 2007).

Com base no exposto, os resultados obtidos acerca dos níveis dos hormônios estudados no T1 e T2 podem ser sugestivos de alterações fisiológicas decorrentes do processo gestacional.

A análise dos escores obtido através das escalas psicométricas foi utilizada como um método complementar para avaliar e comparar o estresse ao final da gestação e aquele decorrente da hospitalização do PT na unidade neonatal. Assim, juntamente com os resultados relativos ao estresse biológico, analisamos o estresse psicológico mediante uso das escalas PSS-10 e PSS:NICU. Os resultados obtidos sobre estresse percebido pelas mães relativos à gestação e puerpério com a internação do filho PT na unidade neonatal, através da escala PSS-10, não apontaram diferença estatisticamente significativa, embora o escore médio de estresse percebido na gestação (canguru = 19,63 e controle = 19,68) foi maior do que no puerpério (canguru = 16,42 e controle = 18,11). Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Chaaya et al. (2010) que também não identificaram diferença significativa entre gestantes e puérperas. Os autores investigaram a percepção do estresse em 268 mulheres árabes, 113 delas gestantes no terceiro trimestre da gestação, 97 puérperas (6 meses após parto) e 58 universitárias (não grávidas e não mães) em estudo para validação da escala PSS-10 na língua árabe. O escore médio da PSS-10 foi de 18,0 nas gestantes, 18,3 nas puérperas e 20,3 nas universitárias, e não houve diferença estatisticamente significativa entre gestantes e puérperas, mas sim dessas em comparação com as universitárias.

Já a pesquisa de Rodrigues e Schiavo (2011) comprovou diferença estatisticamente significativa utilizando outra medida psicométrica, o Inventário de Sintomas e Stress Lipp (ISSL), ao comparar o estresse no último trimestre de gestação e no puerpério, no momento logo após o parto. Na primeira etapa (terceiro trimestre de gestação) participaram 98 gestantes e na segunda (puerpério) 64 mães de bebê a termo. Os resultados mostraram que, tanto no período gestacional quanto no puerpério, as mães revelaram sinais importantes de estresse, cuja frequência foi significativamente maior no último trimestre de gestação. O estudo mostrou também que o estresse vivenciado nesses dois períodos (gestação e puerpério) são fatores de risco para depressão pós-parto, sendo que, quanto maior o nível de estresse vivenciado pela gestante ou pela mãe, maior a intensidade desse risco. Isso se dá devido a estímulo persistente à resposta do estresse, que pode causar exaustão fisiológica e levar ao transtorno psicofisiológico.

Serão necessários mais estudos para comparar o estresse na gestação e puerpério, porém, esses resultados destacam a necessidade de identificar os fatores causadores de estresse tanto na gestação como no puerpério, reforçando a importância de um cuidado pré-natal abrangente, no qual inclua a avaliação psicológica adequada das gestantes e a investigação de ocorrência de eventos estressantes nas mães durante a internação do filho na

unidade neonatal, a fim de reduzir os riscos de complicações tanto para a mãe quanto para o bebê (AYERS et al., 2016; BURNS et al., 2015; TANDU-UMBA, 2014; WAKEEL et al., 2013).

Ter um bebê internado na unidade neonatal é estressante para os pais (TURNER et al., 2015), pois nesse local eles ficam expostos a diferentes estressores durante toda a internação de seus filhos (TURAN et al., 2008; TRONCHIN et al., 2005). O ambiente desconhecido, a aparência fragilizada do PT, somado ao fato que eles têm seu papel alterado, são fatores causadores de estresse durante a permanência do bebê na unidade neonatal (SOUZA et al., 2012). Neste estudo verificamos por meio da análise biológica utilizando níveis de cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA em unhas, que, tanto as mães que foram submetidas ao canguru, quanto aquelas do grupo controle, vivenciaram estresse de forma similar durante o período de internação do filho PT na unidade neonatal.

Lançamos mão das ferramentas psicométricas para nos auxiliar na interpretação de dados de estresse das mães, durante o período de hospitalização do PT na unidade neonatal. Investigamos o estresse materno na primeira semana de internação do PT através da escala PSS:NICU e os escores médios obtidos sinalizam a presença de estresse moderado tanto nas mães do grupo canguru como no controle.

A admissão do bebê em UTIN é fator de estresse para os pais (SHAW et al., 2009), pois trata-se de lugar onde as pessoas são internadas porque estão em estado grave, com grande de risco de morte (TRONCHIN et al., 2005). Somado a isso, o nascimento prematuro é agravante para a incerteza se o seu bebê sobreviverá ou não (TRONCHIN et al., 2005; FOWLIE; McHAFFIE, 2004) e assim, intensifica o estresse dos pais. Além do ambiente novo repleto de sons (alarmes de monitores e equipamentos), imagens (outros bebês doentes, respiradores, situações de urgência), os pais se deparam com a aparência frágil de seus bebês, totalmente diferente do imaginado (TURNER et al., 2015; TRONCHIN et al., 2005), frustrando suas expectativas (LASIUK et al., 2013) e vivenciando processo de luto pela perda do bebê idealizado e tendo que conviver com o bebê real, situação de crise que impõe grande esforço adaptativo, em especial para as mães que não estão preparadas física e emocionalmente para esse evento (SCHAPPIN et al., 2013; TROCHIN et al., 2005).

Para o grupo controle tanto na primeira semana de internação do bebê PT quanto na alta, as mães apresentaram estresse moderado, enquanto que naquelas do canguru a vivência na internação recente do PT na unidade neonatal foi mais estressante (nível moderado) do que o momento da alta (pouco ou nenhum estresse). Os escores gerais alcançados na PSS:NICU

não diferiram significativamente entre os grupos canguru e controle por ocasião do início da internação do PT, e nem nas subescalas relacionadas à Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração no papel dos pais. Por outro lado, a vivência no canguru possibilitou a redução significativa desse estresse na alta ($p=0,00$), em comparação com as mães do controle, evidência que confirma nossa hipótese relacionada a ação do Método Canguru na redução do estresse psicológico materno dimensionado por escala que contempla a vivência materna em aspectos relativos ao ambiente da unidade neonatal, a especificidade do bebê PT e ao papel de pais.

Inferimos que, o fato do grupo controle apresentar maior estresse que o grupo canguru na alta, foi devido a esse não ter a mesma oportunidade de interagir e acompanhar de perto o desenvolvimento de seus filhos, conhecer suas necessidades e realizarem os cuidados durante a internação da mesma forma que o grupo canguru. A alta na neonatologia é considerada um momento muito esperado e causa muita alegria nas mães, porém esse é também um momento de muito estresse, pois, muitas vezes, elas não se sentem preparadas para levar seus filhos para casa (RAINES, 2013). Estudo realizado por Raines (2013) avaliou o estresse dos pais no momento da alta do bebê da unidade neonatal, utilizando a escala de estresse de pais de crianças hospitalizadas (*Parental Stressor Scale: Infant Hospitalization – PSS:IH*), cinco dias antes da alta. Os achados mostraram que os pais se sentiam despreparados para a realidade de cuidar de seus filhos PT em casa. Todas as mães se mostraram estressadas antes da alta dos seus filhos. Diante dos achados, os autores sustentam a ideia de que as enfermeiras devem prover um guia ou protocolo de cuidado para fortalecer o papel de pais e a relação com seus filhos (RAINES, 2013).

Destaca-se como vantagem do Método Canguru que as mães que permanecem nessa unidade conhecem seus filhos, pois são capacitadas a cuidar e reconhecer os sinais de risco do PT, como por exemplo, apnéia e cianose. Os bebês nessa unidade são monitorados por suas mães e pela equipe de enfermagem, que os assistem por 24 horas. Assim, em vez da mãe se “prender” ao monitor cardiorrespiratório ou à equipe de saúde para analisar o estado do seu filho, ela aprende a “olhar” para seu PT, socorrê-lo e reconhecer o momento que precisa solicitar ajuda (BRASIL, 2015). Isso diminui seu estresse e aumenta sua capacidade de cuidar do seu bebê.

Os achados de nosso estudo estão de acordo com Samra et al. (2015) que avaliaram o estresse das mães, tendo como intervenção o contato pele a pele em PT tardio, em 40 binômios, utilizando a escala PSS:NICU (métrica 1). O contato pele a pele foi encorajado

pelo tempo que fosse necessário, no mínimo três vezes por semana, por 50 minutos. O grupo controle segurou o bebê enrolado em cobertor no mínimo três vezes por semana, por 50 minutos. Como resultado, o grupo canguru apresentou menor estresse que o controle, obtendo o escore geral de 2,34 (pouco estressante) e o grupo controle 2,94 (moderadamente estressante). O estresse das mães do grupo canguru foi menor que o controle. Os pesquisadores avaliaram o estresse em dois momentos: antes e após do canguru, utilizando a métrica 1. O escore da escala PSS:NICU, para as subescalas Sons e imagens, Aparência e comportamento do bebê e Alteração do papel de pais, no grupo intervenção (canguru) no momento 1 (pré-canguru) foi de 2,3, o que significa pouco estressante, e no momento 2 (pós-canguru) o escore foi 2,8 (pouco estressante). Na unidade controle, tanto no momento 1 (3,0) como no 2 (2,8) o estresse foi moderadamente estressante.

Tallandine e Chiara (2006) mostraram que o canguru é benéfico para reduzir estresse de mães, porém utilizaram outra escala. Os pesquisadores investigaram o impacto sociológico do canguru na mãe e no bebê. Foram incluídos, no estudo, 40 binômios, sendo que 21 receberam cuidado mãe canguru e 19 não realizaram. O contato pele a pele foi oferecido por, pelo menos, uma hora desde admissão até a alta. Incluídos bebês abaixo de 1.800g independentemente da idade gestacional. O estresse do grupo canguru foi menor que o grupo controle.

Gonya et al. (2013) também mostraram as vantagens do contato pele a pele, como estratégia para redução do estresse. Participaram da pesquisa PT (<27 semanas de idade gestacional), sendo 72% com 25 semanas ou menos. O contato pele a pele foi iniciado na primeira semana de admissão, em 80% dos participantes. A média de contato pele a pele foi de 44 horas, durante a internação em nove semanas consecutivas, com frequência mínima de duas vezes por semana, com pico na 29-33 semanas e depois disso diminuindo. Foi avaliado o estresse materno utilizando, entre outros, o instrumento PSS:NICU obtendo o grupo canguru o menor nível de estresse, mas os autores não apresentam a média de escore antes e depois do canguru.

Contrariamente aos nossos resultados, Weis et al. (2013) não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos canguru e controle, utilizando a escala PSS:NICU. O escore médio reportado no grupo canguru foi de 2,70 (DP 0,67) e no controle 2,84 (DP 0,71).

Da mesma forma, Roberts et al. (2000) compararam o estresse de mães dos grupos canguru e controle, utilizando a escala PSS:NICU, e não constataram diferença significativa

entre os grupos. Participaram da pesquisa 33 binômios em dois hospitais na Austrália. O estudo comparou o canguru com o cuidado convencional (*cuddling care*) em bebês pequenos para a idade gestacional, com média 31,5 semanas de gestação. Tanto pele a pele como afago/segurar o bebê (com roupa) foram oferecidos por 2 horas por dia, cinco dias na semana. O estresse das mães de ambos os grupos, controle e canguru, foi moderado (3,9 e 3,5, respectivamente) para a escala total.

Quando avaliado o estresse das mães através das três subescalas da PSS:NICU, constatado que o maior causador do estresse na unidade neonatal foi relacionado à Alteração do papel dos pais. Os itens dessa escala são: 1. estar separada(o) do meu bebê; 2. não alimentar eu mesma(o) o meu bebê; 3. não poder cuidar eu mesma(o) do meu bebê (por exemplo trocar fraldas, dar banho); 4. não poder segurar meu bebê quando quero; 5. sentir-se desamparada(o) e incapaz de proteger o meu bebê da dor e de procedimentos dolorosos; 6. sentir-se sem condições de ajudar o meu bebê durante esse tempo e 7. não ter tempo para estar sozinha(o) com o meu bebê.

Assumir o novo papel de mãe, num ambiente como a unidade neonatal, é mais complicado e pode ser prejudicado, pois o processo tem que se desenvolver com a presença de pessoas estranhas e sem qualquer privacidade (WERNET, 2007; LAU, 2001). O fato de os pais não poderem desempenhar seu papel de pais, ou seja, se reconhecerem e ser reconhecidos como “pais” nessa unidade gera muito estresse (TURNER et al., 2015; SCHARPPIN, 2013; SOUZA et al., 2012; TURAN et al., 2008).

Assim, os resultados do presente estudo estão de acordo com Chiejina et al. (2015) que avaliaram o estresse de 216 pais de PT com idade gestacional média de 35 semanas, na unidade neonatal, utilizando a escala PSS:NICU, e constataram que o maior nível de estresse dos pais foi relacionado à alteração do papel. O estresse dos pais na unidade neonatal na subescala Alteração do papel de pais também foi maior em estudos realizados nos Estados Unidos (MILES et al., 1993), no Brasil (SOUZA et al., 2012), na Dinamarca (WEIS et al., 2013), na Inglaterra (FRANCK et al., 2005) e na Argentina (RUIZ et al., 2005).

O fato de os bebês serem cuidados predominantemente pela equipe de saúde reforça a questão que, muitas vezes, as mães não se sentem mães, prejudicando a formação do seu novo papel materno. Rossman (2011), ao questionar as mães como se sentiam tendo o bebê na unidade neonatal, mostrou que elas verbalizaram que não se sentiam realmente como mães porque seus filhos estavam sendo cuidados por outras pessoas (enfermeiras e equipe) e elas

tinham acesso limitado ao bebê. Referiram ainda, que só se sentiriam mães de verdade quando fossem totalmente responsáveis por seus filhos.

Os resultados encontrados e dos estudos citados corroboram com a afirmação de Turner et al. (2015) que, o fato de não poder cuidar e alimentar o seu o bebê, não podendo assumir o seu papel de mãe, é um fator de forte estresse para essas mães.

Diferentemente de nossos resultados, o estudo realizado no Iran, com 70 mães em dois hospitais escola, mostrou que, na admissão do bebê na unidade neonatal, o estresse predominante foi relacionado à Aparência e comportamento do bebê, seguido da Alteração do papel dos pais, com base na subescala PSS:NICU (KADIVAR et al., 2016). O fato de os pais ficarem inicialmente assustados e estressados com a aparência do bebê é comum, pois PT tem aparência muito frágil, levando os pais a se preocuparem muito mais com a sobrevivência dos filhos do que com a eficiência como pais.

Cabe assinalar como limitações das comparações feitas entre os estudos e também na nossa pesquisa ao comparar o grupo canguru com o controle, o fato de o estresse psicológico como variável desfecho também ser passível de interferências decorrentes do processo de trabalho nas unidades neonatais, aspecto esse não analisado nos estudos. Em tese, espera-se que nas instituições que têm o cuidado canguru rotineiramente implantado amplia-se o foco da assistência ao ter a mãe e família mais presentes e inseridas no cuidado do bebê PT, enquanto que no cuidado convencional foca-se mais nas necessidades biológicas do PT, influenciado pelo modelo de atenção biologizante.

Permanece assim, a recomendação que os pais necessitam ser inseridos no cuidado da criança; precisam de oportunidade para proteger seus filhos, ter contato com o bebê, ser positivamente percebido pela equipe de enfermagem; receber informações e serem cuidados de forma individualizada (CLEVELAND, 2008). A inclusão no cuidado ao bebê, informações recebidas sobre o estado da criança e o cuidado canguru são agentes facilitadores para o desenvolvimento da resiliência, enfrentamento do estresse e da ansiedade e a formação do papel de mãe (ROSSMAN, 2011).

Constatamos que o escore de estresse da PSS:NICU em relação ao papel de pais, na primeira semana de internação do PT na unidade neonatal, não diferiu significativamente entre os grupos, sendo 4,04 (M1) e 4,03 (M2) no controle e 3,81 (M1) e 3,71 (M2) no canguru, caracterizados como muito estressante. Porém, na alta da unidade neonatal enquanto o controle manteve-se escores 4,12 e 3,77 (muito estressante), o canguru teve seus escores significativamente reduzidos (1,58 na M1 e 1,30 na M2). Os resultados sugerem que o Método

Canguru reduz de forma significativa o estresse psicológico de mães no momento da alta do PT para casa. Isso se dá devido a oportunidade que as mães, do hospital canguru, têm de cuidar de seus filhos, como anteriormente mencionado.

Cabe retomar a recomendação que, desde a internação na UTIN ou UCIN, as mães devem ser preparadas para prestar cuidados e maternalizar seus filhos (BRASIL, 2011).

Em revisão sistemática qualitativa com 401 mães e 94 pais, em 29 pesquisas realizadas em nove países, Andérzen-Carlsson, Lamy e Eriksson (2014) afirmam que a experiência de proporcionar contato pele a pele para seus recém-nascidos tem importante função no papel de pais. O canguru proporciona o acompanhamento diário do desenvolvimento de seus filhos e isso ameniza o sentimento de culpa e angústia, comumente vivenciado por pais de PT. Esta metodologia de cuidado também acentua o instinto natural de proteção ao bebê, facilita a aprendizagem e principalmente, patrocina a restituição do papel aos pais.

Além do estresse materno, investigamos no presente estudo, o estresse do PT na unidade neonatal. Sabemos que, por nascer antes do tempo previsto, o PT tem que completar seu desenvolvimento no meio extrauterino, e esse, ao contrário do ambiente acolhedor e tranquilo do útero materno e totalmente favorável ao seu crescimento (NASCIMENTO; MARANHÃO, 2010), é um local repleto de estressores. Dentre esses estão a claridade excessiva, temperatura instável, barulho constante, manipulação excessiva, exposição a procedimentos dolorosos e privação da presença de sua mãe (NASCIMENTO; MARANHÃO, 2010; ANTONUCCI et al., 2009).

Constatamos que os PT do grupo canguru apresentaram menores níveis da razão Cort:DHEA que o grupo controle, diferença essa estatisticamente significativa.

Conforme citado anteriormente, inexistia na literatura dados para a interpretação do cortisol e DHEA em unhas de PT, e assim, a presente pesquisa agrega conhecimento inédito que contribui com avanços em método para o uso deste material biológico para dosagem desses esteroides em estudos futuros, além dos resultados encontrados relacionados ao estresse crônico neste segmento populacional de risco exposto a inúmeros estressores em unidades neonatais e submetidos ao Método Canguru. Com relação ao cortisol, não houve diferença significativa entre grupos canguru e controle, apesar do nível ser menor no canguru.

Embora não comparáveis dosagens de cortisol da unha com aquelas obtidas de outros materiais biológicos, trazemos o estudo de Morelius et al. (2015) que analisou o cortisol, de forma progressiva, na saliva de PT tardio (32 a 35 semanas idade gestacional) e de seus pais. Os

autores compararam o efeito do contato pele a pele quase contínuo (iniciado na sala de parto e permanecendo 24 horas por dia mesmo que com alternância entre o pai e a mãe) com grupo controle (contato pele a pele pelo tempo que as mães quisessem). Participaram 32 famílias, 23 do grupo contato pele a pele e 19 do cuidado convencional. O cortisol foi coletado das mães e dos bebês com um mês e com quatro meses de idade corrigida. Embora o estudo não mostrou diferença estatisticamente significativa no nível de cortisol dos PT e das mães, no grupo controle foi constatada média do cortisol mais alta no quarto mês do que no primeiro. No grupo contato pele a pele não houve diferença entre os tempos.

Tem-se apontado que o contato pela a pele favorece a regulação ao estresse, regula o ritmo cardíaco, a termorregulação, favorece o controle comportamental e desenvolve a interação mãe-bebê (FELDMAN et al., 2014). Os bebês que vivenciam o canguru têm maior oportunidade de contato com suas mães, pois elas permanecem 24 horas com seus filhos na UCINca e assim, esse tem maior oportunidade de regular o estresse que inevitavelmente enfrenta na unidade neonatal.

No presente estudo, a maioria dos PT vivenciou em média 10-19 horas de canguru/dia, sendo assim, vivenciaram no mínimo 70 horas por semana. Reynolds et al. (2013) avaliaram o comportamento neurológico de 81 bebês com idade gestacional ≤ 31 semanas e analisaram a visita dos pais e oportunidade de contato pele a pele. Os autores apontam que a média de horas por semana de visita dos pais foi de 21,33 horas, sendo que, com o passar dos dias de internação hospitalar, as horas de visita diminuíram. O tempo de contato pele a pele foi em média 2,29 horas (DP 1,47) por dia/semana. O estudo mostrou que, a maior taxa de visita dos pais e oportunidade de vivenciar o contato pele a pele foi associada ao menor estresse dos bebês. Com relação a DHEA, a distribuição entre os bebês PT foi significativamente diferente entre o grupo canguru e controle ($p < 0,01$), sendo o nível maior de DHEA naqueles PT que permaneceram em canguru durante a hospitalização. O alto nível de DHEA pode indicar um efeito protetor em situação de estresse crônico visto que, esse esteroide antagoniza os efeitos do cortisol (JOGEMS-KOSTERMAN et al., 2006).

Considerando que o cortisol e a DHEA têm efeitos antagônicos, é importante a análise da razão Cort:DHEA e não apenas um dos esteroides isoladamente, pois assim, como vários sistemas em nosso organismo, esses esteroides trabalham através de seu equilíbrio alternativo, ou seja, quando o cortisol é elevado desproporcionalmente à DHEA, a razão Cort:DHEA é mais elevada (JOGEMS-KOSTERMAN et al., 2006). Assim, a razão Cort:DHEA é considerada a forma mais confiável de análise, do que a avaliação dos esteroides separadamente (EL-TAWIL,

2010). Visto que a razão Cort:DHEA foi significativamente diferente entre o grupo canguru e controle ($p < 0,01$), sendo menor nos PT que permaneceram em canguru, e neste caso, o nível de cortisol também foi menor, tais dados sugerem que os bebês em canguru apresentaram menor estresse crônico que o grupo controle que recebeu o cuidado convencional. Não foram encontrados estudos para comparar DHEA e razão Cort:DHEA em PT submetidos ou não ao Método Canguru, destacando-se a necessidade de mais estudos para reforçar as evidências encontradas nesta pesquisa.

No que se refere a associação entre os resultados maternos e dos bebês PT, os resultados revelaram que o grupo canguru mostrou associação moderada positiva entre cortisol da mãe e cortisol do PT ($p = 0,40$) e a DHEA da mãe e bebê ($p = 0,42$). Quanto a razão Cort:DHEA da mãe e do PT, houve associação moderada ($p = 0,51$). O grupo controle apresentou associação positiva apenas entre a razão Cort:DHEA da mãe e do bebê ($p = 0,43$).

Apesar das diferenças metodológicas, estes resultados corroboram aqueles encontrados nos estudos de Morelius et al. (2015) e Castral et al. (2012), citados a seguir.

Morelius et al. (2015) constataram correlação entre cortisol salivar de mães e PT que vivenciaram o canguru, em avaliação feita no quarto mês de idade corrigida, após internação na unidade neonatal. Os bebês canguru ($n=18$) permaneceram cerca de 19 horas/dia no contato pele a pele e o grupo controle ($n=19$) 07 horas/dia. Já no grupo controle, os autores não verificaram correlação entre mães e bebês.

Ao examinar a concordância da reatividade a dor por meio do cortisol salivar em 42 mães com ou sem ansiedade e/ou depressão pós-parto e seus bebês PT, durante estresse relacionado a dor decorrente da punção de calcâneo para coleta do teste do pezinho, Castral et al. (2015) constataram que o cortisol pré-punção das mães estava fortemente associado ao cortisol salivar do PT em resposta ao procedimento doloroso. A depressão materna e/ou a ansiedade não foi associada ao cortisol do bebê PT. Durante a punção de calcâneo, mães e bebês não mostraram alteração no cortisol salivar. Os autores concluem que a concordância entre cortisol salivar materno e do PT favorece o papel regulador do estresse materno em contato pele a pele.

Assim, tais achados e aqueles obtidos na presente investigação corroboram com evidências que o Método Canguru traz benefícios na regulação do estresse materno e dos bebês PT.

Destaca-se ainda, a potencial relação entre resultados biológicos de estresse e medidas psicométricas como a PSS-10. O estudo realizado por Kalra et al. (2007) identificou associação

moderada ($p=0,47$) entre estresse crônico utilizando o cortisol de cabelos e a escala PSS-10. Dettenborn et al. (2010) e Lambert et al. (2014) também encontraram correlação positiva entre cortisol capilar em grávidas e a escala PSS-10. Outros estudos, realizados com adultos jovens (FARESJO et al., 2013) e mulheres de meia idade (FARESJÖ et al., 2014) também encontraram associação entre as duas medidas.

Diferentemente, na presente pesquisa não foi identificada qualquer relação entre medidas biológicas e medida psicométrica, pois os níveis de cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA na gestação materna (T1) não mostraram associações estatisticamente significantes com o estresse percebido pelas mães (PSS-10) ao mês anterior ao nascimento prematuro, analisando significância em duas extremidades. Estes resultados reforçam os estudos de Karlén et al. (2011) e Chan et al. (2014), que também não encontraram associação entre cortisol e PSS-10.

Com relação ao estresse materno no puerpério (T2) também constatamos inexistência de correlação entre cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA e a escala PSS:NICU nas métricas 1 (M1) e 2 (M2). Braig et al. (2015) também não identificaram associação entre estresse crônico e medida psicométrica de estresse, ansiedade e depressão, todavia, advertem para possíveis problemas com questionários. Da mesma forma, Alderdice et al. (2012) alertam para a necessidade de escalas específicas para eventos diferenciados no ciclo da vida.

O fato de não ter sido constatada a associação entre essas medidas no presente estudo pode ser devido a necessidade de utilização de instrumentos mais acurados para avaliação nesses momentos. No caso da gestação, Alderdice et al. (2012) apontam para a necessidade de instrumento especificamente criado para esse período de vida da mulher a fim de explorar aspectos que ocorrem nesse tempo, como mudanças da aparência física, preocupação com desenvolvimento do bebê, medo de complicações no parto, etc. Também chamam atenção para o fato que a forma retrospectiva não é a mais adequada quando se trata do momento perinatal, principalmente a aplicação do instrumento/escala após o parto com vistas a explorar experiência de estresse na gestação. Diferentes momentos da vida podem conduzir a diferentes respostas como, por exemplo, mães de PT tendem a respostas mais negativas quando relembram da gestação, já as mães de bebês saudáveis relembram aspectos positivos. A memória também pode levar ao viés da pesquisa.

Destaca-se como limitações deste estudo o fato de não se ter valores de referência para o cortisol e DHEA em unhas mães e de bebês PT e também a grande variabilidade na duração da internação do PT, de 3 a 104 dias, que repercute na menor ou maior exposição do bebê ao

estresse crônico e limita comparações acuradas dos níveis de estresse biológico e dos instrumentos psicométricos.

Finalmente, consideramos que os resultados obtidos reforçam a recomendação da OMS e do Ministério da Saúde do Brasil quanto a necessidade de propiciar o Método Canguru aos PT, pois, além das vantagens já descritas na literatura, os dados sugerem que esse pode diminuir o estresse crônico dos PT e reduzir o estresse psicológico materno na alta do PT para casa, corroborando com o preparo das mães para maternalizar, conhecer e prestar cuidados aos seus filhos durante a internação na unidade neonatal, levando-as a vivenciar menor estresse na alta, em especial o estresse relacionado ao seu papel de mãe de bebê PT.

Embora não seja foco deste estudo, apontamos também o fato de o percentual de bebês PT em AME na alta da unidade neonatal e aos três meses de vida ser superior no grupo canguru em comparação ao controle. Essa evidência também foi destacada na meta-análise realizada por Boundy et al. (2016), na qual os PT que vivenciaram canguru tiveram aumento de 50% na amamentação exclusiva na alta e 39% entre o primeiro e quarto mês após alta. A meta-análise mostrou também, que o contato pele a pele aumenta a amamentação exclusiva em até 1,5 vezes (RR 1,50; 95% CI 1,26, 1,78). Também, no estudo de Morelius et al. (2015), os bebês em contato pele a pele (quase contínuo) tiveram maior índice de aleitamento materno (exclusivo ou com complemento) no momento da alta da neonatologia e com quatro meses de idade corrigida.

A associação do cortisol, DHEA e razão Cort:DHEA do PT com os esteroides maternos reforça a necessidade do envolvimento da mãe no cuidado de seu filho, durante a permanência do bebê na unidade neonatal, bem como agrega mais uma evidência acerca da importância de sua presença na unidade.

O fato dos bebês PT submetidos ao canguru terem demonstrado menor razão Cort:DHEA em comparação com o grupo controle, e esse dado ser sugestivo de menor estresse, e as mães desse grupo não terem apresentado essa diferença, apontam para a necessidade de repensarmos esse resultado. Esse fato merece futuras investigações quanto as necessidades das mães no grupo canguru, se essas estão sendo negligenciadas e se elas são consideradas como alvo da assistência da equipe que trabalha na unidade neonatal como preconiza o Método Canguru brasileiro. Nota-se que essa avaliação foi uma limitação do presente estudo, pois não investigamos aspectos relacionados as necessidades maternas e ao processo de trabalho nas unidades neonatais, ou seja, se as necessidades maternas foram supridas durante a internação do filho bem como não foi avaliado a satisfação materna quanto a vivência do método canguru no período de permanência na unidade neonatal.

Pesquisas futuras merecem ampliar as medidas de estresse biológico, como por exemplo, o cortisol e a DHEA do cabelo e das unhas, com a respectiva razão Cort:DHEA, de modo a contribuir com fortes evidências sobre o estresse crônico, colaborar na comparação dos dados maternos e dos PT e compreender melhor o efeito fisiológico da relação entre esses esteroides na regulação do estresse. O fato de não coletarmos uma segunda amostra das unhas dos bebês, também constituiu aspecto limitante. Lembramos que essa não foi coletada devido à dificuldade em cortar unhas do PT na primeira semana após o nascimento. Assim, uma outra medida (ex. capilar) ou uma segunda amostra de unhas (ex. coletada no sexto mês de vida do bebê) poderia facilitar a comparação e melhor entendimento da evolução do estresse vivenciado pelos PT.

Consideramos também relevante o uso de instrumentos de medida no terceiro mês após parto, de modo a viabilizar outras comparações acerca da evolução do estresse psicológico das mães, instrumentalizando ações visando a melhoria da assistência e qualidade de vida desse segmento populacional.

Merece destaque ainda, as dificuldades decorrentes do acompanhamento das mães e dos PT, que levou à redução da amostra, tanto no hospital canguru como nos hospitais controle, aspecto esse limitante do estudo.

Apesar das limitações apontadas, esta investigação traz implicações relevantes para a prática clínica, dentre as quais apontamos o dimensionamento do cortisol e da DHEA de forma retrospectiva nas unhas de mães no puerpério reportando-se ao estresse vivenciado no terceiro trimestre de gravidez, utilizando a técnica de EIA, e em unhas de bebês PT, utilizando a técnica de CL/MS, bem como a evidência de que o Método Canguru reduz o estresse psicológico materno e o estresse biológico do PT, aspectos esses de suma importância para a assistência materno-infantil.

6 Conclusão

Os resultados apontam para as seguintes conclusões:

- ✓ É possível avaliar o estresse biológico utilizando a análise do cortisol e DHEA em unhas de mães e bebês PT para estimar o estresse crônico.
 - ✓ Conforme os níveis de cortisol e DHEA em unhas, os dados sugerem que não houve diferença no estresse crônico de mães que foram submetidas ao Método Canguru e o grupo controle, tanto no que se refere ao último trimestre da gestação quanto no puerpério, que inclui o tempo de internação do filho na unidade neonatal,
 - ✓ Os níveis de cortisol, DHEA e a razão Cort:DHEA das unhas maternas referente ao último trimestre da gestação foram significativamente maiores do que no puerpério, tanto no grupo canguru como no controle, o que é compatível com alterações hormonais fisiológicas decorrentes do processo gestacional.
 - ✓ O estresse psicológico materno analisado através da escala PSS:10 nos grupos canguru e controle foi vivenciado de forma similar tanto no terceiro trimestre de gestação quanto no período em que o bebê PT permaneceu na unidade neonatal, avaliado na alta do PT da UN.
 - ✓ No momento da alta do PT da unidade neonatal, as mães do grupo canguru mostraram redução significativa do estresse psicológico avaliado através da escala PSS:NICU, em comparação com a admissão (primeira semana pós-parto). O grupo controle manteve o mesmo nível de estresse tanto na admissão como na alta.
 - ✓ O grupo canguru, em comparação ao controle, mostrou nível significativamente menor da razão Cort:DHEA em unhas de bebês PT. Esse resultado sugere que o estresse de PT no canguru foi menor, agregando mais uma evidência acerca da importância do contato pele a pele mãe-filho na regulação do estresse biológico desses bebês.
 - ✓ Não houve associação entre esses esteroides materno (estresse crônico biológico) com as escalas psicométricas PSS 10 e PSS:NICU(estresse psicológico).
 - ✓ Houve associação moderada entre os esteroides analisados em unhas de mães com os esteroides dos bebês PT que vivenciaram internação na unidade neonatal, sugerindo que a mãe contribuiu para regulação do estresse crônico do filho PT.
-

Referências

- ALDER, J.N. et al. Depression and anxiety during pregnancy: a risk factor for obstetric, fetal and neonatal outcome: A critical review of the literature. **Maternal Fetal Neonatal Medicine**, v.20, p.189-209, 2007.
- ALDERDICE, F.; LYNN, F.; LOBEL, M. A review and psychometric evaluation of pregnancy-specific stress measures. **Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology**, v.33, n.2, p.62-77, 2012.
- ANAND, K.J.; SCALZO, F.M. Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? **Biology of the neonate**, v.77, n.2, p.69-82, 2000.
- ANDERZÉN-CARLSSON, A.; LAMY, Z.C.; ERIKSSON, M. Parental experiences of providing skin-to-skin care to their newborn infant--part 1: A qualitative systematic review. **International Journal of Qualitative Studies on Health and Well-being**, v.9, p.1-22, 2014.
- ANTONINI, S.R.; JORGE, S.M.; MOREIRA, A.C. The emergence of salivary cortisol circadian rhythm and its relationship to sleep activity in preterm infants. *The Journal of Clinical Endocrinology*, v.52, n.4, p.423-6, 2000.
- ANTONUCCI, R.R. et al. The infant incubator in the neonatal intensive care unit: unresolved issues and future developments. **Journal of Perinatal Medicine**, v.37, p.587-98, 2009.
- AKRITAS, M.G.; ARNOLD, S.F.; BRUNNER, E. Nonparametric hypotheses and rank statistics for unbalanced factorial designs. **Journal of the American Statistical Association**, v.92, p.258-65, 1997.
- AYERS, S. et al. The etiology of post-traumatic stress following childbirth: a meta-analysis and theoretical framework. **Psychological Medicine**, v.46, p.1121-34, 2016.
- BALEY, J.; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN. Skin-to-skin care for term and preterm infants in the neonatal ICU, **Pediatrics**, v.136, n.3, p.596-9, 2015.
- BEISHUIZEN, A.; THIJIS, L.G.; VERMES, I. Decreased levels of dehydroepiandrosterone sulphate in severe critical illness: a sign of exhausted adrenal reserve? **Critical Care**, v.6, n.5, p.434-8, 2002.
- BEN KHELIL, M. et al. Simultaneous measurement of endogenous cortisol, cortisone, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate in nails by use of UPLC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.401, n.4, p.1153-62, 2011.
- BEYDOUN, H.; SAFTLAS, A.F. Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: a review of recent evidence. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v.22, n.5, p.438-66, 2008.
- BHUTTA, A.T. et al. Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm. Meta-analysis. **JAMA**, v.288, n.6, p.728-37, Aug. 2002. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/11218041_Cognitive_and_behavioral_outcomes_of_school-aged_children_who_were_born_preterm_A_meta-analysis_Journal_of_the_American_Medical_Association_288_728-737. Acessado dia 24/12/2016.

BOUNDY, E.O. et al. Kangaroo mother care and neonatal outcomes: a meta-analysis. **Pediatrics**, v.137, n.1, p.e20152238, 2016.

BRAIG, S. Determinants of maternal hair cortisol concentrations at delivery reflecting the last trimester of pregnancy, **Psychoneuroendocrinology**, v.52, p.289-96, 2015.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, v.26, p.211-52, 1964.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Atenção à saúde do recém-nascido**. Guia para profissionais da saúde. Brasília: Ministério da Saúde. 4 v. (Série A. Normas e Manuais. Técnicas) 2011, 205p. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_canguru_manual_tecnico_2ed.pdf.
Acessado em: 29/12/2016.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Atenção à saúde do recém-nascido**. Guia para profissionais da saúde. Brasília: Ministério da Saúde, (Série A. Normas e Manuais. Técnicas) 2013, 206p. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atencao_humanizada_recem_nascido_canguru.pdf.
Acessado em: 29/12/2016.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Manual do método canguru**: seguimento compartilhado entre a Atenção Hospitalar e a Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 274p.

BURNS, E.R. et al. Stressful life events experienced by women in the year before their infants' births-United States, 2000–2010. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v.64, n.9, p.247-51, Mar. 2015.

CASTRAL, C.C. et al. Fatores maternos influenciam a resposta à dor e ao estresse do neonato em posição canguru. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v.20, n.3, p.464-71, maio-jun. 2012. [9 telas]. Disponível em:
http://www.producao.usp.br/bitstream/handle/BDPI/36691/wos2012-4909_pt.pdf?sequence=3.
Acessado em 24/12/2016.

CASTRAL, C.C. et al. Maternal mood and concordant maternal and infant salivary cortisol during heel lance while in Kangaroo care. **European Journal of Pain**, v.19, p.429-38, 2015.

CASTRO, M.; MOREIRA, A.C. Análise Crítica do cortisol Salivar na Avaliação do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal. **Arquivos Brasileiro Endocrinologia e Metabologia**, v.47, n.4, p.358-67, Ago. 2003.

CHAYYA, M. et al. Validation of the Arabic version of the Cohen perceived stress scale (PSS-10) among pregnant and postpartum women. **BMC Psychiatry**, v.10, p.1-7, 2010.

CHAN, J. et al. Measurement of cortisol and testosterone in hair of obese and non-obese human subjects. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity. Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v.21, n.4, p.306-11, 2014.

CHARALAMPOPOULOS, I. et al. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival *Trends in Endocrinology & Metabolism.*, v.19, n.8, p.300-7, Out. 2008.

CHIEJINA, E.N. et al. Stress among parents of hospitalized infants in NICU: effects on parental needs and expectations international. *Journal of Scientific Research in Knowledge*, v.3, n.3, p.77-84, 2015. Available online at <http://www.ijsrpub.com/ijsrk>

CHOURASIA, N. et al. NICU admissions and maternal stress levels. *The Indian Journal of Pediatrics*, v.80, n.5, p.380-4, Mai. 2013.

CIRIMELE, V. et al. Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography ionspray massspectrometry. *Forensic Science International*, v.107, n.1, p.381-8, 2000.

CLASS, Q.A. et al. Timing of prenatal maternal severe life events and adverse pregnancy outcomes: a population study of 2.6 million pregnancies. *Psychosomatic Medicine*, v.73, p.234-41, 2011.

CLEVELAND, L.M. Parenting in neonatal intensive care unit. *Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing*, v.37, p.666-91, 2008.

COHEN, S.; WILLIAMSON, G. Perceived stress in a probability sample of the United States. In: SPACAPAN, S.; OSKAMP, S. (Ed.). *The social psychology of health*: Claremont symposium on applied social psychology. Newbuiy Park, CA: Sage 1988. Disponível: [http://www.psy.cmu.edu/~scohen/Cohen%2C%20S.%20%26%20Williamson%2C%20G.%20\(1988\).pdf](http://www.psy.cmu.edu/~scohen/Cohen%2C%20S.%20%26%20Williamson%2C%20G.%20(1988).pdf). Acessado em 24/12/2016

CORE TEAM (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013. URL. Disponível em: <http://www.R-project.org/> Acessado em: 04/11/2016.

CONDE-AGUDELO, A.; DÍAZ-ROSSELLO, J.L. Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v.12, 2014. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD002771.pub2/epdf>. Acessado em 24/12/2016.

D'ANNA-HERNANDEZ, K.L. et al. Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic–pituitary axis activity throughout pregnancy: Comparison to salivary cortisol. *Physiology and Behavior*, v.104, p.348-53, 2011.

- DAVIS, E.P. et al. Prenatal maternal stress programs infant stress regulation. **Journal of child psychology and psychiatry**, v.52, n.2, p.119-29, 2011.
- DE BERKER, D.A.; ANDRE, J.; BARAN, R. Nail biology and nail science. **International journal of cosmetic science**, v.29, n.4, p.241-75, 2007.
- DE DONCKER, P.D.; PIERARD, G.E. Acquired nail beading in patients receiving itraconazole an indicator of faster nail growth? A study using optical profilometry. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.19, n.5, p.404-6, 1994.
- DE KLOET, E.R.; JOELS, M.; HOLLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v.6, n.6, p.463-75, 2005.
- DETTENBORN, L. et al. Higher cortisol content in hair among long-term unemployed individuals compared to controls. **Psychoneuroendocrinology**, v.35, n.9, p.1404-9, 2010.
- DOUGLAS, A.J. Baby on board: Do responses to stress in the maternal brain mediate adverse pregnancy outcome? Alison J. Douglas *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.31, p.359-76, 2010.
- DUDEK-SHRIBER, L. Parent stress in the neonatal intensive care unit and the influence of parent and infant characteristics. **American Journal of occupational therapy**, v.5, p.509-20, 2004.
- EL-TAWIL, A.M. Is the DHEAS/cortisol ratio a potential filter for non-operable constipated cases? **World Journal of Gastroenterology**, v.16, n.6, p.659-62, 2010.
- ENGMANN, S. et al. Consensus on kangaroo mother care acceleration. **Lancet**, v.382, p.e25-e27, 2013. Disponível em: www.thelancet.com. Acessado: em 09/07/2014.
- FARESJO, A. et al. Higher perceived stress but lower cortisol levels found among young Greek adults living in a stressful social environment in comparison with Swedish young adults. **PLoS One**, v.8, n.9, p.e73828-10.1371, 2013.
- _____. et al. Higher perceived stress and poorer health reflected in elevated cortisol concentrations measured in extracts of hair from middle-aged healthy women. **BMC Psychology**, v.2, p.30, 2014.
- ENTRINGER, A.P. et al. Análise de custos da atenção hospitalar a recém-nascidos de risco: uma comparação entre unidade intermediária convencional e unidade canguru. **Caderno de Saúde Pública**, v.29, n.6. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.org/pdf/csp/v29n6/a17v29n6.pdf>. Acessado em: 12/02/2015
- FELDMAN, R.; ROSENTHAL, Z.; EIDELMAN, A.I. Maternal-preterm skin-to-skin contact enhances child physiologic organization and cognitive control across the first 10 years of life. **Biological Psychiatry**, v.75, p.56-64, 2014.

- FOWLIE, P.W.; MCHAFFIE, H. Supporting parents in the neonatal unit. ABC of preterm birth. Supporting parents in the neonatal unit. **British Medical Journal**, v.329, p.1336-1338, Dez. 2004.
- FRANCK, L.S. et al. Measuring neonatal intensive care unit-related parental stress. **Journal of advanced nursing**, v.49, n.6, p.608-15, 2005.
- FRENZ, C.; FRITSCH, H.; HOCH J. Plastination histologic investigations on the inserting pars terminalis aponeurosis dorsalis of three-sectioned fingers. *Anat Anz* v.182, p.69-73, 2000. In: GRUNDZÜGE HANEKE E., **Anatomie, Biologie, Physiologie und Grundzüge der Pathologie des Nagelorgans**. *Hautarzt*, v.65, p.282-90, 2014.
- GENAZZANI, A.R.; FRAIOLI, F.; HURLIMANN, J.; FIORETTI, P.; FELBER, J.P. Immunoreactive ACTH and cortisol plasma levels during pregnancy. Detection and partial purification of corticotrophin-like placental hormone: the human chorionic corticotrophin (HCC). **Clin Endocrinol**, v.4, 1975. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.library.ubc.ca/doi/10.1111/j.1365-2265.1975.tb03299.x/pdf>. Acessado em 07/03/2017.
- GHAVANE, S. et al. Kangaroo mother care in kangaroo ward for improving the growth and breastfeeding outcomes when reaching term gestational age in very low birth weight infants. **Acta Paediatrica**, v.101, n.12, p.e545–e549, 2012.
- GIURGESCU, C. A clinical translation of the research article titled “Antenatal psychobiological predictors of psychological response to childbirth”. **Journal of the American Psychiatric Nurses Association**, v.17, n.6, p.426-30, 2011.
- GOLDBERG, S. et al. Cortisol concentrations in 12- to 18-month-old infants: stability over time, location, and stressor. **Biological Psychiatry**, v.54, p.719-26, 2003.
- GONYA, J.; NELIN, L.D. Factors associated with maternal visitation and participation in skin-to-skin care in an all referral level IIIc NICU. **Acta Paediatrica**, v.112, p.e53–e56, 2013.
- GRIFFIN, T.; WISHBA, C.; KAVANAUGH, K. Nursing interventions to reduce stress in parents of hospitalized preterm infants. **Journal of Pediatric Nursing**, v.13, n.5, p.290-5, 1998.
- HERMAN, J.P. et al. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. **Brazilian Journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v.45, n.4, p.292-298, Apr. 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2012000400002. Acessado em 24/12/2016.
- HIGASHI, T. et al. Methods for determination of fingernail steroids by LC/MS/MS and differences in their contents between right and left hands. **Steroids**, v.109, p.60-9, 2016.
- HOBEL, C. et al. Psychosocial stress and pregnancy outcome. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.51, n.2, p.333-48, Jun. 2008.

- HUNTER, A.L.; MINNIS, H.; WILSON, P. Altered stress responses in children exposed to early adversity: A systematic review of salivary cortisol studies. **Stress**, v.14, p.6, p.614-26, 2011.
- ICHISATO, S.M.T.; SCOCHI, C.G.S. Ruídos na unidade de cuidado intensivo neonatal durante as passagens de plantão (enfermagem e/ou médica) e visita médica. **Ciência, Cuidado e Saúde Maringá**, v.5, Supl., p.127-33, 2006.
- IZAWA, S. et al. Salivary dehydroepiandrosterone secretion in response to acute psychosocial stress and its correlations with biological and psychological changes **Biological Psychology**, v.79, n.3, p.294-8, Dec. 2008.
- IZAWA, S. et al. Cortisol level measurements in fingernails as a retrospective index of hormone production. **Psychoneuroendocrinology**, v.54, p.24-30, 2015.
- JOHNSON, A.N. Engaging fathers in the NICU: taking down the barriers to the baby. **Journal of Perinatal and Neonatal Nursing**, v.22, n.4, p.302-6, Dez. 2008.
- JOHNSTON, C.C. Skin-to-skin care for procedural pain in neonates. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.12, 2014. Disponível em: <http://cochrane.bvsalud.org/cochrane/show.php?db=reviews&mfn=&id=CD008435&lang=&dblang=&lib=COC&print=yes> Acessado dia 12/02/2015.
- JOGEMS-KOSTERMAN, B.J.M. et al. Basal cortisol and DHEA levels in women with borderline personality disorder. **The Journal of Psychiatric Research**, v.41, n.12, p.1019-26, 2006.
- JURUENA, M.F.; CLEARE, A.J.; PARIANTE, C.M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v.26, n.3, p. 189-201, Set. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462004000300009&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 10/07/2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462004000300009>.
- KALRA, S. et al. The relationship between stress and hair cortisol in healthy pregnant women. **Clinical and Investigative Medicine. Médecine Clinique Et Experimentale**, v.30, n.2, p.E103-7, 2007.
- KARLÉN, J. et al. Cortisol in hair measured in young adults-a biomarker of major life stressors? **BMC Clinical Pathology**, v.11, n.1, p.12, 2011.
- KHASHAN, A.S. et al. Rates of preterm birth following antenatal maternal exposure to severe life events: a population-based cohort study. **Human Reproduction**, v.24, p.429-37, 2009.
- KIMBERLY, L. et al. Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary axis activity throughout pregnancy: Comparison to salivary cortisol. **Physiology and Behavior**, v.104, p.348-53, 2011.

-
- KONDURU, L. Biomarkers of chronic stress. Dissertação (Mestrado), University of Pittsburgh, 2011, 57p. Disponível em <file:///C:/Users/User/Desktop/defini%C3%A7%C3%A3o%20estresse%20cronico.pdf>. Acessado em 07/03/2017.
- LAI, T.T.; BEARER, C.F. Iatrogenic environment hazards in the neonatal intensive care unit. **Clinics in Perinatology**, v.35, n.1, p.163-81, 2007.
- LAMBERT, C.A. et al. Chronic HPA axis response to stress in temporomandibular disorder. **American Dental Hygienists Association**, v.88, n. suppl 1, p.5-12, 2014.
- LASIUK, G. et al. Unexpected: an interpretive description of parental traumas' associated with preterm birth. **BMC Pregnancy Childbirth**, v.13, supl 1, p. s:13, 2013. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2393/13/S1/S13> Acessado em 23/01/15.
- LAU, R.G.L. **Stress experiences of parents with premature infants in a special care nursery** [thesis]. Australia, 2001. [cited 2009 March 28]. Available from: <http://wallaby.vu.edu.au>
- LAU, R.G.L.; MORSE, C.A. Stress experiences of parents with premature infants in a special care nursery (thesis). **Stress Health**, v.19, p.69-78, 2003.
- LAUREANO, G.H. **Coefficiente de correlação intraclasse**: comparação entre métodos de estimação clássico e bayesiano. Monografia apresentada para obtenção de grau de Bacharel em Estatística UFRS. Porto Alegre. 2011. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/36714>. Acessado em: 24/12/2016.
- LAWN, J.E. et al. Kangaroo mother care' to prevent neonatal deaths due to preterm birth complications. **International Journal of Epidemiology**, v.39, p. i144-i154, 2010. Disponível em: http://ije.oxfordjournals.org/content/39/suppl_1/i144.long. Acessado em: 24/12/2016.
- LAZARUS, R.S. **Psychological stress and coping process**. McGraw-Hill: New York, 1966.
- LEE, H.C.; MARTIN-ANDERSON, S.; DUDLEY, RA. Clinician perspectives on barriers to and opportunities for skin-to-skin contact for premature infants in neonatal intensive care units. **Breastfeeding Medicine**, v.7, n.2, p.79-84, Abr. 2012.
- LEMOES, N.P.; ANDERSON, R.A.; ROBERTSON, J.R. Nail analysis for drugs of abuse: Extraction and determination of cannabis in fingernails by RIA and GC-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v.23, p.147-52, Mai/Jun. 1999.
- LESAGE, F.X.; BERJOT, S.; DESCHAMPS, F. Clinical stress assessment using a visual analogue scale. **Occupational Medicine**, v.62, p.600-5, Set. 2012.
- LI, J.X. et al. Time course of cortisol levels in hair segments under immersion in hot water. **Clinica Chimica Acta; international journal of clinical chemistry**, v.413, n.3-4, p.434-40, Fev. 2012.
-

- LIPP, M.E.N. Estresse emocional: a contribuição de estressores internos e externos. **Revista de psiquiatria clínica**, v.28, n.6, p.347-49, 2001.
- LITTLETON, H.L. et al. Psychosocial stress during pregnancy and perinatal outcomes: a meta-analytic review. **Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynecology**, v.31, n.4, p.219-28, 2010.
- LUFT, C.D.B. et al. Versão brasileira da Escala de Estresse Percebido: tradução e validação para idosos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.41, n.4, p.606-15, Ago. 2007. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102007000400015>. Acessado em 24/12/2016.
- LYNN, F.A. et al. Associations between maternal characteristics and pregnancy-related stress among low-risk mothers: An observational cross-sectional study **International Journal of Nursing Studies**, v.48, p.620-7, 2011.
- MACCARI, S. et al. Prenatal stress and longterm consequences: Implications of glucocorticoid hormones. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.27, p.119-27, 2003.
- MAIDANA, P.; BRUNO, O.D.; MESCH, V. Medición de cortisol y sus fracciones una puesta al día. **Medicina**, Buenos Aires. v.73, p.579-84, 2013.
- McCARTHY, F.P. et al. Previous pregnancy loss has an adverse impact on distress and behaviour in subsequent pregnancy. **An International Journal of Obstetrics & Gynaecology - BJOG**, v.122, p.1757-64, 2015.
- McEWEN, B.S. et al. Protective and damaging effects of stress mediators. **New England Journal of Medicine**, v.338, n.3, p.171-9, 1998.
- MILES, M.S.; FUNK, S.G.; CARLSON, J. Parental Stress Scale: neonatal intensive care unit. **Nursing Research**, v.42, n.1, p.48-52, 1993.
- MILEWICH, L.; GOMEZ-SANCHEZ, C.; MADDEN, J.D. et al. Dehydroisoandrosterone sulfate in peripheral blood of premenopausal, pregnant and postmenopausal women and men. **J Steroid Biochem**, v.9, p.1159-64, 1978. Disponível em http://ac.els-cdn.com.ezproxy.library.ubc.ca/0022473178900067/1-s2.0-0022473178900067-main.pdf?_tid=2beca456-036a-11e7-9e98-00000aab0f02&acdnat=1488914199_79e85ed407820a0b3991034783fda227. Acessado em 07/03/2017.
- MOAL, M.L. Historical approach and evolution of the stress concept: a personal account. **Psychoneuroendocrinology**, v.32, p.S3-S9, 2007.
- MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 5.ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons Inc., 2000.
- MOORE, E.R. et al. Early skin-to-skin contact for mothers and their healthy newborn infants. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.5, p.1-75, 2012. Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD003519.pub2/abstract> Acessado em: 24/12/2016.

MORELIUS, E. et al. A randomised trial of continuous skin-to-skin contact after preterm birth and the effects on salivary cortisol, parental stress, depression, and breastfeeding. **Early Human Development**, v.91, n.1, p.63-70, Dec. 2015.

MULDER, E.J.H. et al. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. **Early Human Development**, v.70, p.3-14, 2002.

NASCIMENTO, T.O.; MARANHÃO, D.G. Prevenção do estresse neonatal: desafio para a equipe de enfermagem. **Revista de enfermagem da Univesidade de Santo Amaro**, v.11, n.2, p.134-7, 2010.

NAST, I. et al. How to measure prenatal stress? A systematic review of psychometric instruments to assess psychosocial stress during pregnancy. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v.27, p.313-22, 2013.

NAZARIO, A. et al. Avaliação dos ruídos em uma unidade neonatal de um hospital universitário. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.36, n.1, supl, p.189-98, Ago. 2015.

NEPOMNASCHY, P.A. et al. Is cortisol excretion independent of menstrual cycle day? A longitudinal evaluation of first morning urinary specimens. **PLOS ONE**, v.6, n.3, p. e18242, 2011.

NEVES, C.; MEDINA, J.L.; DELGADO, J.L. Alterações endócrinas e imuno-modulação na gravidez. **Arq Med**, Porto, v.21, n.5-6, p.175-182, 2007. Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-34132007000400007&lng=pt&nrm=iso>. Acessado em 07/03/ 2017.

NEWNHAM, C.A. et al. Measuring preterm cumulative stressors within the NICU: The neonatal infant stressor scale. **Early Human Development**, v.85, p.549-55, 2009.

ORTIZ, M.S. et al. How stress gets under the skin o cómo el estrés psicológico se introduce bajo la piel. **La Revista Médica de Chile**, v.142, p.767-74, 2014.

OKAMOTO, E.; TAKAGI, T.; MAKINO, T. et al. Immunoreactive corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin and cortisol in human plasma during pregnancy and delivery and postpartum. **Horm Metab Res**, v.21, p.566-72, 1989. Disponível em: <https://www-thieme-connect-de.ezproxy.library.ubc.ca/products/ejournals/pdf/10.1055/s-2007-1009289.pdf> . Acessado em 07/03/2017.

PALMERI, A. et al. Drugs in nails: physiology, pharmacokinetics and forensic toxicology. **Clinical Pharmacokinetics**, v.38, n.2, p.95-110, 2000.

PALLANT J. **SPSS Survival Manual: A step by step guide to data analysis using the SPSS program**. 4.ed. Open University Press: McGraw-Hill Education, 2010, 345p.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de bioestatística**. São Paulo: Thomson, 2004.

POLIT, D.F.; HUNGLER, B.P. **Fundamentos de pesquisa em enfermagem: avaliação de evidências para a prática de enfermagem**. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, 670p.

- RAINES, D.A. et al. Mothers' stressor as day of discharge from the NICU approaches. **Advances in Neonatal Care**, v.13, n.3, p.181-7, 2013.
- RAMOS H.A.C.; CUMAN, R.K.N. Fatores de risco para prematuridade: pesquisa documental. **Escola Anna Nery Revista Enfermagem**, v.13, n.2, p.297-304, Abr-Jun. 2009.
- RAO, S.P.N.; UDANI, R.; NANAVATI, R. Kangaroo mother car for low birth weight infants: a randomized controlled trial. **Indian Pediatrics**, v.45, p.17-23, Jan. 2008.
- REYNOLDS, L.C. et al. Parental presence and holding in the neonatal intensive care unit and associations with early neurobehavior. **Journal of Perinatology**, v.33, p.636-41. 2013.
- RIBEIRO, L.M. et al. O leite humano no alívio da dor neonatal no exame de fundo de olho. **Revista da Escola de Enfermagem na USP**, São Paulo, v.47, n.5, p.1039-45, Oct. 2013. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0080-62342013000501039&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 26/05/16.
- RIVKEES et al., 2004 in LAI, T.T.; BEARER, C.F. Iatrogenic environment hazards in the neonatal intensive care unit. **Clinics in Perinatology**, v. 35, n.1, p.163-ix, 2007.
- ROBERTS, K.L.; PAYNTER, C.; McEWAN, B. A comparison of kangaroo mother care and conventional cuddling care. **Neonatal Network**, v.19, p.31-35, 2000.
- RODRIGUES, O.M.P.R.; SCHIAVO, R.A. Stress na gestação e no puerpério: uma correlação com a depressão pós-parto. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.33, n.9, p.252-7, 2011.
- RODRIGUES, T.L.; ROCHA, H.B. Physical abuse during pregnancy and preterm delivery. **American Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.198, p.171.e1-171.e6, 2008.
- ROSSMAN, B. et al. The role of peer support in the development of maternal identity for "NICU Moms", **Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing**, v.44, p.3-16, 2015.
- RUIZ, A.L. et al. Estrés y depresión en madres de prematuros: un programa de intervención. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v.103, n.1, p.36-45, 2005.
- RUSSEL, S. et al. Hair cortisol as a biological biomarker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. **Psychoneuroendocrinology**, v.37, n.5, p.589-601, 2012.
- SAMRA, H. et al. Effect of skin-to-skin holding on stress in mothers of late-preterm infants. **Advances in Neonatal Care**, v.15, n.5, p.354-64, 2015.
- SCHALL, R. Estimation in generalized linear models with random effects. **Biometrika**, v.78, n.4, p.719-27, 1991.
- SCHAPPIN, R. et al. Rethinking stress in parents of preterm infants: a meta-analysis **Plos One**, v.8, n.2, p.1-17, Feb. 2013. Disponível: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0054992&representation=PDF> acessado em 07/abril/2014.

SCHMIDT, N.A.; BROWN, J.M. **Evidence-based practice for nurses**: appraisal and application of research. 2nd Edition. Sudbury, MA/USA: Jones & Bartlett Learning, 2012.

SCOCHI, C.G.S. et al. Incentivando o vínculo mãe-filho em situação de prematuridade: as intervenções de enfermagem no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v.11, n.4, p.539-43, Aug. 2003.

SCOCHI, C.G.S. et al. A dor na unidade neonatal sob a perspectiva dos profissionais de enfermagem de um hospital de Ribeirão Preto-SP. **Revista brasileira de enfermagem** [online], v.59, n.2, p.188-94, 2006. Disponível em: <http://www.redalyc.org/pdf/2670/267019622013.pdf>. Acessado em 24/12/2016.

SELYE, H. The stress concept in 1955. **Journal of Chronic Diseases**, v.2, n.5, p.583-92, Nov. 1955.

SELYE, H. Forty years of stress research principal remaining problems and misconceptions. **Canadian Medical Association Journal**, v.113, p.53-6, 1976.

SHAW, R.J. et al. Acute stress disorder among parents of infants in the neonatal intensive care nursery. **Psychosomatics**, v.47, n.3, p.206-12, 2006.

SHAW, R.J. et al. The relationship between acute stress disorder and posttraumatic stress disorder in the neonatal intensive care unit. **Psychosomatics**, v. 50, n.2, p.131-7, 2009.

SHEN, M. et al. Determination of opiates in human fingernail – Comparison to hair. **Journal of Chromatography B**, v.967, p.84-9, 2014.

SINGER, J.M.; POLETO, F.Z.; ROSA, P. Parametric and nonparametric analyses of repeated ordinal categorical data. **Biometrical Journal**. v.46, p.460-73, 2004.

SILVA, E.A.T.; MARTINEZ, A. Diferença em nível de stress em duas amostras: capital e interior do estado de São Paulo. **Estudos de Psicologia**, Campinas, v.22, n.1, p.53-61, 2005.

SILVA, A.M.B.; EUNUMO, S.M.F. Estresse em um fio de cabelo: revisão sistemática sobre cortisol capilar. **Avaliação Psicológica**, v.13, n.2, p. 203-11, 2014.

SILVA, E.A.T.; MARTINEZ, A. Diferença em nível de stress em duas amostras: capital e interior do estado de São Paulo. **Estudos de Psicologia**, Campinas, v.22, n.1, p.53-61, 2005.

SILVA, F.C.S. et al. Depressão pós parto em puérperas: conhecendo interações entre mãe, filho e família. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.23, n.3, p.411-6, 2010.

SMY, L. et al. Hair cortisol as a hypothalamic-pituitary-adrenal axis biomarker in pregnant women with asthma: a retrospective observational study. **BCM pregnancy and childbirth**, v.16, n.176, 1-10 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4955128/pdf/12884_2016_Article_962.pdf. Acessado em: 24/12/2016.

SOUSA, M.W.C.R.; SILVA, W.C.R.; ARAÚJO, S.A.N. Quantificação das manipulações em recém-nascidos pré-termo em Unidade de Terapia Intensiva: uma proposta de elaboração de protocolo. **ConScientiae Saúde**, v.7, n.2, p.269-74, 2008. Disponível em

http://www.uninove.br/pdfs/publicacoes/conscientiae_saude/csaude_v7n2/cnsv7n2_3o.pdf.
Acessado em 26/01/2015.

SOUZA, S.R.; DUPAS, G.; BALIEIRO, M.M.G. Adaptação cultural e validação para a língua portuguesa da Parental Stress Scale: Neonatal Intensive Care Unit (PSS:NICU). **Acta Paulista de Enfermagem**, v.25, n.2, p.171-6, 2012.

STALDER, T.; KIRSCHBAUM, C. Analysis of cortisol in hair – State of the art and future directions. **Brain, Behavior and Immunity**, v.26, p.1019-29, 2012.

STANEVA, A. The effects of maternal depression, anxiety, and perceived stress during pregnancy on preterm birth: A Systematic review. **Women and birth: journal of the Australian College of Midwives**, v.28, n.28, p.179-93. Set. 2015.

TALGE, N.M. et al. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v.48, n.3-4, p.245-61, 2007.

TALLANDINI, M.; CHIARA, S. Kangaroo mother care and mother-premature infant dyadic interaction. **Infant Mental Health Journal**, v.27, p.251-75, 2006.

TANDU-UMBA, B. et al. Maternal stress and pregnancy outcomes. **Open Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.4, p.361-70, 2014. Published Online May 2014 in SciRes.<http://www.scirp.org/journal/ojog> <http://dx.doi.org/10.4236/ojog.2014.47054> Acessado em 21/06/2016.

TEGETHOFF, M. et al. Maternal psychosocial stress during pregnancy and placenta weight: Evidence from a national cohort study. **PLOS One**, v.5, n.12, e14478, 2010.

TEGETHOFF, M. et al. Dehydroepiandrosterone in nails of infants: A potential biomarker of intrauterine responses to maternal stress. **Biological Psychology**, v.87, n.3, p.414-20, 2011.

TRONCHIN, D.M.R.; TSUNECHIRO, M.A. A experiência de tornarem-se pais de prematuro: um enfoque etnográfico. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.58, n.1, p.49-54. Jan-Fev. 2005.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**, v.53, p. 865-71, 2002.

TUCKER, J.; MCGUIRRE, W. Epidemiology of preterm birth. **British Medical Journal**, v.329, n.7467, p.675-8, 2005.

TURAN, T.; BASBAKKAL, Z.; OZBEK, S. Effect of nursing interventions on stressors of parents of premature infants in neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Nursing**, v.17, n.21, p.2856-66, 2008.

TURNER, M. et al., The assessment of parental stress and support in the neonatal intensive care unit using the Parent Stress Scale – Neonatal Intensive Care Unit. **Women and Birth**, v.28, n.3, p.252-58, Set. 2015.

- ULRICH-LAI, Y.M.; HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature reviews neuroscience**, v.10, p.397-409, 2009.
- VAN NIEKERK, J.K.; HUPPERT, F.A.; HERBERT, J. Salivary cortisol and DHEA: association with measures of cognition and well-being in normal older men, and effects of three months of DHEA supplementation. **Psychoneuroendocrinology**, v.26, n.6, p.591-612, Ago. 2001.
- VANAELST B. et al. 2012. Intercorrelations between serum, salivary, and hair cortisol and child-reported estimates of stress in elementary school girls. **Psychophysiology**, v.49, p.1072-81, 2012.
- VANDERBILT, D. et al. Acute posttraumatic stress symptoms among urban mothers with newborns in the neonatal intensive care unit: a preliminary study. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**, v.30, n.1, p.50-6, 2009.
- WADHWA, P.D. Psychoneuroendocrine processes in human pregnancy influence fetal development and health. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, n.8, p.724-43, 2005.
- WAKEEL, F. et al. The balance between stress and personal capital during pregnancy and the relationship with adverse obstetric outcomes: findings from the 2007 Los Angeles Mommy and Baby (LAMB) study. **Archives of Women's Mental Health**, v.16, p.435-51, 2013.
- WARNOCK, F.F. et al. Measuring cortisol and DHEA in fingernails: A pilot study. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.6, p.1-7, 2010.
- WARNOCK, F.F. Brief report: maternal kangaroo care for neonatal pain relief: a systematic narrative review. **Journal of Pediatric Psychology**, v.35, n.9, p.975-84, 2010.
- WEIS, J. et al. The effect of person-centred communication on parental stress in a NICU: a randomized clinical trial, **Acta Paediatrica**, v.102, p.1130-6, 2013.
- WERNET, M. **Experiência de tornar-se mãe na unidade de cuidados intensivos neonatal**. 2007. Tese [Doutorado] São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Born too soon: the global action report on preterm birth**. Eds CP Howson, MV Kinney, JE Lawn. Geneva: World Health Organization, 2012. Disponível em: http://www.who.int/pmnch/media/news/2012/201204_borntoosoon-report.pdf. Acessado em 31/10/2016.
- WOODS, S.M. et al. Psychosocial stress during pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.202, n.1, p.61.e1-61.e7, 2010.
- YAMADA, J. et al. Hair cortisol as a potential biologic marker of chronic stress in hospitalized neonates. **Neonatology**, v.92, p.42-9, 2007.
-

Apêndices

APÊNDICE A**INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS****I - Dados da Mãe**

1. CÓDIGO DO FORMULÁRIO:
2. Nome: _____
3. Endereço: _____
4. Telefone casa: _____
5. Telefone celular e operadora: _____

DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS

6. **Domiciliada** em: Cidade: _____ Estado/UF: _____
7. Zona de domicílio: 1 Urbana() 2 Rural()
8. **Idade** (em anos): _____
9. **Cor/Raça** referida: _____
10. **Estado civil**:
1 Solteira() 2 Casada() 3 Divorciada() 4 União consensual() 5 Viúva()
11. **Profissão** (formação profissional – superior ou não): _____
12. **Ocupação** (trabalho atual): _____
13. **Escolaridade** segundo IBGE:
1 Sem estudo () 2 Ensino Fundamental Incompleto() 3 Ensino Fundamental Completo() 4 Ensino Médio Incompleto() 5 Ensino Médio Completo () 6 Ensino Superior Incompleto() 7 Ensino Superior Completo()
14. **Renda familiar mensal** (valor em R\$): _____
1 Ignorado() 2 Menor que 1 salário mínimo regional() 3 De 1 a 2 salários mínimos() 4 De 3 a 5 salários mínimos() 5 Mais que 5 salários mínimos()
15. **Morada**:
1 () Própria 2 () Alugada 3 () Outro. Especifique: _____
16. **Quantas pessoas moram na casa** (incluir a entrevistada)?
1 () sozinha 2 () 2 3 () 3 4 () 4 5 () 5 6 () 6 ou mais
17. **Números de filhos vivos**: _____
18. **Já cuidou de recém-nascido antes?** 1 () Sim 0 () Não

DADOS GESTACIONAIS E DO PARTO

19. Fez **Pré-Natal**?: 1 Sim() Número de consultas: _____ 0 Não()
 20. Local: 1 Posto/Unidade de Saúde() 2 Hospital() 3 Outro(). Especifique: _____
 21. Número de Gestações: _____ Número de paridade: _____
-

22. **Intercorrências nesta gestação:** 0 Não () 1 Sim()
Quais? _____
23. **Situações estressantes nesta gestação:** 0 Não () 1 Sim()
Quais? _____
24. **Tipo de gestação:** 1 Única () 2 Dupla () 3 Tripla ou mais ()
25. **Medicações na gestação:** 0 Não () 1 Sim()
Quais? _____
26. **Drogas na gestação:** 0 Não () 1 Sim()
Quais? _____
27. **Fumo na gestação:** 0 Não () 1 Sim()
Consumo diário: _____ cigarros
28. **Tipo de parto:** 1 Vaginal() 2 Cesáreo() 3 Vaginal com fórceps()
29. **Intercorrências no parto:** 0 Não () 1 Sim()
Quais? _____
30. **História de parto prematuro anterior:**
1 Sim() 2 Não() 3 Não se aplica-primípara()
31. **História de amamentação anterior:**
1 Sim() 2 Não() 3 Não se aplica-primípara()
32. Data da alta hospitalar: / /

II - Dados do PT

1. CÓDIGO DO FORMULÁRIO:
2. Nome da mãe: _____
3. Data da coleta dos dados: / /

CONDIÇÕES DE NASCIMENTO

4. **Data** do nascimento: / / **Hora** do nascimento: _____ h
5. **Sexo:** 1 Masculino() 2 Feminino() 3 Indeterminado()
6. **Idade gestacional:** _____ semanas e _____ dias
7. **Avaliação/Método:** 1 USG() 2 DUM() 3 Capurro() 4 Ballard() 5 Ignorado()
8. **Peso** ao nascer: _____ gramas
9. **Apgar** 1º minuto: _____ 10. **Apgar** 5º minuto: _____
11. **Reanimação** (VPP e/ou massagem cardíaca e/ou medicação):
1 Sim() 2 Não()
12. **Intercorrências clínicas:** 1 Hipóxia() 2 Tocotraumatismo()
3 Malformações congênitas() 4 Aspiração meconial() 5 Outra()
6 Ignorado() 7 Não houve()

CONDIÇÕES DE SAÚDE DO RECÉM-NASCIDO NA INTERNAÇÃO

13. **Patologias:** 1 Enterocolite necrosante() 2 Pneumonia() 3 Sepse()
4 Outras infecções() 5 Síndrome do desconforto respiratório()
6 Membrana hialina() 7 Hemorragia intracraniana() 8 Outras()

14. Uso de **suporte ventilatório e oxigenoterapia durante a internação:**

1 Sim(). Ir para questão 15 2 Não()

15. **Se Sim, tipo:** 1 VMI+CPAP+BIPAP(). 2 Capacete/Halo+cateter oxigênio ().

16. **Duração total da internação:** _____ dias

17. Internação na UTIN: 1 Sim(). Duração: _____ dias 2 Não()

18. Internação na UCIN: 1 Sim(). Duração: _____ dias 2 Não()

19. Internação no Alojamento Conjunto: 1 Sim(). Duração: _____ dias 2 Não()

20. Internação na enfermaria Canguru: 1 Sim(). Duração: _____ dias 2 Não()

Dados do Canguru na Internação

21. **Primeiro contato pele a pele:** 1 Não teve oportunidade(). Ir para questão 23
2 Imediatamente após o nascimento() 2 Durante a primeira hora de vida() 3 Durante a
2ª até 24ª hora de vida() 4 Mais que 24 horas após o nascimento() 5 Ignorado()

22. Duração do 1º contato pele a pele: _____ minutos

23. Você foi informada sobre os **benefícios do contato pele a pele/Método mãe canguru?**

0 Não() 1 Sim(). Ir para questão 24 2 Ignorado() Ir para questão 25

24. Se “Sim”, pergunte qual(is) vantagens (não ler as opções abaixo):

- 1 Ajuda o bebê a manter a temperatura corpórea normal e estável()
2 Mantém o bebê fisiologicamente mais estável()
3 Melhora o sono do bebê()
4 Ajuda o bebê se familiarizar com a mãe através do toque, visão, audição e odor()
5 Faz o bebê se sentir mais calmo e seguro()
6 Melhora o desenvolvimento do bebê()
7 Diminui o desconforto do bebê e dor durante os procedimentos dolorosos()
8 Melhora o vínculo mãe-filho e apego()
9 Aumenta o desenvolvimento da identidade materna()
10 Aprimora o estabelecimento da lactação()
11 Melhora os resultados da amamentação e ganho de peso()
12 Outros. Especifique: _____

25. **Oportunidades/Frequência do contato pele a pele durante a internação (com exceção do primeiro contato):**

- 1 Diariamente () 2 Durante as visitas na unidade neonatal()
3 Eventualmente() 4 Nunca(). Ir para questão 27

26. **Duração do contato pele a pele em um dia (24 horas):**

- 1 Menos que 1 hora () 2 Entre 1 e menos que 2 horas() 3 Entre 2 e 4 horas ()
4 Entre 5 e 9 horas () 5 Entre 10 e 19 horas 6. 20 horas ou mais ()

Dados do Aleitamento Materno na Internação**27. Primeira Amamentação (no peito):**

- 1 Não teve oportunidade(). Ir para questão 28
2 Imediatamente após o nascimento / primeira hora de vida (). Ir para questão 28
3 Primeiro dia de vida() 5 Ignorado(). Ir para questão 28
4 Outra(). Especifique: _____ Data: / / **Tempo de vida:** _____ horas.
Se mais de 72 horas, registrar idade em dias: _____
Idade corrigida: _____ s _____ d (semanas/dias) **Peso:** _____ gramas

28. Tipo de alimentação láctea durante internação:

- 1 Aleitamento materno exclusivo ()
2 Aleitamento materno com complementação leite artificial ()
3 Aleitamento artificial ()

29. Tipo de alimentação láctea na alta:

- 1 Aleitamento materno exclusivo ()
2 Aleitamento materno com complementação leite artificial ()
3 Aleitamento artificial ()

III – Dados pós-alta do RN e Mãe**1. CÓDIGO DO FORMULÁRIO:**

2. Nome da mãe: _____

3. **Data:** / /

4. **Tempo de pós alta:** _____ dias

5. Problemas que você enfrentou quando permaneceu na unidade canguru:

6. Contato pele a pele / canguru:

- 1 Contínuo() 2 Maior parte do tempo() 3 Eventual() 4 Não faz()

7. Tipo de alimentação (nas últimas 24 horas):

- 1 Aleitamento materno exclusivo() 2 Aleitamento materno predominante()
3 Aleitamento materno() 4 Aleitamento artificial/não aleitamento materno()

8. Se não estiver em aleitamento materno, quais os **motivos**:

9. Observações

APÊNDICE B**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** **Código:** _____

Meu nome é Sandra Regina de Souza, CPF 168.535.278-28, sou aluna de doutorado da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EERP/USP). Convido você a participar da pesquisa: “Avaliação da efetividade do método canguru em reduzir o estresse crônico de bebês e mães de prematuros internados em unidade neonatal”, que será realizado para comparar o estresse de mães e bebês prematuros que ficaram internados na unidade de neonatologia.

Primeiramente, levantaremos algumas informações no seu prontuário e no prontuário do seu bebê como data de nascimento, sexo, peso, Apgar (nota de nascimento), idade gestacional, diagnóstico médico, bem como alguns dados seu como idade, escolaridade, estado civil. Em seguida solicitaremos que você preencha dois questionários. Se você quiser pode respondê-lo hoje, ou no momento que você desejar durante os próximos três dias. O questionário 1 é o PSS:NICU que tem o objetivo de avaliar o seu estresse com 26 perguntas. A previsão de tempo para o preenchimento é de quinze minutos. O questionário 2 é o PSS que também avalia o estresse, porém através 10 a 14 perguntas. A previsão de tempo para o seu preenchimento é de dez minutos. Os dois questionários serão respondidos no momento que você achar mais adequado, nos próximos três dias, e será novamente respondido na última semana de internação do seu bebê na neonatologia.

Durante a internação do seu filho na unidade neonatal, além de avaliarmos o seu estresse através dos questionários acima citados, também iremos avaliar o seu nível de estresse utilizando uma técnica que analisará o cortisol (hormônio do estresse) coletando um pedaço das unhas das suas mãos. Esses pedaços de unhas dos dez dedos das duas mãos serão cortados da mesma maneira que geralmente cortamos unhas quando usamos o cortador de unha. Você não sentirá qualquer dor. Faremos a demonstração para você compreender melhor como será feita essa coleta. Após cortar as unhas, nós solicitaremos que você fique duas semanas sem cortar as unhas e não use esmaltes, bases ou qualquer produto em suas unhas por duas semanas, porque se você utilizar produtos não teremos o resultado correto do cortisol (hormônio do estresse). Depois de duas semanas que demonstrarmos como será feita a coleta, nós retornaremos e pediremos para você cortar as unhas das duas mãos novamente e guardaremos (coletaremos) os pedaços das suas unhas para análise. Você mesma irá cortá-las.

Quando seu bebê tiver três meses de nascimento, iremos agendar a próxima coleta das suas unhas. Vamos telefonar duas semanas antes e orientaremos você a cortar suas unhas. Solicitaremos que você fique duas semanas sem cortar as unhas e não use esmaltes, bases ou qualquer produto em suas unhas nas próximas duas semanas, depois do nosso telefonema. Após duas semanas será solicitado que você corte as unhas para

VERSO DA PÁGINA
Página2

fazermos análise do cortisol (hormônio do estresse), da mesma maneira que foi feita da primeira coleta. Esse procedimento não irá causar qualquer dor. Se você precisar de ajuda, a auxiliar de pesquisa te ajudará a cortar as unhas. Tentaremos fazer essa coleta no mesmo dia em que você retornará com seu filho no ambulatório do hospital ou faremos essa coleta diretamente na sua casa. Esse procedimento terá duração total máxima de 30 minutos.

Com os resultados deste estudo esperamos contribuir para a elaboração de rotinas de cuidado para diminuir o estresse de bebês prematuros e de mães de bebês internados na unidade de neonatologia.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, eu

portador(a) do R.G. _____, aceito participar da pesquisa: “Avaliação da efetividade do método canguru em reduzir o estresse crônico de bebês e mães de prematuros internados em unidade neonatal”, sob a responsabilidade da pesquisadora Sandra Regina de Souza, aluna do Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Carmen Gracinda Silvan Scochi. Conheço os meus direitos sobre minha participação nessa pesquisa, que são:

- ✓ A participação é livre e posso deixar de participar da pesquisa em qualquer momento, sem ter qualquer prejuízo para meu atendimento e do bebê. Ou seja, eu e o bebê não seremos tratados de forma diferente por aceitarmos participar ou não da pesquisa.
 - ✓ Os dados serão utilizados somente nesta pesquisa e serão guardados de forma segura pelas pesquisadoras.
 - ✓ As unhas serão enviadas para o Canadá para que seja feita a análise do nível de estresse. Esse material (unhas) não conterão nome e será identificada com um código (número) que apenas as pesquisadoras principais terão acesso aos seus dados. Essas unhas serão mantidas no Brasil por tempo estimado de seis meses armazenadas e após a coleta de todas as amostras do estudo, serão encaminhadas para o Canadá.
 - ✓ Após a primeira análise, as unhas serão mantidas em forma de pó em diluente adequado para realização de pesquisas posteriores. Esse tipo de armazenamento é chamado de biorrepositório. Será armazenado por cinco anos e após esse período o material será destruído.
 - ✓ Tenho o direito de pedir para esse material seja destruído a qualquer momento depois da coleta, inclusive após ter sido encaminhado para o Canadá.
-

VERSO DA PÁGINA**Página 3**

- ✓ O material biológico coletado (unhas) será mantido em biorrepositório e poderá ser utilizado para pesquisas posteriores, porém, sempre mantido o anonimato em relação aos nomes, mas se for utilizado as pesquisadoras entrarão em contato comigo para pedir minha autorização.
- ✓ Foi garantido que o material será mantido em total anonimato quanto a minha identidade e do meu filho e sobre qualquer informação que foi fornecida em qualquer momento do estudo.
- ✓ O risco previsto para essa pesquisa será apenas o desconforto de ficar duas semanas sem cortar as unhas e sem usar qualquer produto (ex. esmalte) nas unhas pelo mesmo período.
- ✓ Para esclarecimento de dúvidas, em qualquer fase da aplicação do estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora principal a Enfermeira Sandra Regina de Souza COREN nº SP 69995, na EERP/USP Avenida dos Bandeirantes, 3900 Campus Universitário - Bairro Monte Alegre Ribeirão Preto - SP – Brasil CEP: 14040-902. Caso você tenha alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da EERP/USP. O atendimento recebido por você ou seu filho na unidade de terapia intensiva neonatal deste hospital não será afetado caso você não aceite participar deste estudo.
- ✓ Declaro que recebi informações sobre o estudo e recebi uma cópia desse termo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou prejuízo no tratamento do meu filho que se encontra internado na unidade neonatal deste hospital e após a alta.
- ✓ Na apresentação dos resultados deste trabalho em eventos e revistas científicas, não haverá a identificação dos nomes das mães ou dos bebês ou de qualquer dado que possa identificá-los.
- ✓ Uma pesquisadora ou auxiliar de pesquisa treinada irá ensinar a forma correta de cortar as unhas, garantindo que as participantes não sintam qualquer dor para essa coleta.
- ✓ Os procedimentos que serão realizados em seu bebê fazem parte do tratamento de saúde e já seriam realizados, sendo que não serão incluídos outros tratamentos por causa desta pesquisa.
- ✓ Não terei que gastar dinheiro com a pesquisa e também nada receberei para participar dela.
- ✓ Eu e meu bebê temos direito à indenização conforme as leis vigentes no país, em virtude de dano decorrente de nossa participação nessa pesquisa.
- ✓ Assinarei duas cópias desse documento, uma ficará comigo, para garantir minha segurança e a do bebê durante a participação na pesquisa, e a outra ficará com a pesquisadora.

VERSO DA PÁGINA
Página 4

- ✓ Poderei conversar com as pesquisadoras a qualquer momento da pesquisa e ter acesso aos resultados pelo telefone (16) 3602-3411 (Sandra ou Carmen) ou na
- ✓ Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da USP, Av. Bandeirantes 3900, Campus Universitário.
- ✓ Poderei ter mais informações sobre esse projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da USP pelo telefone (16) 3602-3386 ou no endereço Av. Bandeirantes 3900, Campus Universitário-USP.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20____.

Participantes da pesquisa

Sandra Regina de Souza
Enfa. COREn-SP 69995 CPF 168.535278-28
Pesquisadora

Anuência do responsável (se mãe adolescente):

APÊNDICE C – Passos coleta de dados:

1° PASSO RECRUTAMENT O DAS MÃES	2 ° PASSO COLETA DE DADOS INICIAIS	3 ° PASSO COLETA AMOSTRA DA MÃE	4 ° PASSO DADOS DE ALTA	5 ° PASSO CONTATO TELEFÔNICO E COLETA AMOSTRA UNHAS BEBÊ	6 ° PASSO COLETA DE AMOSTRAS MÃE E BEBÊ	7 ° PASSO ENVIO E ANÁLIS E
<p>Crítérios de Inclusão: Bebê prematuro com idade gestacional menor que 37 semanas admitido na UTIN ou UCIN. Mãe alfabetizada e com capacidade para responder os instrumentos auto-aplicáveis (escalas PSS:NICU e PSS).</p> <p>Crítérios de Exclusão: Bebê que não ficar em incubadora ou berço aquecido; bebê portador de anomalias congênitas. Mães usuárias de drogas e/ou hormônios (ex. puran T4); com contra-indicação ao aleitamento materno; diagnóstico prévio de distúrbios psiquiátricos (ex. esquizofrenia), endócrinos e/ou neurológicos; que tenham hábito cortar as unhas com os dentes (“roer unhas”) ou que tenham doenças de unhas. Mães impossibilitadas de ver seus filhos na primeira semana de vida do PT e óbito materno.</p>	<p>- Explicar a pesquisa para mãe. No caso de mãe menor de idade, explicar para o responsável também.</p> <p>- Se a mãe/ responsável aceitarem participar da pesquisa, solicitar assinatura do Termo de Consentimento da mãe e Assentimento do bebê.</p> <p>- Preencher o instrumento de coleta de dados demográficos</p> <p>- Solicitar que a mãe preencha a escala PSS10 e PSS:NICU.</p> <p>- cortar as unhas da mão direita e esquerda da mãe. Desprezar essas unhas.</p> <p>- Solicitar a mãe que deixe suas unhas crescerem 14 dias (duas semanas) e não utilize esmaltes, bases ou outros produtos.</p> <p>- agendar data para corte para 2 semanas ou 14 dias considerando a data do nascimento.</p>	<p>-Após duas semanas do primeiro corte, realizar o segundo corte das unhas da mãe.</p> <p>Atenção: Se a mãe não agüentar ficar sem cortar as unhas por 2 semanas, ela pode cortar as unhas depois de 1 semana no HOSPITAL. Colocar as unhas no saquinho e guardar. Cortar de novo depois de 2 semanas.</p> <p>Observação: nesse dia será cortado apenas as unhas da mãe.</p>	<p>-No dia da alta ou na semana de alta do bebê, solicitar a mãe que preencha a escala PSS e PSS:NICU.</p> <p>- Preencher o instrumento de coleta de dados demográficos a parte relacionada aos dados de alta.</p> <p>- Entregar para a mãe o cortador de unha ou tesoura para cortar <u>unhas do bebê e dela</u> depois de <u>3 meses de vida</u>.</p> <p>- Entregar o Kit de coleta de unhas do bebê (saco plástico, cortador de unhas e etiqueta).</p> <p>- Agendar data para ligar para a mãe (ligar quando o bebê completar 3 meses de vida.</p>	<p>- Ligar para a mãe <u>Quando o bebê completar 3 meses</u>.</p> <p><u>Unhas da mãe</u> Solicitar que ela remova o esmalte, corte as unhas e que deixe suas unhas crescerem por 14 dias ou 2 semanas (não utilize esmaltes, bases ou outros produtos nas unhas nesse período).</p> <p>Atenção: Se a mãe não agüentar ficar sem cortar as unhas por 2 semanas, ela pode cortar as unhas depois de 1 semana. Colocar as unhas no saquinho e guardar. Cortar de novo depois de 1 de semana (total 14 dias).</p> <p>Unhas do bebê - Solicitar que ela corte as unhas do bebê e coloque as unhas em saco plástico dado no dia da alta. - Cortar de novo depois de 1 semana e guardar as unhas no saquinho. - cortar de novo depois de 2 semanas e guardar no saquinho</p> <p>Lembrar a mãe da data de retorno e lembrá-la de trazer as unhas do bebê no dia do retorno. Caso a mãe não traga as unhas, nós buscaremos na casa dela</p>	<p>- Coleta de dados da mãe e do bebê</p> <p>Unhas da mãe: Recolher o saco plástico com as unhas que a mãe trouxe Ou Ir até a casa cortar as unhas da mãe e colocá-la em saco plástico.</p> <p>Unhas do bebê: Recolher o saco plástico com as unhas que a mãe trouxe</p> <p>Preencher o Instrumento de coleta de dados referente ao pós-alta.</p>	<p>-Envio do material para análise no Canadá</p>

APÊNDICE D – Método de extração e análise das unhas

Protocolo para análise do cortisol e DHEA em unhas

Procedimento realizado com as unhas	Warnock et al. (2010) Canadá	Nosso estudo Unhas das mães	Nosso estudo Unhas dos bebês
AMOSTRA	Total amostra = 33 universitários	Total amostra = 59 mães	Total amostra = 63 bebês pretermo
Lavar	Unhas foram lavadas e agitadas (vortex) duas vezes com 5 ml de isopropanol por um minuto mães foram lavadas duas vezes com 5 ml de isopropanol (para ~ 1 min)	Unhas das mães foram lavadas e agitadas duas vezes com 5 ml de isopropanol por aproximadamente 1 minuto	As unhas dos bebês foram rapidamente lavadas e agitadas (vortex) com 1ml de isopropanol
Secar	Isopropanol foi coletado e deixado as unhas secarem por toda a noite	Isopropanol foi coletado e deixado as unhas secarem por 48hs para depois serem moídas	Não foi necessário deixar unhas secarem pois não foram moídas
Moer	As unhas secas foram moidas utilizando o moinho de esferas (Retsch®, Haan, Düsseldorf, Germany) at 25 Hz por 2.5 minutes.	Amostras das unhas secas foram moidas utilizando moinho de esferas (Retsch®, Haan, Düsseldorf, Germany) at 25 Hz por 3.5 minutos.	As unhas dos bebês não foram moídas (mantidas inteiras).
Pesar	Colocado o pó do total das unhas moidas em tubo (Falcon®; Franklin Lakes, NJ, USA). Os tubos foram pesados antes (calibrados).	Colocado o pó do total das unhas moidas em tubo (Falcon®; Franklin Lakes, NJ, USA). Os tubos foram pesados antes (calibrados) e depois (quantificado as unhas). Utilizado em média 50mg do pó de unhas.	Colocado unhas cortadas em tubo (Falcon®; Franklin Lakes, NJ, USA) Os tubos foram pesados antes (calibrados) e depois (quantificado as unhas). Peso médio das unhas foi 10,02mg.
Incubar	1,5 ml de methanol foi adicionado e os tubos foram agitados (rotated) in uma maquina Labquake tube shaker (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) por toda a noite em temperature ambiente	1,0 ml de metanol foi adicionado e os tubos. <u>Realizado sonificação por 30 minutos.</u> Os tubos foram agitados (rotated) in uma máquina Labquaketube shaker (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) por 24 horas em temperatura ambiente	1,0 ml de metanol foi adicionado e os tubos. <u>Realizado sonificação por 30 minutos.</u> Os tubos foram agitados (rotated) in uma máquina Labquaketube shaker (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) por 24 horas em temperatura ambiente

Centrifugar	Depois de 24 horas as amostras foram centrifugadas em 10,000 rpm por 5 minutos As amostras foram centrifugadas e o volume do supernatante foi colocado em um novo tubo	Depois de 24 horas as amostras centrifugadas em 10,000 rpm por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas e o volume do supernatante foi colocado em um novo tubo	Depois de 24 horas as amostras centrifugadas em 10,000 rpm por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas e o volume do supernatante foi colocado em um novo tubo
Evaporar	800 microlitros do supernatante foi colocado em um novo tubo e evaporado sob Corrente de gás nitrogênio até secar	900 microlitros do supernatante foi colocado em um novo tubo e evaporado sob Corrente de gás nitrogênio até secar	900 microlitros do supernatante foi colocado em um novo tubo e evaporado em centrífuga
Extrair	Outro 1,5 ml de metanol foi adicionado no tubo da amostra e uma nova extração foi feita utilizando o mesmo processo de extração. Depois de completar a segunda extração, 3 ml do supernatante, 3 ml do supernatante da primeira e segunda extração foram evaporados por toda a noite em ambiente escuro em ar ambiente	Outro 1,0 ml de metanol foi adicionado no tubo da amostra e uma nova extração foi feita utilizando o mesmo processo de extração. Após completar a segunda extração, 950 ml do sobrenadante foi retirado. O material das duas extrações foi evaporado Corrente de gás nitrogênio	Outro 1.0 ml de metanol foi adicionado no tubo da amostra e uma nova extração foi feita utilizando o mesmo processo de extração. Após completar a segunda extração, 950 ml do sobrenadante foi retirado. O material das duas extrações foi evaporado em centrífuga
Analisar	As amostras evaporadas foram ressuspensas em diluente de ensaio fornecido pelo fabricante EIA. Cortisol e DHEA foram analisados por ensaio EIA (Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay e Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay) de acordo com as instruções do fabricante.	As amostras evaporadas foram ressuspensas em diluente de ensaio fornecido pelo fabricante EIA. Cortisol e DHEA foram analisados por EIA (Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay e Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay) de acordo com as instruções do fabricante.	As amostras evaporadas foram ressuspensas em diluente. Cortisol e DHEA foram analisados por cromatografia líquida de alto desempenho com espectrometria de massa (CL/MS).

APÊNDICE D – Método de extração e análise das unhas

Ilustrações

Parte 1 – Extração e análise das unhas das mães

Extração e análise do Cortisol/DHEA das unhas materna

REALIZADO “LAVAGEM” DAS UNHAS

- ADICIONADO 5 ML DE METANOL NAS UNHAS MÃES
- AGITADOS OS FRACOS
- RETIRADO METANOL
- DEIXADO SECAR POR 48 HORAS

COMO MOER:

AGITA POR 2 MINUTOS E MEIO

ADICIONADO 1 ML DE METANOL

COLOCADO NA INCUBADORA POR 24 HORAS (AGITANDO LENTAMENTE)

APÓS 24 NA INCUBADORA

COLOCADO FRASCOS PARA CENTRIFUGAR

APÓS CENTRIFUGAR O PÓ FICA NO FUNDO DO FRASCO

**Esse líquido que
tem o
Cortisol/DHEA
que serão
analisados**

**EXTRAÍDO 0,900 UL
DE LÍQUIDO**

**COLOCADO EM NOVO
FRASCO**

EVAPORAR POR 40 MINUTOS

- COLOCADO NA MAQUINA PARA EVAPORAR METANOL RESTANTE E ASSIM OBTER O MATERIAL FINAL

MATERIAL FINAL DA PRIMEIRA EXTRAÇÃO

REPETIDO O PROCESSO PARA SEGUNDA EXTRAÇÃO

CENTRIFUGADO

Retirado 0,950 ug metanol

Colocado no mesmo frasco da 1ª. extração

• EIA

ANÁLISE: Imuno Enzimático /ENZIMAIMUNO ENSAIO (EIA) - kit salimetrics

Ensaio de ligação em que são utilizados as propriedades de reconhecimento molecular dos anticorpos

• EIA

Ensaio de ligação em que são utilizados as propriedades de reconhecimento molecular dos anticorpos

A photograph of a printed data table. The table has multiple columns and rows of numerical data. The columns are labeled with various parameters, and the rows contain numerical values. The table is printed on a white sheet of paper.

Extração e análise do Cortisol/DHEA das unhas dos pré-termos

UNHAS

ADICIONADO 1 ML DE METANOL

AGITADO RAPIDAMENTE (VORTEX)

DEIXADO SECAR POR 48 HORAS

PESADO AS UNHAS (NÃO FOI MOÍDA)

REALIZADO SONIFICAÇÃO POR 30'

COLOCADO EM INCUBADORA POR 24H

CENTRIFUGADO/RETIRADO METANOL

EVAPORADO E OBTIDO MATERILA DA 1ª. EXTRAÇÃO

REPETIDO 2X O PROCESSO (TOTAL 3 EXTRAÇÕES)

MATERIAL DA PRIMEIRA, SEGUNDA E TERCEIRA EXTRAÇÃO

• CROMATOGRAFIA LIQUIDA

ANÁLISE:
CROMATOGRAFIA LIQUIDA – SEPARAÇÃO DAS MOLECULAS, PORÉM, NÃO IDENTIFICA OS ELEMENTOS QUE FORAM SEPARADOS

• ESPECTROMETRIA DE MASSA

ESPECTRÔMETRO DE MASSA -TECNOLOGIA DE IONIZAÇÃO
-SEPARAÇÃO DE ELEMENTOS SEGUNDO MASSA E CARGA
-GRANDE SENSIBILIDADE PARA IDENTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS

MATERIAL PREPARADO NO LABORATÓRIO

RESULTADO NO COMPUTADOR

Anexos

ANEXO A - PERCEIVED STRESS SCALE (PSS10)

ESCALA DE ESTRESSE PERCEBIDO

Itens e instruções para aplicação: As questões nesta escala perguntam sobre seus sentimentos e pensamentos durante o último mês. Em cada caso, será pedido para você indicar o quão frequentemente você tem se sentido de uma determinada maneira. Embora algumas das perguntas sejam similares, há diferenças entre elas e você deve analisar cada uma como uma pergunta separada. A melhor abordagem é responder a cada pergunta razoavelmente rápido. Isto é, não tente contar o número de vezes que você se sentiu de uma maneira particular, mas indique a alternativa que lhe pareça como uma estimativa razoável. Para cada pergunta, escolha as seguintes alternativas:

No último mês com que frequência você se sentiu assim:

Aborrecido com algo inesperado

sempre (4) ____ quase sempre (3) ____ as vezes (2) ____ quase nunca (1) ____ nunca (0) ____

Incapaz de controlar coisas importantes na vida

sempre (4) ____ quase sempre (3) ____ as vezes (2) ____ quase nunca (1) ____ nunca (0) ____

Nervoso ou estressado

sempre (4) ____ quase sempre (3) ____ as vezes (2) ____ quase nunca (1) ____ nunca (0) ____

Confiante em lidar com problemas pessoais

sempre (0) ____ quase sempre (1) ____ as vezes (2) ____ quase nunca (3) ____ nunca (4) ____

Sentiu que as coisas aconteceram como esperado

sempre (0) ____ quase sempre (1) ____ as vezes (2) ____ quase nunca (3) ____ nunca (4) ____

Não conseguiria lidar com todos os afazeres

sempre (4) ____ quase sempre (3) ____ as vezes (2) ____ quase nunca (1) ____ nunca (0) ____

Controlar irritações na sua vida

sempre (0) ____ quase sempre (1) ____ as vezes (2) ____ quase nunca (3) ____ nunca (4) ____

Todos os aspectos da vida sob controle

sempre (0) ____ quase sempre (1) ____ as vezes (2) ____ quase nunca (3) ____ nunca (4) ____

Bravo devido a coisas fora de seu controle

sempre (4) ____ quase sempre (3) ____ as vezes (2) ____ quase nunca (1) ____ nunca (0) ____

Sentiu os problemas se acumularem a ponto de não conseguir resolvê-los

sempre (4) ____ quase sempre (3) ____ as vezes (2) ____ quase nunca (1) ____ nunca (0) ____

REFERÊNCIAS: COHEN et al. measure of Perceived stress. *Journal of Health and Social Behavior*, v.24, n.4, p.385-96, 1983.

LUFT, G.D. Bernardi et al. Versão Brasileira da Escala de Estresse Percebido: tradução e validação para idosos. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v. 41, n. 4, 2007.

ANEXO B - Escala de Estresse Parental: Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais (PSS:NICU)

**Escala para avaliar estresse de pais
na unidade de terapia intensiva neonatal PSS:NICU**

Estresse significa experiências que causam ansiedade, tristeza e tensão. Nós gostaríamos de saber quais são os aspectos que causam estresses nos pais que tem um bebê internado nesta unidade e o quanto a U.T.I. Neonatal é estressante para você.

Instruções de preenchimento

Por favor faça um círculo no número que represente o quanto estressante cada item listado foi para você. Os números representam:

1 = Não foi estressante: a experiência de ter meu bebê na UTI neonatal não me perturbou, não me fez ficar tensa(o) nem ansiosa(o).
2 = Um pouco estressante.
3 = Moderadamente estressante.
4 = Muito estressante.
5 = Extremamente estressante: a experiência de ter meu bebê na UTI neonatal me perturbou e causou muita ansiedade e tensão.

Atenção: Se você não passou por alguma situação abaixo, apenas circule **NA** (não se aplica) que significa que esta situação não aconteceu ou não esta acontecendo com você neste momento.

Exemplo:

Se você acha que a presença de monitores é extremamente estressante para você, circule o número 5:

1.....2.....3.....4.....5.....NA

Se a presença de monitores não causam nenhum estresse em você, circule o número 1.

1.....2.....3.....4.....5.....NA

Se o seu filho não esta com nenhum monitor ou equipamento, circule NA:

1.....2.....3.....4.....5.....NA

Comece agora:

Veja abaixo uma lista de vários sons e imagens comuns a uma UTI neonatal. Gostaríamos de saber quanto eles lhe afetam. Circule o número que melhor representa seu nível de estresse.

SONS E IMAGENS

1. A presença de monitores e equipamentos	1 2 3 4 5 NA
2. O barulho constante de monitores e equipamentos	1 2 3 4 5 NA
3. O barulho repentino do alarme dos monitores	1 2 3 4 5 NA
4. Os outros bebês doentes na sala.	1 2 3 4 5 NA
5. O grande número de pessoas trabalhando na unidade	1 2 3 4 5 NA
6. Ver uma máquina (respirador) respirar pelo meu bebê	1 2 3 4 5 NA

A seguir há uma lista de itens que podem descrever a APARÊNCIA E O COMPORTAMENTO do seu bebê enquanto você visita a UTI e alguns TRATAMENTOS que você observou serem aplicados a ele. Nem todos os bebês passaram por essas experiências ou têm essa aparência. Circule **NA** se você não passou pela experiência ou observou o item em questão. Se o item reflete algo por que você já passou, indique quanto isso lhe afetou circulando o número apropriado.

APARÊNCIA E O COMPORTAMENTO DO BEBÊ

1. Tubos e equipamentos no meu bebê ou perto dele	1	2	3	4	5	NA
2. Áreas machucadas, cortes ou lesões no meu bebê.	1	2	3	4	5	NA
3. A cor anormal do meu bebê (por exemplo: pálido ou amarelado)	1	2	3	4	5	NA
4. Respiração incomum ou anormal do meu bebê	1	2	3	4	5	NA
5. O tamanho pequeno do meu bebê	1	2	3	4	5	NA
6. A aparência enrugada do meu bebê	1	2	3	4	5	NA
7. Ver agulhas e tubos no meu bebê	1	2	3	4	5	NA
8. Meu bebê ser alimentado pela veia ou por um tubo	1	2	3	4	5	NA
9. Quando o meu bebê parecia estar sentindo dor	1	2	3	4	5	NA
10. Quando meu bebê parecia triste	1	2	3	4	5	NA
11. A <u>aparência flácida</u> e frágil do meu bebê	1	2	3	4	5	NA
12. Movimentos agitados e inquietos do meu bebê	1	2	3	4	5	NA
13. Meu bebê não ser capaz de chorar como os outros bebês	1	2	3	4	5	NA

A última área sobre a qual desejamos fazer perguntas diz respeito a como você se sente quanto à sua **RELAÇÃO** com o bebê e seu **PAPEL DE MÃE/PAI**. Se você já passou pelas situações ou experimentou os sentimentos listados abaixo, indique o nível de estresse circulando um número. Se não, circule NA.

ALTERAÇÃO NO PAPEL DE MÃE/PAI

1. <u>Estar separada(o)</u> do meu bebê.	1	2	3	4	5	NA
2. Não alimentar eu <u>mesma(o)</u> o meu bebê	1	2	3	4	5	NA
3. Não poder cuidar eu <u>mesma(o)</u> do meu bebê (por exemplo trocar fraldas, dar banho)	1	2	3	4	5	NA
4. Não poder segurar meu bebê quando quero	1	2	3	4	5	NA
5. Sentir-se <u>desamparada(o)</u> e incapaz de proteger o meu bebê da dor e de procedimentos dolorosos	1	2	3	4	5	NA
6. Sentir-se sem condições de ajudar o meu bebê durante esse tempo	1	2	3	4	5	NA
7. Não ter tempo para estar <u>sozinha(o)</u> com o meu bebê	1	2	3	4	5	NA

REFERÊNCIAS: SOUZA, S.R., DUPAS G. E BALIEIRO M. M. F. G. Adaptação cultural e validação para a língua portuguesa da Parental Stress Scale Neonatal Intensive Care Unit (PSS/NICU). *Acta Paul Educ*, v. 25, n.2, p.171-6, 2012.
MILES, M.S.; FUNK, S.G.; CARLSON, J. Parental Stress Scale: neonatal intensive care unit. *Nurs Res.*, v. 42, n. 1, p. 48-52, 1993.

ANEXO C

TABLE OF CONTENTS	
Intended Use	1
Introduction	1
Test Principle	2
Safety Precautions	2
General Kit Use Advice	3
Storage	3
pH Indicator	3
Specimen Collection	4
Sample Handling and Preparation	4
Materials Supplied with Single Kit	5
Materials Needed But Not Supplied	6
Reagent Preparation	7
Procedure	7
Quality Control	9
Calculations	9
Typical Results	10
Limitations	11
Salivary Cortisol Example Ranges	11
Salivary Cortisol EIA Kit Performance Characteristics	13
References	18
Seller's Limited Warranty	19

SALIMETRICS
101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Intended Use

The Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay Kit is a competitive immunoassay specifically designed and validated for the quantitative measurement of salivary cortisol. It is not intended for diagnostic use. It is intended only for research use in humans and some animals. Salimetrics has not validated this kit for serum or plasma samples.

Please read the complete kit insert before performing this assay. Failure to follow kit procedure and recommendations for saliva collection and sample handling may result in unreliable values.

For further information about this kit, its application, or the procedures in this insert, please contact the technical service team at Salimetrics or your local sales representative.

Introduction

Cortisol (hydrocortisone, Compound F) is the major glucocorticoid produced in the adrenal cortex. (1) Cortisol production has a circadian rhythm, (2,3) with levels peaking in the early morning and dropping to lowest values at night. (4,5) Levels rise independently of circadian rhythm in response to stress. (6)

In blood, only about 5-10% of cortisol is in its unbound or biologically active form. The remaining cortisol is bound to serum proteins. (7) Unbound serum cortisol enters saliva via intracellular mechanisms; in saliva, the majority of cortisol remains unbound to protein. Salivary cortisol levels are unaffected by salivary flow rate and are relatively resistant to degradation from enzymes or freeze-thaw cycles. (8,9) Studies consistently report high correlations between serum and salivary cortisol, indicating that salivary cortisol levels reliably estimate serum cortisol levels. (10-12)

(Internal Salimetrics Data, n=26. Time of cortisol peak will vary in individuals relative to their normal wake-up time.)

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Test Principle

This is a competitive immunoassay kit. Cortisol in standards and samples compete with cortisol conjugated to horseradish peroxidase for the antibody binding sites on a microtitre plate. After incubation, unbound components are washed away. Bound cortisol enzyme conjugate is measured by the reaction of the horseradish peroxidase enzyme to the substrate tetramethylbenzidine (TMB). This reaction produces a blue color. A yellow color is formed after stopping the reaction with an acidic solution. The optical density is read on a standard plate reader at 450 nm. The amount of cortisol enzyme conjugate detected is inversely proportional to the amount of cortisol present, in the sample. (13)

Safety Precautions

Read Safety Data Sheets before handling reagents.

Hazardous Ingredients

Liquid stop solution is caustic; use with care. We recommend the procedures listed below for all kit reagents.

Handling

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

Emergency Exposure Measures

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

The above information is believed to be accurate but is not all-inclusive. This information should be used only as a guide. Salimetrics will not be liable for accidents or damage resulting from misuse of product.

Safety Data Sheets are available by contacting Salimetrics at support@salimetrics.com (See www.salimetrics.com for alternative contact options).

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

General Kit Use Advice

- This kit uses break-apart microtitre strips. You may run less than a full plate. Unused wells must be stored at 2-8°C in the foil pouch with desiccant and used in the frame provided.
- Avoid microbial contamination of opened reagents. Salimetrics recommends using opened reagents within one month. Store all reagents at 2-8°C.
- The quantity of reagent provided with a single kit is sufficient for three partial runs. The volumes of wash buffer and enzyme conjugate prepared for assays using less than a full plate should be scaled down accordingly, keeping the same dilution ratio.
- Do not mix components from different lots of kits.
- To ensure highest quality assay results, pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible (without interruption) across the plate. Ideally, the process should be completed within 20 minutes or less.
- When using a multichannel pipette to add reagents, always follow the same sequence when adding all reagents so that the incubation time is the same for all wells.
- When running multiple plates, or multiple sets of strips, a standard curve must be run with each individual plate and/or set of strips.
- The temperature of the laboratory may affect assays. Salimetrics' kits have been validated at 68-74°F (20-23.3°C). Higher or lower temperatures may affect OD values.
- Routine calibration of pipettes and other equipment is critical for the best possible assay performance.
- When mixing plates during assay procedures, avoid speeds that spill the contents of the wells.

Storage

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

pH Indicator

Cortisol values from samples with a pH $\leq$ 3.5 or $\geq$ 9.0 may be inaccurate. A pH indicator in the assay diluent alerts the user to samples with high or low pH values. Upon addition of the assay diluent, acidic samples will turn yellow and alkaline samples will turn purple. Dark yellow or purple wells indicate that a pH value for that sample should be obtained using pH strips. Samples with a pH $\leq$ 3.5 or $\geq$ 9.0 should be recollected. (14)

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Specimen Collection

Avoid sample collection within 60 minutes after eating a major meal or within 12 hours after consuming alcohol. Acidic or high sugar foods can compromise assay performance by lowering sample pH and influencing bacterial growth. To minimize these factors, rinse mouth thoroughly with water 10 minutes before sample is collected.

Collect whole saliva by unstimulated passive drool. Donors may tilt the head forward, allowing the saliva to pool on the floor of the mouth, and then passing the saliva through the SalivaBio Collection Aid (SCA) into a polypropylene vial. Collection protocols/methods are available online at www.salimetrics.com or upon request.

Samples visibly contaminated with blood should be recollected. Samples may be screened for possible blood contamination (15,16) using our Blood Contamination EIA Kit (Item Nos. 1-1302/1-1302-5). Do not use dipsticks, which result in false positive values due to salivary enzymes.

It is important to record the time and date of specimen collection when samples are obtained due to the diurnal variation in cortisol levels.

Sample Handling and Preparation

After collection it is important to keep samples cold, in order to avoid bacterial growth in the specimen. Refrigerate sample within 30 minutes, and freeze at or below -20°C within 4 hours of collection. (Samples may be stored at -20°C for up to 6 months.) For long term storage, refer to the Salimetrics Collection and Handling Advice Booklet.

Do not add sodium azide to saliva samples as a preservative, as it may cause interference in the immunoassay.

On day of assay, thaw the saliva samples completely, vortex, and centrifuge at 1500 x g (@3000 rpm) for 15 minutes. Freezing saliva samples will precipitate mucins. Centrifuging removes mucins and other particulate matter which may interfere with antibody binding and affect results. Samples should be at room temperature before adding to assay plate. Pipette clear sample into appropriate wells. Re-freeze saliva samples as soon as possible after adding to the assay plate. Re-centrifuge saliva samples each time that they are thawed. Avoid multiple freeze-thaw cycles.

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Materials Supplied with Single Kit

	Item	Quantity/Size
1	Microtitre Plate Coated with monoclonal anti-cortisol antibodies.	1/96 well
2	Cortisol Standard In a saliva-like matrix. Ready to use, traceable to NIST standard: 3.0, 1.0, 0.333, 0.111, 0.037, 0.012 µg/dL (82.77, 27.59, 9.19, 3.06, 1.02, 0.33 nmol/L). Contains: Cortisol, buffer, preservative.	6 vials / 500 µL each
3	Cortisol Controls High, Low, in a saliva-like matrix. Ready to use. Contain: Cortisol, buffer, preservative.	2 vials / 500 µL each
4	Cortisol Enzyme Conjugate Concentrate. Dilute before use with assay diluent. (See step 5 of Procedure.) Contains: Cortisol conjugated to HRP, preservative.	1 vial / 50 µL
5	Assay Diluent Contains: phosphate buffer, pH indicator, preservative.	1 bottle / 60 mL
6	Wash Buffer Concentrate (10X) Dilute before use according to Reagent Preparation. Contains: phosphate buffer, detergent, preservative.	1 bottle / 100 mL
7	TMB Substrate Solution Non-toxic, ready to use.	1 bottle / 25 mL
8	3 M Stop Solution Contains: sulfuric acid.	1 bottle / 12.5 mL
9	Non-Specific Binding (NSB) Wells Do not contain anti-cortisol antibody. Break off and insert as blanks (optional) where needed.	1 strip

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Materials Needed But Not Supplied

- Precision pipette to deliver 15 and 25 µL
- Precision multichannel pipette to deliver 50 µL and 200 µL
- Vortex
- Plate rotator with 0.08-0.17 inch orbit capable of 500 rpm
- Plate reader with 450 nm and 490 to 492 reference filters
- Computer software for data reduction
- Deionized water
- Reagent reservoirs
- One disposable polypropylene tube to hold at least 24 mL
- Pipette tips
- Serological pipette to deliver up to 24 mL
- Centrifuge capable of 1500 x g (@3000 rpm)

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Reagent Preparation

- Bring all reagents to room temperature and mix before use. A minimum of 1.5 hours is recommended for the 24 mL of assay diluent used in Step 5 (conjugate dilution) to come to room temperature.
- Bring microtitre plate to room temperature before use. ***It is important to keep the foil pouch with the plate strips closed until warmed to room temperature, as humidity may have an effect on the coated wells.***
- Prepare 1X wash buffer by diluting Wash Buffer Concentrate (10X) 10-fold with room-temperature deionized water (100 mL of Wash Buffer Concentrate (10X) to 900 mL of deionized H₂O). ***Dilute only enough for current day's use and discard any leftover reagent.*** (If precipitate has formed in the concentrated wash buffer, it may be heated to 40°C for 15 minutes. Cool to room temperature before use in assay.)

Procedure

Step 1: Read and prepare reagents according to the Reagent Preparation section before beginning assay. Determine your plate layout. Here is a suggested layout. (Standards, controls, and saliva samples should be assayed in duplicate.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.000 Std	3.000 Std	Ctrl-H	Ctrl-H								
B	1.000 Std	1.000 Std	Ctrl-L	Ctrl-L								
C	0.333 Std	0.333 Std	SMP-1	SMP-1								
D	0.111 Std	0.111 Std	SMP-2	SMP-2								
E	0.037 Std	0.037 Std	SMP-3	SMP-3								
F	0.012 Std	0.012 Std	SMP-4	SMP-4								
G	Zero	Zero	SMP-5	SMP-5								
H	NSB*	NSB*	SMP-6	SMP-6								

*NSB = Non-specific binding wells. These may serve as blanks. Use is optional.

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

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

Cautions: 1. Extra NSB wells should not be used for determination of standards, controls, or unknowns.

2. Do not insert wells from one plate into a different plate

Step 3: Pipette 24 mL of assay diluent into the disposable tube. (Scale down proportionally if using less than the entire plate.) Set aside for Step 5.

Step 4:

- Pipette 25 µL of standards, controls, and saliva samples into appropriate wells.
- Pipette 25 µL of assay diluent into 2 wells to serve as the zero.
- Pipette 25 µL of assay diluent into each NSB well.

Step 5: Dilute the enzyme conjugate 1:1600 by adding 15 µL of the conjugate to the 24 mL tube of assay diluent. (Scale down proportionally if not using the entire plate.) Conjugate tube may be centrifuged for a few minutes to bring the liquid down to the tube bottom. Immediately mix the diluted conjugate solution and add 200 µL to each well using a multichannel pipette.

Step 6: Mix plate on a plate rotator for 5 minutes at 500 rpm and incubate at room temperature for a total of 1 hour.

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

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

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

Step 10: Add 50 µL of 3M Stop Solution with a multichannel pipette.

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Step 11:

- Mix on a plate rotator for 3 minutes at 500 rpm. If green color remains, continue mixing until green color turns to yellow. Be sure all wells have turned yellow.
Caution: Spillage may occur if mixing speed exceeds 600 rpm.
- Wipe off bottom of plate with a water-moistened, lint-free cloth and wipe dry.
- Read in a plate reader at 450 nm. Read plate within 10 minutes of adding 3M stop solution. (For best results, a secondary filter correction at 490 to 492 nm is recommended.)

Quality Control

The Salimetrics' high and low cortisol controls should be run with each assay. The control ranges established at Salimetrics are to be used as a guide. Each laboratory should establish its own range. Variations between laboratories may be caused by differences in techniques and instrumentation.

Calculations

1. Compute the average optical density (OD) for all duplicate wells.
2. Subtract the average OD for the NSB wells (if used) from the OD of the zero, standards, controls, and saliva samples.
3. Calculate the percent bound (B/Bo) for each standard, control, and saliva sample by dividing the OD of each well (B) by the average OD for the zero (Bo). (The zero is not a point on the standard curve.)
4. Determine the concentrations of the controls and saliva samples by interpolation using data reduction software. We recommend using a 4-parameter non-linear regression curve fit.
5. Samples with cortisol values greater than 3.0 µg/dL (82.77 nmol/L) should be diluted with assay diluent and rerun for accurate results. If a dilution of the sample is used, multiply the assay results by the dilution factor.

A new Standard Curve must be run with each full or partial plate.

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Typical Results

The results shown below are for illustration only and should not be used to calculate results from another assay.

Well	Standard	Average OD	B	B/Bo	Cortisol (µg/dL)
A1,A2	S1	0.094	0.071	0.048	3.000
B1,B2	S2	0.236	0.213	0.145	1.000
C1,C2	S3	0.524	0.501	0.340	0.333
D1,D2	S4	0.897	0.874	0.593	0.111
E1,E2	S5	1.219	1.196	0.812	0.037
F1,F2	S6	1.379	1.356	0.921	0.012
G1,G2	Bo	1.496	1.473	NA	NA
H1,H2	NSB	0.023	NA	NA	NA

Example: HS Cortisol 4-Parameter Curve Fit

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Limitations

- Samples with cortisol values greater than 3.0 µg/dL (82.77 nmol/L) should be diluted with assay diluent and rerun for accurate results. To obtain the final cortisol concentration, multiply the concentration of the diluted sample by the dilution factor.
- A pH value should be obtained on samples that appear yellow or purple after the diluted conjugate solution is added and the plate is mixed (Step 6). Samples with pH values ≤ 3.5 or ≥ 9.0 should be recollected.
- See "Specimen Collection" recommendations to insure proper collection of saliva specimens and to avoid interfering substances.
- Samples collected with sodium azide are unsuitable for this assay.
- Any quantitative results indicating abnormal cortisol levels should be followed by additional testing and evaluation.

Salivary Cortisol Example Ranges*

Group	Number	Overall Range (µg/dL)
Children, neonatal	275	ND - 3.417
Children, age 6 months	165	ND - 2.734

Group	Number	23:00 hrs (µg/dL)
Normal subjects	19	0.007 - 0.115
Cushing's subjects	21	0.130 - 2.972

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Group	Number	AM Range (µg/dL)	PM Range (µg/dL)
Children, ages 2.5-5.5	112	0.034 - 0.645	0.053 - 0.607
Children, ages 8-11	285	0.084 - 0.839	ND - 0.215
Adolescents, ages 12-18	403	0.021 - 0.883	ND - 0.259
Adult males, ages 21-30	26	0.112 - 0.743	ND - 0.308
Adult females, ages 21-30	20	0.272 - 1.348	ND - 0.359
Adult males, ages 31-50	67	0.122 - 1.551	ND - 0.359
Adult females, ages 31-50	31	0.094 - 1.515	ND - 0.181
Adult males, ages 51-70	28	0.112 - 0.812	ND - 0.228
Adult females, ages 51-70	23	0.149 - 0.739	0.022 - 0.254
All adults	192	0.094 - 1.551	ND - 0.359

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

ND = None detected

Expected ranges for neonates to 5.5 years were derived using the Salimetrics Salivary Cortisol Immunoassay Kit. Expected ranges for 8 to 18 years were reported from an unpublished manuscript, Pennsylvania State University's Behavioral Endocrinology Laboratory. Adult ranges were obtained from published literature. (?)

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

HS Salivary Cortisol EIA Kit Performance Characteristics

Precision

The intra-assay precision was determined from the mean of 20 replicates each.

Saliva Sample	N	Mean (µg/dL)	Standard Deviation (µg/dL)	Coefficient of Variation (%)
PS1	20	2.07	0.08	4
PS2	20	1.14	0.05	4
PS3	20	0.42	0.01	3
PS4	20	0.16	0.01	5
PS5	20	0.06	0.00	7

The inter-assay precision was determined from the mean of average duplicates for 20 separate runs.

Saliva Sample	N	Mean (µg/dL)	Standard Deviation (µg/dL)	Coefficient of Variation (%)
PS1	20	1.99	0.05	3
PS2	20	1.16	0.05	4
PS3	20	0.43	0.01	3
PS4	20	0.18	0.01	9
PS5	20	0.06	0.01	11

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Recovery

Five saliva samples containing different levels of an endogenous cortisol were spiked with known quantities of cortisol and assayed.

Saliva Sample	Endogenous (µg/dL)	Added (µg/dL)	Expected (µg/dL)	Observed (µg/dL)	Recovery (%)
1	0.071	2.00	2.07	2.20	106
2	0.071	0.20	0.27	0.28	104
3	0.071	0.04	0.11	0.11	98
4	0.078	2.33	2.41	2.33	97
5	0.078	0.20	0.28	0.31	113
6	0.080	0.04	0.12	0.12	103
7	0.86	0.20	1.06	1.16	109
8	0.89	0.04	0.93	1.02	109

Analytical Sensitivity

The lower limit of sensitivity was determined by interpolating the mean optical density minus 2 SDs of 10 sets of duplicates at the 0 µg/dL level. The minimal concentration of cortisol that can be distinguished from 0 is 0.007 µg/dL.

Correlation with Serum

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

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

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Sample Dilution Recovery

Four saliva samples were diluted with assay diluent and assayed.

Saliva Sample	Dilution Factor	Expected (µg/dL)	Observed (µg/dL)	Recovery (%)
S1	undiluted	N/A	0.73	N/A
	1:2	0.37	0.39	107
	1:4	0.18	0.20	111
	1:8	0.09	0.10	111
	1:16	0.05	0.05	105
S2	undiluted	N/A	0.80	N/A
	1:2	0.40	0.40	101
	1:4	0.20	0.19	97
	1:8	0.10	0.09	94
	1:16	0.05	0.05	110
S3	undiluted	N/A	0.61	N/A
	1:2	0.31	0.30	98
	1:4	0.15	0.15	101
	1:8	0.08	0.08	108
	1:16	0.04	0.04	108
S4	undiluted	N/A	2.89	N/A
	1:2	1.45	1.53	105
	1:4	0.72	0.77	106
	1:8	0.36	0.42	115
	1:16	0.18	0.20	108

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Linearity of Assay

Saliva Sample	Samples		Avg Observed (µg/dL)	Expected (µg/dL)	Recovery (%)
	Low	High			
a (Low)	100%	0%	0.07	0.07	N/A
b	90%	10%	0.36	0.34	108
c	80%	20%	0.63	0.61	104
d	70%	30%	0.93	0.88	106
e	60%	40%	1.13	1.15	98
f	50%	50%	1.45	1.42	102
g	40%	60%	1.64	1.69	97
h	30%	70%	1.88	1.96	96
i	20%	80%	2.27	2.23	102
j	10%	90%	2.49	2.50	99
k (High)	0%	100%	2.77	2.77	N/A

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Antibody Specificity

Compound	Spiked Concentration (ng/mL)	% Cross-reactivity in HS Salivary Cortisol EIA
Prednisolone	100	0.568
Prednisone	1000	ND
Cortisone	1000	0.130
11-Deoxycortisol	500	0.156
21-Deoxycortisol	1000	0.041
17 α -Hydroxyprogesterone	1000	ND
Dexamethasone	1000	19.2
Triamcinolone	1000	0.086
Corticosterone	10,000	0.214
Progesterone	1000	0.015
17 β -Estradiol	10	ND
DHEA	10,000	ND
Testosterone	10,000	0.006
Transferrin	66,000	ND
Aldosterone	10,000	ND

ND = None detected (<0.004)

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

References

1. Carrasco, G.A., & Van de Kar, L.D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol*, 463(1-3), 235-72.
2. Dickmeis, T. (2009). Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol*, 200(1), 3-22.
3. Dorn, L.D., Lucke, J.F., Loucks, T.L., & Berga, S.L. (2007). Salivary cortisol reflects serum cortisol: Analysis of circadian profiles. *Ann Clin Biochem*, 44(pt3), 281-84.
4. Hucklebridge, F., Hussain, T., Evans, P., & Clow, A. (2005). The diurnal patterns of the adrenal steroids cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in relation to awakening. *Psychoneuroendocrinology*, 30(1), 51-57.
5. Knutsson, U., Dahlgren, J., Marcus, C., Rosberg, S., Brönnegård, M., Stiern, P., & Albertsson-Wikland, K. (1997). Circadian cortisol rhythms in healthy boys and girls: Relationship with age, growth, body composition, and pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(2), 536-40.
6. Miller, G.E., Chen, E., & Zhou, E.S. (2007). If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull*, 133(1), 25-45.
7. Aardal, E., & Holm, A. (1995). Cortisol in saliva – Reference ranges in relation to cortisol in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 33(12), 927-32.
8. Vining, R.F., & McGinley, R.A. (1987). The measurement of hormones in saliva: Possibilities and pitfalls. *J Steroid Biochem*, 27(1-3), 81-94.
9. Garde, A.H., & Hansen, A.M. (2005). Long-term stability of salivary cortisol. *Scand J Clin Lab Invest*, 65(5), 433-6.
10. Daniel, M., Moore, D.S., Decker, S., Belton, L., DeVellis, B., Doolen, A., & Campbell, M.K. (2006). Associations among education, cortisol rhythm, and BMI in blue-collar women. *Obesity*, 14(2), 327-35.
11. Eatough, E.M., Shirtcliff, E.A., Hanson, J.L., & Pollak, S.D. (2009). Hormonal reactivity to MRI scanning in adolescents. *Psychoneuroendocrinology*, 34(8), 1242-46.
12. Dorn, L.D., Kolko, D.J., Susman, E.J., Huang, B., Stein, H., Music, E., & Bukstein, O.G. (2009). Salivary gonadal and adrenal hormone differences in boys and girls with and without disruptive behavior disorders: Contextual variants. *Biol Psychol*, 81(1), 31-39.
13. Chard, T. (1990). *An introduction to radioimmunoassay and related techniques* (4th ed.). Amsterdam: Elsevier.
14. Schwartz, E.B., Granger, D.A., Susman, E.J., Gunnar, M.R., & Laird, B. (1998). Assessing salivary cortisol in studies of child development. *Child Dev*, 69(6), 1503-13.
15. Kivlighan, K.T., Granger, D.A., Schwartz, E.B., Nelson, V., & Curran, M. (2004). Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Horm Behav*, 46(1), 39-46.
16. Schwartz, E., & Granger, D.A. (2004). Transferrin enzyme immunoassay for quantitative monitoring of blood contamination in saliva. *Clin Chem*, 50(3), 654-56.

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Seller's Limited Warranty

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

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

Salimetrics, LLC
5962 La Place Court, Suite 275
Carlsbad, CA 92008, USA
(T) 760.448.5397
(F) 760.448.5463
800-790-2258 (USA & Canada only)
www.salimetrics.com
support@salimetrics.com

Salimetrics, LLC
101 Innovation Blvd., Suite 302
State College, PA 16803, USA
(T) 814.234.2617
(F) 814.689.2223
800-790-2258 (USA & Canada only)
www.salimetrics.com
support@salimetrics.com

Salimetrics Europe, Ltd.
Unit 7, Acorn Business Centre
Oaks Drive, Newmarket
Suffolk, CB8 7SY, UK
(T) +44 (0) 1638782619
(F) +44 (0) 1638782618
www.salimetrics.com
europe@salimetrics.com

Updated: October 13, 2014

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

TABLE OF CONTENTS	
Intended Use	1
Introduction	1
Test Principle	2
Safety Precautions	2
General Kit Use Advice	3
Storage	3
pH Indicator	3
Specimen Collection	4
Sample Handling and Preparation	4
Materials Supplied with Single Kit	5
Materials Needed But Not Supplied	6
Reagent Preparation	7
Procedure	8
Quality Control	10
Calculations	10
Typical Results	10
Limitations	11
Salivary DHEA Example Ranges	11
Salivary DHEA EIA Kit Performance Characteristics	12
References	15
Seller's Limited Warranty	16

SALIMETRICS

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Intended Use

The Salimetrics® DHEA Enzyme Immunoassay Kit is a competitive immunoassay specifically designed and validated for the quantitative measurement of salivary dehydroepiandrosterone (DHEA). It is not intended for diagnostic use. It is intended only for research use in humans and some animals. Salimetrics has not validated this kit for serum or plasma samples.

Please read the complete kit insert before performing this assay. Failure to follow kit procedure and recommendations for saliva collection and sample handling may result in unreliable values.

For further information about this kit, its application, or the procedures in this insert, please contact the technical service team at Salimetrics or your local sales representative.

Introduction

DHEA is a major secretory product of the adrenal glands; it is co-released along with cortisol in response to ACTH from the pituitary gland. (1) Circulating levels of DHEA decline rapidly after birth and remain low until about the age of 6-8, when they begin to rise. (2) This prepubertal onset of adrenal production, known as the adrenarche, involves enzymatic changes within the adrenal gland. (3) DHEA levels increase until the third decade of life, then they begin to decline again. Significant reductions occur after the age of 50. (4,5)

A major role of DHEA is to act as a circulating precursor for conversion to androgens and estrogens in tissues throughout the body, (5) and it has also been associated with immune function. (6) In addition, DHEA is produced directly in the nervous system, where it functions as a neuroactive and neuroprotective factor. (5,7,8)

In blood, only 1-10% of DHEA is in its unbound or biologically active form. The remaining DHEA is bound to serum proteins. Unbound DHEA enters the saliva via intracellular mechanisms; the majority of DHEA in saliva is non-protein bound. Salivary DHEA levels are unaffected by salivary flow rate or salivary enzymes. (9) DHEA exhibits a diurnal rhythm similar to cortisol, with highest levels in the morning after awakening, followed by a decline throughout the afternoon and evening. (10)

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Test Principle

This is a competitive immunoassay kit. DHEA in standards and samples compete with DHEA conjugated to horseradish peroxidase for the antibody binding sites on a microtitre plate. After incubation, unbound components are washed away. Bound DHEA enzyme conjugate is measured by the reaction of the horseradish peroxidase enzyme to the substrate tetramethylbenzidine (TMB). This reaction produces a blue color. A yellow color is formed after stopping the reaction with an acidic solution. The optical density is read on a standard plate reader at 450 nm. The amount of DHEA enzyme conjugate detected is inversely proportional to the amount of DHEA present, in the sample. (11)

Safety Precautions

Read Safety Data Sheets before handling reagents.

Hazardous Ingredients

Liquid stop solution is caustic; use with care. We recommend the procedures listed below for all kit reagents.

Handling

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

Emergency Exposure Measures

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

The above information is believed to be accurate but is not all-inclusive. This information should be used only as a guide. Salimetrics will not be liable for accidents or damage resulting from misuse of product.

Safety Data Sheets are available by contacting Salimetrics at support@salimetrics.com (See www.salimetrics.com for alternative contact options).

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

General Kit Use Advice

- This kit uses break-apart microtitre strips. You may run less than a full plate. Unused wells must be stored at 2-8°C in the foil pouch with desiccant and used in the frame provided.
- Avoid microbial contamination of opened reagents. Salimetrics recommends using opened reagents within one month. Store all reagents at 2-8°C.
- The quantity of reagent provided with a single kit is sufficient for three partial runs. The volumes of wash buffer and enzyme conjugate prepared for assays using less than a full plate should be scaled down accordingly, keeping the same dilution ratio.
- Do not mix components from different lots of kits.
- To ensure highest quality assay results, pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible (without interruption) across the plate. Ideally, the process should be completed within 20 minutes or less.
- When using a multichannel pipette to add reagents, always follow the same sequence when adding all reagents so that the incubation time is the same for all wells.
- When running multiple plates, or multiple sets of strips, a standard curve must be run with each individual plate and/or set of strips.
- The temperature of the laboratory may affect assays. Salimetrics' kits have been validated at 68-74°F (20-23.3°C). Higher or lower temperatures may affect OD values.
- Routine calibration of pipettes and other equipment is critical for the best possible assay performance.
- When mixing plates during assay procedures, avoid speeds that spill the contents of the wells.

Storage

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

pH Indicator

DHEA values from samples with a pH $\leq$ 4.0 or $\geq$ 9.0 may be inaccurate. A pH indicator in the assay diluent alerts the user to samples with high or low pH values. Upon addition of the assay diluent, acidic samples will turn yellow and alkaline samples will turn purple. Dark yellow or purple wells indicate that a pH value for that sample should be obtained using pH strips. Samples with a pH $\leq$ 4.0 or $\geq$ 9.0 should be recollected. (12)

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Specimen Collection

Avoid sample collection within 60 minutes after eating a major meal or within 12 hours after consuming alcohol. Acidic or high sugar foods can compromise assay performance by lowering sample pH and influencing bacterial growth. To minimize these factors, rinse mouth thoroughly with water 10 minutes before sample is collected.

Collect whole saliva by unstimulated passive drool. Donors may tilt the head forward, allowing the saliva to pool on the floor of the mouth, and then passing the saliva through the SalivaBio Collection Aid (SCA) into a polypropylene vial. Collection protocols/methods are available online at www.salimetrics.com or upon request.

Samples visibly contaminated with blood should be recollected. Samples may be screened for possible blood contamination (13,14) using our Blood Contamination EIA Kit (Item Nos. 1-1302/1-1302-5). Do not use dipsticks, which result in false positive values due to salivary enzymes.

It is important to record the time and date of specimen collection due to the diurnal variation in DHEA levels.

Sample Handling and Preparation

After collection it is important to keep samples cold, in order to avoid bacterial growth in the specimen. Refrigerate sample within 30 minutes, and freeze at or below -20°C within 4 hours of collection. (Samples may be stored at -20°C for up to 6 months.) For long term storage, refer to the Salimetrics Collection and Handling Advice Booklet.

Do not add sodium azide to saliva samples as a preservative, as it may cause interference in the immunoassay.

On day of assay, thaw the saliva samples completely, vortex, and centrifuge at 1500 x g (@3000 rpm) for 15 minutes. Freezing saliva samples will precipitate mucins. Centrifuging removes mucins and other particulate matter which may interfere with antibody binding and affect results. Samples should be at room temperature before adding to assay plate. Pipette clear sample into appropriate wells. Re-freeze saliva samples as soon as possible after adding to the assay plate. Re-centrifuge saliva samples each time that they are thawed. Avoid multiple freeze-thaw cycles.

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Materials Supplied with Single Kit

	Item	Quantity/Size
1	Microtitre Plate Coated with polyclonal anti-DHEA antibodies.	1/96 well
2	DHEA Standard 1000 pg/mL, in a saliva-like matrix. Serially dilute before use according to Reagent Preparation. Contains: DHEA, buffer, preservative.	1 vial / 1 mL
3	DHEA Controls High, Low, in a saliva-like matrix. Ready to use. Contain: DHEA, buffer, preservative.	2 vials / 500 µL each
4	DHEA Enzyme Conjugate Concentrate. Dilute before use with assay diluent. (See step 5 of Procedure.) Contains: DHEA conjugated to HRP, preservative.	1 vial / 50 µL
5	Assay Diluent Contains: phosphate buffer, pH indicator, preservative.	1 bottle / 60 mL
6	Wash Buffer Concentrate (10X) Dilute before use according to Reagent Preparation. Contains: phosphate buffer, detergent, preservative.	1 bottle / 100 mL
7	TMB Substrate Solution Non-toxic, ready to use.	1 bottle / 25 mL
8	2 M Stop Solution Contains: sulfuric acid.	1 bottle / 12.5 mL
9	Non-Specific Binding (NSB) Wells Do not contain anti-DHEA antibody. Break off and insert as blanks (optional) where needed.	1 strip
10	Adhesive Plate Covers	2

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Materials Needed But Not Supplied

- Precision pipette to deliver 12 µL, 50 µL, 100 µL, and 150 µL
- Precision multichannel pipette to deliver 50 µL, 150 µL, and 200 µL
- Vortex
- Plate rotator with 0.08-0.17 inch orbit capable of 500 rpm
- Plate reader with 450 nm and 490 to 492 reference filters
- Computer software for data reduction
- Deionized water
- Reagent reservoirs
- One disposable polypropylene tube to hold at least 20 mL
- Five small disposable polypropylene tubes for dilution of standard
- Pipette tips
- Serological pipette to deliver up to 18 mL
- Centrifuge capable of 1500 x g (@3000 rpm)

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Reagent Preparation

- Bring all reagents to room temperature and mix before use. A minimum of 1.5 hours is recommended for the 18 mL of assay diluent used in Step 5 (conjugate dilution) to come to room temperature.
- Bring microtitre plate to room temperature before use. **It is important to keep the foil pouch with the plate strips closed until warmed to room temperature, as humidity may have an effect on the coated wells.**
- Prepare 1X wash buffer by diluting Wash Buffer Concentrate (10X) 10-fold with room-temperature deionized water (100 mL of Wash Buffer Concentrate (10X) to 900 mL of deionized H₂O). **Dilute only enough for current day's use and discard any leftover reagent.** (If precipitate has formed in the concentrated wash buffer, it may be heated to 40°C for 15 minutes. Cool to room temperature before use in assay.)
- Prepare serial dilutions of the DHEA Standard as follows:
 - Label five polypropylene microcentrifuge tubes or other small tubes 2 through 6.
 - Pipette 150 µL of assay diluent into tubes 2 through 6.
 - Serially dilute the standard 2.5X by adding 100 µL of the 1000 pg/mL standard (tube 1) to tube 2. Mix well.
 - After changing pipette tips, remove 100 µL from tube 2 to tube 3. Mix well.
 - Continue for tubes 4, 5, and 6.
 - The final concentrations of standards for tubes 1 through 6 are, respectively, 1000 pg/mL, 400 pg/mL, 160 pg/mL, 64 pg/mL, 25.6 pg/mL, and 10.2 pg/mL. Standard concentrations in nmol/L are 3.47, 1.39, 0.55, 0.22, 0.09, and 0.03, respectively.

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Procedure

Step 1: Read and prepare reagents according to the Reagent Preparation section before beginning assay. Determine your plate layout. Here is a suggested layout. (Standards, controls, and saliva samples should be assayed in duplicate.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000 Std	1000 Std	Ctrl-H	Ctrl-H								
B	400 Std	400 Std	Ctrl-L	Ctrl-L								
C	160 Std	160 Std	SMP-1	SMP-1								
D	64 Std	64 Std	SMP-2	SMP-2								
E	25.6 Std	25.6 Std	SMP-3	SMP-3								
F	10.2 Std	10.2 Std	SMP-4	SMP-4								
G	Zero	Zero	SMP-5	SMP-5								
H	NSB*	NSB*	SMP-6	SMP-6								

*NSB = Non-specific binding wells. These may serve as blanks. Use is optional.

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

Cautions: 1. Extra NSB wells should not be used for determination of standards, controls, or unknowns.
2. Do not insert wells from one plate into a different plate.

Step 3: Pipette 18 mL of assay diluent into the disposable tube. (Scale down proportionally if using less than the entire plate.) Set aside for Step 5.

Step 4:

- Pipette 50 µL of standards, controls, and saliva samples into appropriate wells.
- Pipette 50 µL of assay diluent into 2 wells to serve as the zero.
- Pipette 50 µL of assay diluent into each NSB well.

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Step 5: Dilute the enzyme conjugate 1:1500 by adding 12 µL of the conjugate to the 18 mL tube of assay diluent. (Scale down proportionally if not using the entire plate.) Conjugate tube may be centrifuged for a few minutes to bring the liquid down to the tube bottom. Immediately mix the diluted conjugate solution and add 150 µL to each well using a multichannel pipette.

Step 6: Place adhesive cover provided over plate. Mix plate on a plate rotator for 5 minutes at 500 rpm and incubate at room temperature for a total of 3 hours.

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

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

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

Step 10: Add 50 µL of 2M Stop Solution with a multichannel pipette.

Step 11:

- Mix on a plate rotator for 3 minutes at 500 rpm. If green color remains, continue mixing until green color turns to yellow. Be sure all wells have turned yellow.

Caution: Spillage may occur if mixing speed exceeds 600 rpm.

- Wipe off bottom of plate with a water-moistened, lint-free cloth and wipe dry.
- Read in a plate reader at 450 nm. Read plate within 10 minutes of adding 2M stop solution. (For best results, a secondary filter correction at 490 to 492 nm is recommended.)

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Quality Control

The Salimetrics' high and low DHEA controls should be run with each assay. The control ranges established at Salimetrics are to be used as a guide. Each laboratory should establish its own range. Variations between laboratories may be caused by differences in techniques and instrumentation.

Calculations

1. Compute the average optical density (OD) for all duplicate wells.
2. Subtract the average OD for the NSB wells (if used) from the OD of the zero, standards, controls, and saliva samples.
3. Calculate the percent bound (B/Bo) for each standard, control, and saliva sample by dividing the OD of each well (B) by the average OD for the zero (Bo). (The zero is not a point on the standard curve.)
4. Determine the concentrations of the controls and saliva samples by interpolation using data reduction software. We recommend using a 4-parameter non-linear regression curve fit.
5. Samples with DHEA values greater than 1000 pg/mL should be diluted with assay diluent and rerun for accurate results. If a dilution of the sample is used, multiply the assay results by the dilution factor.

A new Standard Curve must be run with each full or partial plate.

Typical Results

The results shown below are for illustration only and should not be used to calculate results from another assay.

Well	Standard	Average OD	B	B/Bo	DHEA (pg/mL)
A1,A2	S1	0.344	0.295	0.234	1000
B1,B2	S2	0.513	0.464	0.368	400
C1,C2	S3	0.741	0.692	0.548	160
D1,D2	S4	0.958	0.909	0.720	64
E1,E2	S5	1.145	1.096	0.868	23.5
F1,F2	S6	1.23	1.181	0.936	10.2
G1,G2	Bo	1.311	1.262	NA	NA
H1,H2	NSB	0.049	NA	NA	NA

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Example: DHEA 4-Parameter Curve Fit

Limitations

- Samples with DHEA values greater than 1000 pg/mL should be diluted with assay diluent and rerun for accurate results. To obtain the final DHEA concentration, multiply the concentration of the diluted sample by the dilution factor.
- A pH value should be obtained on samples that appear yellow or purple after the diluted conjugate solution is added and the plate is mixed (Step 6). Samples with pH values ≤ 4.0 or ≥ 9.0 should be recollected.
- See "Specimen Collection" recommendations to insure proper collection of saliva specimens and to avoid interfering substances.
- Samples collected with sodium azide are unsuitable for this assay.
- Any quantitative results indicating abnormal DHEA levels should be followed by additional testing and evaluation.

Salivary DHEA Example Ranges*

Group	N	Range (pg/mL)	Mean (pg/mL)	Standard Deviation (pg/mL)
Adult Females	19	22.4 - 308.8	165.6	71.6
Adult Males	20	15.9 - 291.1	153.5	68.8

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

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Salivary DHEA EIA Kit Performance Characteristics

Precision

The intra-assay precision was determined from the mean of 12 replicates each.

Saliva Sample	N	Mean (pg/mL)	Standard Deviation (pg/mL)	Coefficient of Variation (%)
H	12	618.61	32.79	5.3
L	12	44.59	2.58	5.8

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

Saliva Sample	N	Mean (pg/mL)	Standard Deviation (pg/mL)	Coefficient of Variation (%)
H	12	579.47	45.91	7.9
L	12	34.83	2.97	8.5

Recovery

Six saliva samples containing different levels of an endogenous DHEA were spiked with known quantities of DHEA and assayed.

Saliva Sample	Endogenous (pg/mL)	Added (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Recovery (%)
1	84.45	50	134.45	136.21	101.3
2	66.84	400	466.84	511.34	109.5
3	317.92	50	367.92	334.18	90.8
4	317.92	500	817.92	919.40	112.4
5	41.84	16	57.84	64.49	111.5
6	185.04	16	201.04	181.30	90.2

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Sensitivity

The lower limit of sensitivity was determined by interpolating the mean optical density minus 2 SDs of 10 sets of duplicates at the 0 pg/mL level. The minimal concentration of DHEA that can be distinguished from 0 is 5 pg/mL.

Correlation with Serum

The correlation between serum and saliva DHEA was determined by assaying 39 matched samples using the Diagnostic Systems Laboratories serum DHEA radioimmunoassay and the Salimetrics Salivary DHEA EIA. The DHEA serum-saliva correlation, using a log 10 transformation for the total (n = 39), combined males and females is 0.857, p-bar < 0.0001.

Method Comparison

The correlation between the Salimetrics EIA and a published serum RIA modified for use with saliva as evaluated by assaying 40 common samples. The EIA-RIA results were highly correlated, r-bar (38) = 0.881, p-bar < 0.001.

Sample Dilution Recovery

Two samples were serially diluted with assay diluent and assayed.

Saliva Sample	Dilution Factor	Expected (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Recovery (%)
1			334.66	
	1:2	167.33	157.33	94.0
	1:4	83.67	91.22	109.0
	1:8	41.83	49.44	118.2
	1:16	20.92	20.08	96.0
2			511.38	
	1:2	255.69	287.69	112.5
	1:4	127.84	140.12	109.6
	1:8	63.92	69.30	108.4
	1:16	31.96	34.25	107.2

*Linearity is established from 500 to 20 pg/mL

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Antibody Specificity

Compound	Spiked Concentration (ng/mL)	% Cross-reactivity in Salivary DHEA EIA
DHEA-S	1000	0.063
Androstenedione	1000	0.0378
17β-Estradiol	1	ND
Estriol	1000	ND
Estrone	1000	ND
Progesterone	1000	ND
17α-Hydroxyprogesterone	1000	ND
Testosterone	1000	ND
Dihydroxytestosterone	1000	ND
Dianabol	1000	ND
11-Hydroxytestosterone	1000	ND
19-Nortestosterone	1000	ND
Cortisol	1000	ND
Aldosterone	1000	ND
Cortisone	1000	ND
11-Deoxycortisol	1000	ND
21-Deoxycortisol	1000	ND
Triamcinolone	1000	ND
Corticosterone	1000	ND
Transferrin	1000	ND

ND = None detected (<0.004)

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

References

1. Reisch, N., Slawik, M., Zwermann, O., Beuschlein, F., & Reincke, M. (2005). Genetic influence of an ACTH receptor promoter polymorphism on adrenal androgen secretion. *Eur J Endocrinol*, 153(5), 711-15.
2. Rainey, W.E. & Nakamura, Y. (2008). Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 108(3-5), 281-86.
3. Sirianni, R., Carr, B.R., Andò, S., & Rainey, W.E. Inhibition of Src tyrosine kinase stimulates adrenal androgen production. *J Mol Endocrinol*, 30(3), 287-99.
4. Ahn, R.S., Lee, Y.J., Choi, J.Y., Kwon, H.B., & Chun, S.I. (2007). Salivary cortisol and DHEA levels in the Korean population: Age-related differences, diurnal rhythm, and correlations with serum levels. *Yonsei Med J*, 48(3), 379-88.
5. Liu, Y., & Papadopoulos, V. (2005). Biosynthesis and regulation of dehydroepiandrosterone (DHEA) in brain. *Trends de la SCB*, 56, 135-45.
6. Buford, T.W. & Willoughby, D.S. (2008). Impact of DHEA(S) and cortisol on immune function in aging: A brief review. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33(3), 429-33.
7. Baulieu, E.E. & Robel, P. (1998). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8), 4089-91.
8. Charalampopoulos, I., Alexaki, V.I., Tsatsanis, C., Minas, V., Dermitzaki, E., Lasaridis, I., Vardoulis, L., et al. (2006). Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1088, 139-52.
9. Vining, R.F. & McGinley, R.A. (1987). The measurement of hormones in saliva: Possibilities and pitfalls. *J Steroid Biochem*, 27(1-3), 81-94.
10. Hucklebridge, F., Hussain, T., Evans, P., & Clow, A. (2005). The diurnal patterns of the adrenal steroids cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in relation to waking. *Psychoneuroendocrinology*, 30(1), 51-7.
11. Chard, T. (1990). *An introduction to radioimmunoassay and related techniques* (4th ed.). Amsterdam: Elsevier.
12. Schwartz, E.B., Granger, D.A., Susman, E.J., Gunnar, M.R., & Laird, B. (1998). Assessing salivary cortisol in studies of child development. *Child Dev*, 69(6), 1503-13.
13. Kivlighan, K.T., Granger, D.A., Schwartz, E.B., Nelson, V., & Curran, M. (2004). Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Horm Behav*, 46(1), 39-46.
14. Schwartz, E., & Granger, D.A. (2004). Transferrin enzyme immunoassay for quantitative monitoring of blood contamination in saliva. *Clin Chem*, 50(3), 654-56.

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Seller's Limited Warranty

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

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

Salimetrics, LLC
5962 La Place Court, Suite 275
Carlsbad, CA 92008, USA
(T) 760.448.5397
(F) 760.448.5463
800-790-2258 (USA & Canada only)
www.salimetrics.com
support@salimetrics.com

Salimetrics, LLC
101 Innovation Blvd., Suite 302
State College, PA 16803, USA
(T) 814.234.2617
(F) 814.689.2223
800-790-2258 (USA & Canada only)
www.salimetrics.com
support@salimetrics.com

Salimetrics Europe, Ltd.
Unit 7, Acorn Business Centre
Oaks Drive, Newmarket
Suffolk, CB8 7SY, UK
(T) +44 (0) 1638782619
(F) +44 (0) 1638782618
www.salimetrics.com
europe@salimetrics.com

Updated: October 30, 2014

101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

ANEXO D – Aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA EERP/USP

Of.CEP-EERP/USP – 011/2015

Ribeirão Preto, 11 de fevereiro de 2015.

Prezada Senhora,

Comunicamos que o projeto de pesquisa, abaixo especificado, foi analisado e considerado **APROVADO AD REFERENDUM** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em 11 de fevereiro de 2015.

Protocolo CAAE: 38019314.9.0000.5393

Projeto: Avaliação da efetividade do método canguru em reduzir o estresse crônico de bebês e mães de prematuros internados em unidade neonatal.

Pesquisadores: Carmen Gracinda Silvan Scochi
Sandra Regina de Souza

Em atendimento à Resolução 466/12, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou a sua interrupção.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Angelita Maria Stabile
Vice-Coordenadora do CEP-EERP/USP

Ilma. Sra.
Prof. Dra. Carmen Gracinda Silvan Scochi
Departamento de Enfermagem Materno-Infantil e Saúde Pública
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP