

LUCAS ALBANAZ VARGAS

**IMPACTO DO ESTRESSE MATERNO GESTACIONAL E PERINATAL NA
RESPOSTA DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL DE SEUS NEONATOS**

Brasília – DF, 2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

LUCAS ALBANAZ VARGAS

**IMPACTO DO ESTRESSE MATERNO GESTACIONAL E PERINATAL NA
RESPOSTA DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL DE SEUS NEONATOS**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Médicas pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas da
Universidade de Brasília**

Orientador: Luiz Claudio Gonçalves de Castro

Co-orientador: José Alfredo Lacerda de Jesus

Brasília – DF, 2019

LUCAS ALBANAZ VARGAS

**IMPACTO DO ESTRESSE MATERNO GESTACIONAL E PERINATAL NA
RESPOSTA DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL DE SEUS NEONATOS**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Médicas pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas da
Universidade de Brasília**

Aprovado em 28/02/2019

Banca examinadora

Professor Dr. Luiz Claudio Gonçalves de Castro (Presidente)

Universidade de Brasília

Professora Dra. Karina Nascimento Costa (membro interno do PPGCM)

Universidade de Brasília

Professor Dr. João da Costa Pimentel Filho (membro externo do PPGCM)

Universidade de Brasília

Professor Dr. Riccardo Pratesi

Membro suplente

Vargas, Lucas Albanaz

Impacto do estresse materno gestacional e perinatal na resposta de eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal de seus neonatos

.Brasília, 2019.

85p.:il., tabs., grafs.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

Orientador: Luiz Cláudio Gonçalves de Castro

Co-orientador: José Alfredo Lacerda de Jesus

1. Cortisol salivar
2. Neonatos
3. Estresse
4. Saúde mental materna
5. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus, por me ajudar a trilhar este caminho, me fortalecer e principalmente colocar pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais este trabalho não seria possível.

Aos meus pais, Francisco e Simone, meu imenso agradecimento. Sempre acreditam em minha capacidade e me incentivam, jamais me deixaram acreditar que existe o impossível. Aos meus irmãos, por vibrar comigo a cada conquista, me acompanhar de perto e aos quais sei que posso contar no que for preciso.

À professora Rosana, por me inspirar a seguir o caminho da pesquisa. Tenho imensa consideração e apreço. Foi a primeira professora com quem trabalhei, me deu a oportunidade de iniciar a caminhada como aluno de extensão. Agradeço por todas as oportunidades que me deu, por toda parceria ao longo destes dez anos. Espero seguir com o trabalho por muito mais tempo. Só posso agradecer, pois impactou minha vida. A considero como família!

Ao professor Alfredo, meu co-orientador, por muitos ensinamentos ao longo de todo curso de medicina e do mestrado. Professor brilhante, sempre dedicado não só as lições acadêmicas, mas também a lições de vida. Agradeço por me ajudar e ensinar a seguir este caminho. Agradeço pela dedicação e tempo despendido neste trabalho.

Ao professor Luiz Cláudio, meu orientador, por me acolher como seu aluno, acreditar no trabalho e me ajudar a desenvolvê-lo. Agradeço por dedicar seu tempo, pelas suas grandes contribuições para minha dissertação e desenvolvimento profissional. Suas adições a este estudo não podem ser quantificadas, passou inúmeras horas me ajudando a completar minha dissertação. Admiro o senhor como grande profissional e pesquisador, é notável sua dedicação ao trabalho. Registro um agradecimento especial pois sabemos o esforço que o senhor faz em meio a tempos difíceis. Foi o melhor orientador que poderia imaginar.

Aos meus amigos, grandes foram os desafios até aqui, anos de luta, escolhas e renúncias. A caminhada não foi fácil, mas tornou-se amena com pessoas que amo ao meu lado.

À professora Dra. Yanna Karla, pela contribuição na concepção, realização e assistência da coleta e análise do cortisol dos neonatos e suas mães.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa para o Estudo de Doenças Degenerativas Imunogenéticas e Crônicas da Universidade de Brasília, coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Pratesi que realizaram a análise do cortisol salivar materno e neonatal.

Aos estudantes de medicina Camile Ramos, Amanda Costa, Vanessa Caroline Martins, Beatriz Mariani Rocha Oliveira, Rafael Cardoso Ramos Bringel, Tatiana S. Rodrigues, Teresa Cristina Cardoso Tristão, Nadyelle Targino, Brena Bardonasci, Bárbara Maranhão, Bruno César Rodrigues do Amaral, por ajudarem na fase de execução e coleta de dados juntos às mães dos neonatos.

Finalmente, gostaria de agradecer à Faculdade de medicina da Universidade de Brasília por abrir as portas para que eu pudesse realizar este sonho. Considero este lugar minha casa. Sempre nos proporciona mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas lições de vida.

Ninguém vence sozinho, obrigado a todos!

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender. “

Marie Curie

RESUMO

Embora a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) tenha sido bem descrita em crianças maiores e indivíduos adultos expostos a eventos estressores, estudos nessa área são escassos no período neonatal. Os objetivos principais deste estudo foram: investigar a influência de fatores de estresse maternos no eixo HPA de mães e seus neonatos; e a relação entre os eventos estressantes vivenciados pelos neonatos e seu volume de saliva. Para esse fim, o cortisol salivar (CS) foi coletado de 33 neonatos nascidos a termo (RNT), 18 neonatos nascidos pré-termos (RNPT) e de suas mães, sendo o método de múltiplos esfregaços testado para os neonatos. A história de estresse materno foi investigada por meio de questionários previamente validados. As concentrações de CS materno predisseram significativamente as concentrações de cortisol em seus neonatos ($R = 0,56$, $R^2 = 0,32$, $p = 0,000$), que também foram impactadas pela intensidade do sofrimento materno pré-natal, sintomas depressivos maternos pós-natais e pelo número de eventos nociceptivos experimentados pelos neonatos. Nenhuma diferença nas concentrações de cortisol foi encontrada entre RNT e RNPT. O volume reduzido de saliva dos neonatos foi associado a maiores níveis de estresse materno, estado depressivo materno e uso de glicocorticoides durante a gestação. Os dados deste estudo sugerem que o estado emocional materno nos períodos gestacional e perinatal, assim como o estado clínico do neonato, interferem na resposta do eixo HHA neonatal e impactam as concentrações de CS dos neonatos e o seu volume de saliva.

Palavras-chave: cortisol salivar; neonatos; estresse; saúde mental materna; eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

ABSTRACT

Although the dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis has been well described in older children and adult individuals exposed to life threatening events, studies in this area are scarce in the neonatal period. The main aims of this study were: to investigate the influence of maternal stressful factors on the HPA axis of mothers and offspring; and the relation between stressful events experienced by infants and their saliva volume. For this purpose, salivary cortisol (SC) was collected from 33 full-term (FT) and 18 premature (PT) neonates and their mothers, being the multiple swabs method also tested for the neonates. Maternal stress history was inventoried through validated questionnaires. Maternal SC levels significantly predicted their neonates' SC levels ($R=0.56$, $R^2=0.32$, $p=0.000$), which were also impacted by prenatal maternal distress, post-natal maternal depressive symptoms and by the number of painful events experienced by the neonate. No difference in SC levels was found between FT and PT neonates. Lower volume of saliva of the offspring was associated with higher maternal stress levels, depressive state and glucocorticoids use during pregnancy. Our data suggests that maternal emotional state during gestational and perinatal stages, as well as the clinical state of the neonate, interfere on the neonates' HPA axis and impact on the neonate' SC levels and their volume of saliva.

Key words: salivary cortisol; infants; stress; maternal mental health; hypothalamic-pituitary-adrenal axis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Glândulas Adrenais

Figura 2 - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e regulação da secreção de cortisol

Figura 3 - Ciclo circadiano da secreção de cortisol

Figura 4 - Modelo de ativação de receptor de glicocorticoide (RG)

Figura 5 - Regulação do cortisol pela enzima 11- β -HSD2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos e clínicos de mães e neonatos

Tabela 2 – Correlação entre “grupo (RNT e RNPT)” e variáveis da pesquisa

Tabela 3 – Correlação entre “cortisol salivar da mãe” e variáveis da pesquisa

Tabela 4 – Correlação entre “cortisol salivar do neonato” e variáveis da pesquisa

Tabela 5 – Correlação entre variáveis relacionadas a peso e demais variáveis

Tabela 6 – Correlação entre “volume salivar materno” e demais variáveis

Tabela 7 – Correlação entre variáveis “volume salivar do neonato” e demais variáveis

Tabela 8 – Correlação entre “idade gestacional” e demais variáveis

Tabela 9 – Correlação entre “número de consultas pré-natais” e demais variáveis

Tabela 10 – Correlação entre “uso de glicocorticoide antenatal” e demais variáveis

Tabela 11 – Correlação entre “sofrimento fetal” e demais variáveis

Tabela 12 – Correlação entre “número de procedimentos nociceptivos” e demais variáveis

Tabela 13 – Correlação entre Apgar 1’ e demais variáveis

Tabela 14 – Correlação entre Apgar 5’ e demais variáveis

Tabela 15 – Comparação das variáveis estudadas entre neonatos a termo e pré-termo

Tabela 16 – Dados descritivos das medidas de estresse, com base nas variáveis emocionais e fisiológicas auto referidas nas mães e nas concentrações fisiológicas de cortisol para os lactentes.

Tabela 17 - Indicadores de estresse analisados pelo nível materno de estresse (estresse vs. sem estresse)

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Regressão linear Cortisol salivar materno e neonatal

Gráfico 2 – Regressão linear Cortisol salivar materno e grupos a termo e pré-termo

Gráfico 3 – Volume salivar neonatal em modelo de predição pelas concentrações de cortisol salivar materno em análise de regressão linear.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

AIG - Adequado para idade gestacional

(AP-1) - Proteína ativadora 1

CBG – Globulina ligadora de cortisol (*cortisol binding globulin*)

CS - Cortisol salivar

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina (*corticotropin releasing hormone*)

DO - Densidade óptica

DP – Desvio padrão

DM2 - Diabetes mellitus tipo 2

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dL - decilitro

EPDS - Escala de Depressão Pós-Parto de Edimburgo (Edinburgh Post-Delivery Scale)

ERP - Potencial de resposta evocado (evoked potential response)

GC - Glicocorticosteroides

GIG - Grande para idade gestacional

HDL - Lipoproteínas de alta densidade

HHA – Hipotálamo-hipófise-adrenal

HMG-CoA redutase - 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

MC – Mineralocorticoides

miRNA - micro ácidos ribonucleicos

RN – Recém-nascido

RNT - Recém-nascidos a termo

RNPT - Recém-nascidos pré-termo

mg – miligrama

NEI – índice de eventos nociceptivos (*nociceptive event index*)

dL - decilitro

mL - mililitro

μL – microlitro

PIG - Pequeno para idade gestacional

RCC - Ritmo circadiano do cortisol

RG - Receptor de glicocorticoide

SM - Síndrome metabólica

SNC – Sistema nervoso central

SNS - Sistema nervoso simpático

TMB - Tetrametilbenzidina

T3 - Triiodotironina

T4 - Tiroxina

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VD - Variável dependente

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

μ - Mi

® - Marca registrada

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1 Estresse e o eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal	16
1.2 Descrição anatômica e funcional do eixo HHA	18
1.3 O eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal em neonatos	22
1.4 Avaliação do eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal em neonatos .	25
2. Justificativa de estudo	27
3. Objetivos	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. Métodos	29
4.1 Desenho do estudo	29
4.2 Medidas de estresse materno e infantil	30
4.3 Coleta do cortisol salivar materno e neonatal	31
4.4 Análise estatística	33
5. Resultados	34
6. Discussão	51
7. Conclusões	57
8. Reconhecimento	58
9. Referências bibliográficas	59
10. Anexos	65
11. Apêndices	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE E O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HHA)

Em um contexto amplo, o estresse pode ser entendido como um fenômeno da natureza no qual um jogo de forças do mundo interno e/ou externo ao indivíduo afetam sua fisiologia, seja na direção de seu bem-estar físico, psíquico e/ou social.(1) Devido ao excesso das situações de desconforto psíquico, físico e social na vida moderna, geralmente conceitua-se o estresse como uma experiência negativa. Entretanto, do ponto de vista biológico, o estresse pode ser uma experiência neutra, negativa ou positiva(2).

Não há consenso entre os pesquisadores sobre a melhor definição de estresse. Nas ciências biomédicas, o estresse é entendido como uma resposta de um organismo a um estímulo adverso.(3) Na psicologia, o estresse é entendido como o processo em que uma pessoa e o ambiente interagem(1).

Em um contexto biológico, o estresse é um fator físico, mental ou emocional que causa tensão e pode ser caracterizado como externo e/ou interno. Causas externas incluem o ambiente físico por onde o indivíduo permeia, o trabalho, as relações interpessoais e as demais situações, desafios, dificuldades e expectativas com as quais o indivíduo se depara diariamente. As causas internas correspondem a um conjunto de fatores orgânicos e psíquicos que determinam a capacidade do corpo em responder e lidar com os fatores externos e são definidas, entre outros aspectos, pelo estado nutricional, condicionamento físico, bem-estar emocional e quantidade de sono(4).

O estresse pode iniciar a resposta de "luta ou fuga", uma reação e interação complexa entre os sistemas neurológico, psicológico e endocrinológico para assegurar a sobrevivência (1). O sistema endócrino tem papel fundamental na regulação de diversas funções do corpo, incluindo a manutenção da homeostase e as reações aos estímulos estressores. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ocupa papel de destaque na fisiologia e fisiopatologia do sistema estressor.

O cortisol é um importante biomarcador de estresse em todas as faixas etárias (5). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal fetal responsável pela liberação de cortisol é funcional desde o início do segundo trimestre(6). O cortisol é secretado de forma pulsátil e é conhecido por exibir um ritmo circadiano em adultos e crianças. Fisiologicamente, as concentrações séricas

de cortisol são mais altas pela manhã (entre 8 e 9 horas) e atingem um nadir à meia-noite(7). Acredita-se que os lactentes estabeleçam o ritmo circadiano do cortisol (RCC) durante o primeiro ano de vida, mas exatamente quando ainda não foi estabelecido. Tal conhecimento é essencial para o uso potencial da dosagem do cortisol salivar como ferramenta diagnóstica e em pesquisa clínica. Vários estudos prévios com recém-nascidos (RN) a termo (RNT) investigaram o desenvolvimento de RCC através do cortisol salivar, mas chegaram a conclusões diferentes sobre quando o RCC é estabelecido, variando de duas semanas a mais de nove meses de idade(8).

O cortisol é um hormônio que está diretamente ligado a diversas atividades regulatórias de importantes sistemas do corpo. Assim é importante que suas concentrações não apresentem elevações constantes, o que pode gerar alterações de vários mecanismos fisiológicos, como por exemplo o sistema imunológico, deixando o organismo mais suscetível a infecções.

Em neonatos pré-termo (RNPT), a imaturidade no desenvolvimento e/ou efeitos de doenças na função adrenal podem resultar em produção insuficiente de cortisol para manter a homeostase quando expostos a um estressor(9), apesar de serem capazes de produzir cortisol suficiente para manter a homeostase sob condições não estressantes. A liberação apropriada de cortisol diante de um estressor é vital para a sobrevivência e a falta de tal resposta aumenta o risco de morbidade e mortalidade(10). Por outro lado, níveis elevados de cortisol podem aumentar o risco de problemas cognitivos e comportamentais, pressão arterial elevada e desenvolvimento de síndrome metabólica (SM) (11, 12).

Vários estudos mostraram que o baixo peso ao nascer está associado ao aumento da prevalência de SM e doença vascular na vida adulta. Embora os mecanismos exatos não sejam conhecidos, a reconfiguração de grandes eixos hormonais que controlam o crescimento e o desenvolvimento podem explicar essa associação(13). Estudos recentes sugerem que anormalidades sutis do eixo HHA podem ser de particular importância na associação entre o crescimento fetal reduzido e o desenvolvimento de SM na vida adulta. A desnutrição fetal resulta em superprodução de glicocorticoides, e os neonatos com baixo peso ao nascer tem concentrações elevadas de cortisol no sangue do cordão umbilical, bem como excreção elevada de metabólitos de glicocorticoides durante a infância (13, 14).

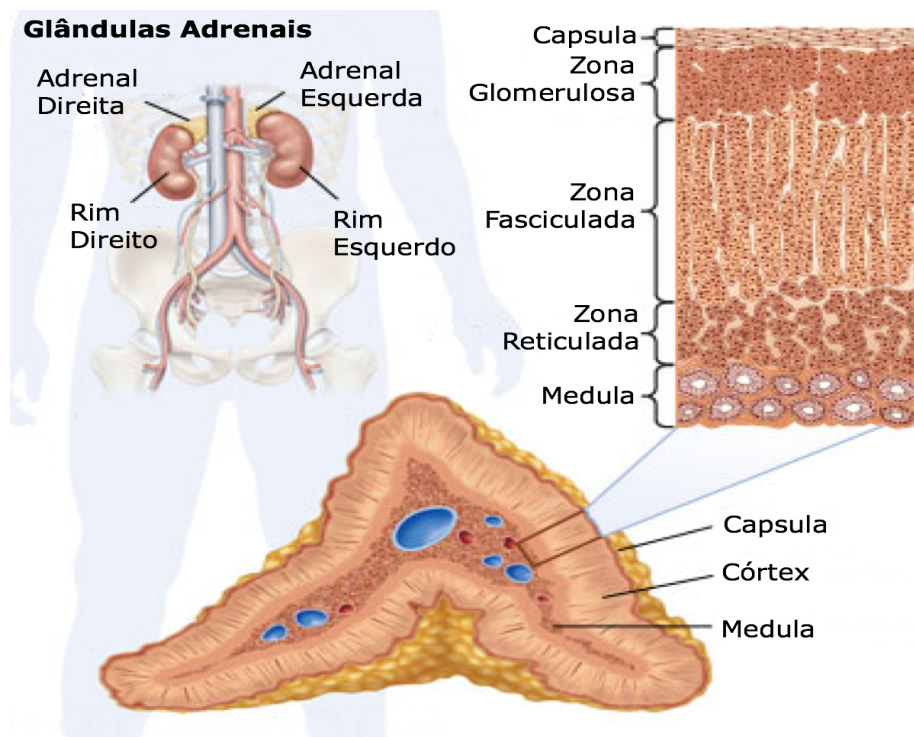
Um estudo realizado em homens de 60 a 70 anos de idade sugeriu que as concentrações plasmáticas de cortisol em jejum estão inversamente relacionadas ao peso ao nascer,

independentemente da idade e do índice de massa corporal (15). Essa relação foi independente dos fatores de risco conhecidos para Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), incluindo o índice de massa corporal na vida adulta.

1.2 DESCRIÇÃO ANATÓMICO-FUNCIONAL DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL

As glândulas adrenais, localizadas na parte superior dos rins, são constituídas pela medula e córtex adrenal, estruturas essas que desempenham funções independentes e/ou integradas e essenciais ao funcionamento regular do organismo(15), como ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Glândulas Adrenais



Fonte: Utiger RD, 2018. (16) Adaptada

A medula adrenal é responsável pela síntese das catecolaminas adrenalina e noradrenalina (17), responsáveis pela homeostase cardiovascular, metabólica e musculoesquelética, entre várias outras atividades. As catecolaminas promovem a facilitação para uma ação muscular mais intensa, aumento do cronotropismo cardíaco, inibição da

motilidade gástrica e intestinal, vasoconstrição, lipólise, gliconeogênese, desinibição dos reflexos da coluna vertebral entre outros.

O córtex adrenal é subdividido em três regiões: a zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticulada. Cada uma dessas partes secreta um tipo específico de hormônio, sendo que os mineralocorticoides (MC) são secretados pela zona glomerulosa, os glicocorticoides (GC) pela zona fasciculada e os esteroides sexuais pela zona reticulada(15, 18).

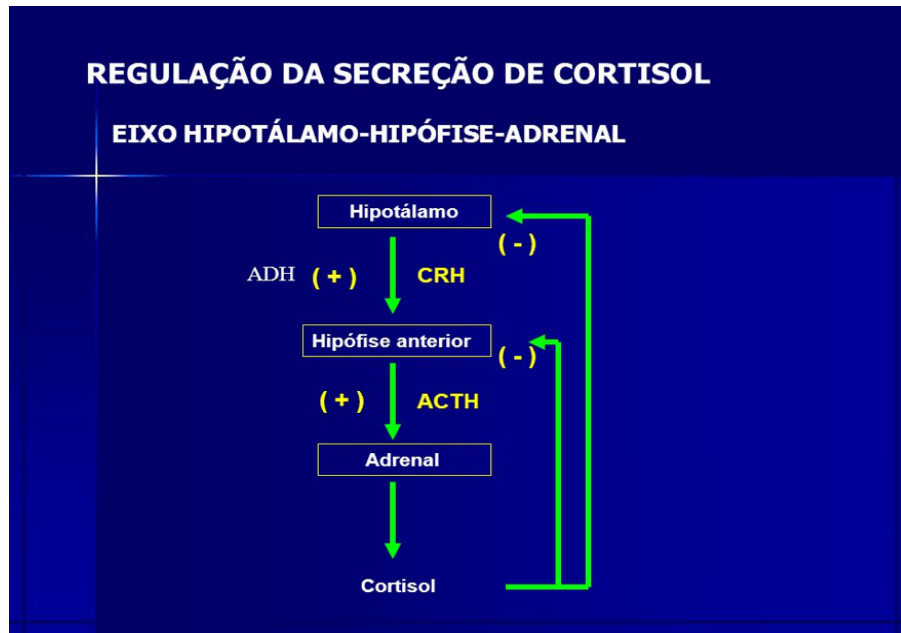
Os glicocorticoides são responsáveis por, entre outros fatores, regular o metabolismo sistêmico, proteico, lipídico e glicídico, a hemodinâmica, as respostas inflamatórias e imunes, algumas atividades do sistema nervoso central (SNC) e por ser um componente essencial do sistema de resposta ao estresse. Neste grupo, o cortisol é o principal hormônio efetor das atividades. (19).

A terapia com glicocorticoides é indicada em diversas condições clínicas, como na reposição hormonal em casos de deficiência suprarrenal congênita ou adquirida, ou como imunomodulador por suas ações anti-inflamatórias, como em doenças renais, alérgicas, dermatológicas, reumáticas, infecciosas, hepáticas, gastrointestinais, dentre outras) (20).

A síntese e secreção dos glicocorticoides é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal através do mecanismo de retroalimentação negativa (*feedback* negativo), sendo que quando o indivíduo apresenta baixas concentrações desses hormônios ocorre estímulo às células neurosecretoras do hipotálamo que secretam o hormônio liberador da corticotropina (CRH). Este, por sua vez, promove a liberação pela adenohipófise do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que, ao chegar ao córtex adrenal, estimula a síntese e secreção dos glicocorticoides, como ilustrado na Figura 2.

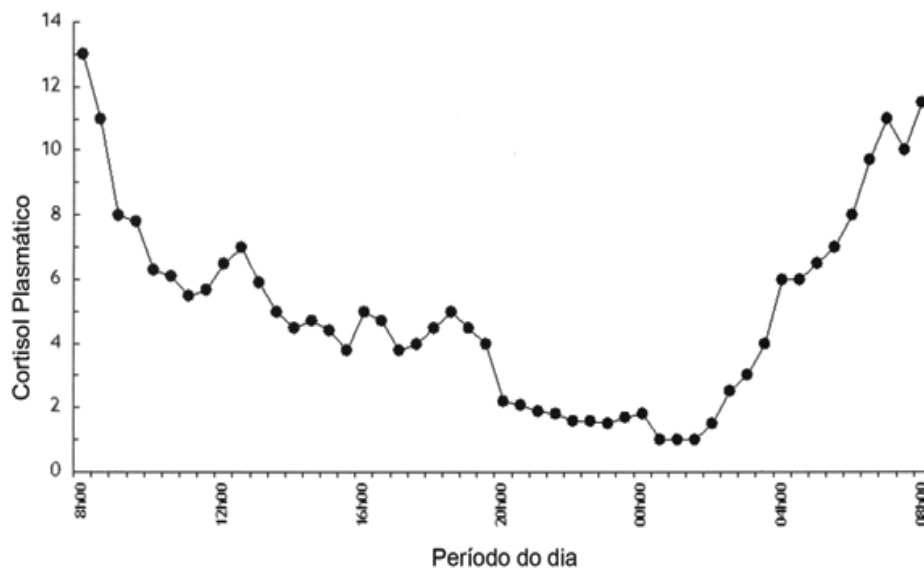
Um aspecto importante é que a secreção dos glicocorticoides segue um ritmo circadiano, com valores mais elevados entre 8 e 9 horas da manhã e nadir próximo à meia-noite (21), conforme ilustrado na figura 3. Esse fato deve ser observado como critério em coleta de amostras de sangue, urina ou saliva que visam indicar as concentrações desse hormônio. (22).

Figura 2: Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e regulação da secreção de cortisol



Fonte: Produzida para a dissertação

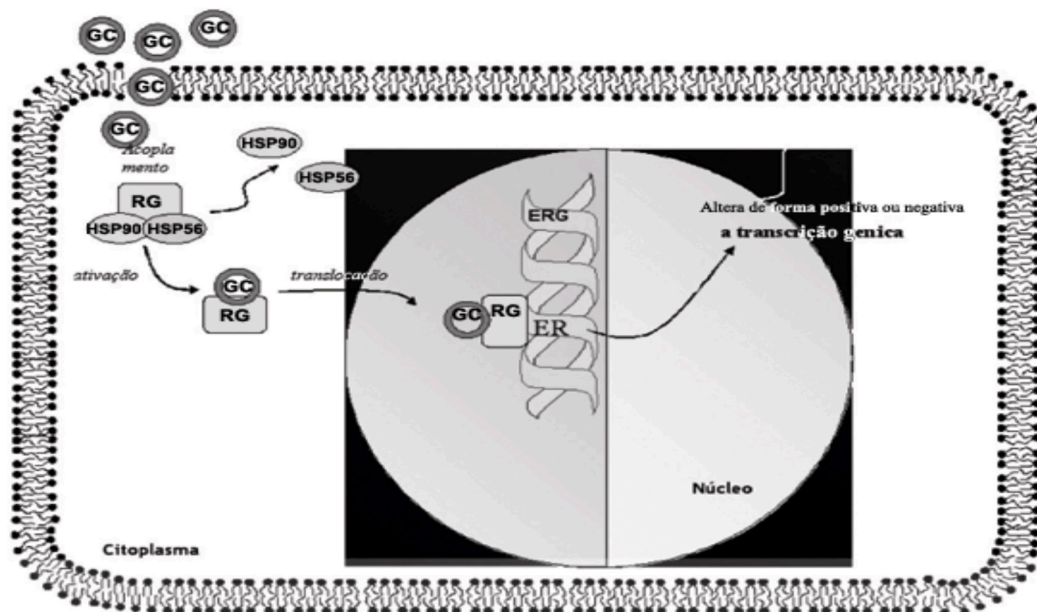
Figura 3: Ciclo circadiano da secreção de cortisol



Fonte: Born J, (2000). (21)

Os glicocorticoides atuam na maioria dos tecidos e órgãos, sendo seu mecanismo de ação através da transcrição gênica. O glicocorticoide livre, por ser lipofílico, atravessa a membrana celular da célula-alvo por difusão passiva e liga-se a receptores no citosol, formando um complexo glicocorticoide-receptor, o qual após sofrer transformação estrutural entrar no núcleo da célula e se liga aos elementos responsivos aos glicocorticoides presentes na fita do ácido desoxirribonucleico (DNA), como mostrado na Figura 4. Desta forma, a ativação gênica induz a síntese de proteínas que atuam em várias etapas do metabolismo sistêmico.

Figura 4: Modelo de ativação de receptor de Glicocorticoide (RG)



Fonte: Juruena MF, (2004). (23)

O cortisol é transportado em sua maior parte ligado a uma proteína plasmática carregadora específica chamada de transcortina, que representa uma globulina fixadora de cortisol, ligado à albumina ou circular em sua forma livre, que corresponde à fração biologicamente ativa(24).

O cortisol e os outros glicocorticoides adrenais não são armazenados na glândula, mas sintetizados e liberados de acordo com a demanda metabólica do organismo. Entretanto, como é necessário que haja concentrações mínimas desses hormônios na circulação sanguínea, a fração ligada às proteínas funciona como uma espécie de reservatório (19).

Por meio de diversos estudos realizados tanto em humanos quanto em animais acredita-se que as concentrações plasmáticas de cortisol permaneçam aproximadamente constantes durante toda a vida adulta, porém em casos de indivíduos que tem rotinas agitadas ou histórico de depressão há a incidência de concentrações elevadas de cortisol plasmático (25).

1.3 O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL EM NEONATOS

O cortisol é um hormônio fundamental para o organismo, devido à sua associação à homeostasia do organismo. Assim, os estados de estresse estão diretamente ligados ao aumento da secreção de cortisol (26). O aumento persistente da secreção de cortisol secundário a doenças hipofisárias (Doença de Cushing), adrenais (tumores adrenais) ou ao estresse mantido produz efeitos sistêmicos que originam comorbidades como hipertensão arterial, resistência insulínica, DM2, depósitos de gordura no tronco, abdome e giba, infertilidade, letargia, estados depressivos entre outros. (12, 27).

Indivíduos das várias faixas etárias pediátricas podem apresentar desregulação do eixo HHA e comprometer seu desenvolvimento (28). O desbalanço do eixo HHA alterado foi extensamente descrito em vários estudos com em crianças mais velhas que cresceram em orfanatos ou em lares em risco e entre aqueles expostos a abuso, negligência, desnutrição ou depressão pós-parto materna(29). Em um estudo recente, nosso grupo observou as consequências a longo prazo de tais eventos no eixo HHA, no impulso emocional e na memória de crianças que nasceram pré-termo(30).

No entanto, o balanço do eixo HHA nos primeiros dias de vida ainda é pouco compreendido. Atualmente, poucos estudos têm focado na compreensão dos distúrbios de estresse entre díades de mães de neonatos internados e as consequências a longo prazo de tais eventos precoces de estresse no cérebro imaturo.

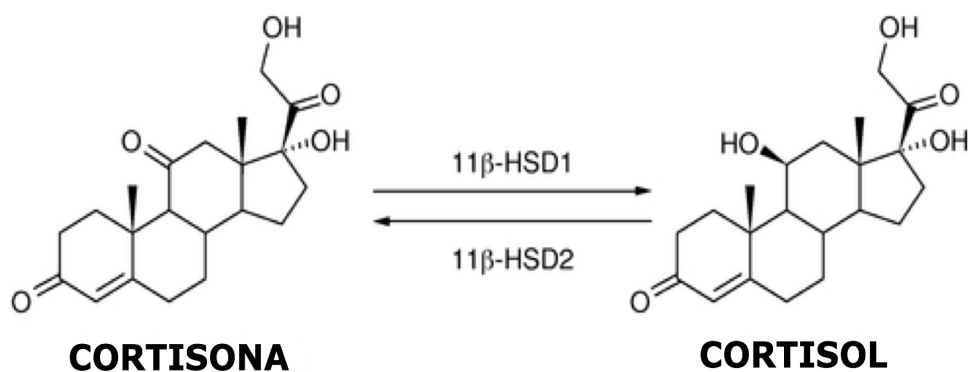
O balanço do eixo HHA do indivíduo parece ser, ao menos em parte, determinado durante o período fetal. Situações no período gestacional que desencadeiem estresse materno (experiências vivenciadas, doenças) podem influenciar diretamente no estabelecimento do tônus do eixo HHA do feto, com repercussões ao longo de toda vida do indivíduo. (31). Além disso, situações como restrição de crescimento intrauterino, baixo peso ao nascer podem estar relacionados à distúrbios do eixo HHA fetal, neonatal e em etapas posteriores da vida,

predispondo a hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, obesidade, entre outros (32) Essa situação é explicada pela reprogramação fetal epigenética, correspondendo aos distúrbios do eixo HHA como consequência a exposição excessiva a glicocorticoides durante o desenvolvimento. (33) Uma consequência proposta da programação fetal é o aumento da atividade de resposta ao estresse do eixo HHA naquele indivíduo. Ao mesmo tempo, o efeito contrário tem sido descrito, com os efeitos benéficos de situações de conforto na estruturação do eixo HHA. Estudos em ratas mães que demonstravam mais cuidado com a prole mostraram aumento na expressão de receptores glicocorticoides no hipocampo dos filhotes, aumentando o feedback negativo e reduzindo a resposta estressora do HHA(34).

Dois mecanismos protegem o feto dos efeitos decorrentes da exposição excessiva a glicocorticoides: a barreira placentária e a resposta materna reduzida a estressores ao final da gestação.

O mecanismo protetor placentário se dá através da expressão da enzima 11- β -hidroxysteroid desidrogenase tipo 2 (11- β -HSD2) na placenta, a qual inativa o cortisol em cortisona (Figura 5).

Figura 5: Regulação do cortisol pela enzima 11- β -HSD2



Fonte: Sandman CA, 2015. Adaptada (35)

Concentrações mais elevadas de 11 β -HSD2 na placenta criam uma barreira à transferência excessiva de glicocorticoides, protegendo assim o feto, enquanto uma deficiência relativa de 11- β -HSD2 permite uma maior passagem de glicocorticoides maternos para o feto(36). A metilação do DNA da 11- β -HSD2 placentária, e consequente menor inativação do

cortisol pela placenta, tem sido associada a desfechos gestacionais desfavoráveis, como menor peso ao nascer, menor qualidade de movimento e menor tônus muscular. (37)

Em humanos as concentrações de cortisol no sangue e no líquido amniótico na metade da gestação são correlacionados com as concentrações maternas, sugerindo uma transferência materno-fetal (38). O eixo HHA fica menos responsivo a estressores tanto físicos como psicológicos ao final da gestação, tanto em ratos como em humanos. Essa hiporresponsividade persiste do parto até o desmame. Alguns mecanismos são utilizados para explicar esse fenômeno. A redução da ativação dos neurônios produtores do hormônio corticotropina e arginina vasopressina no núcleo paraventricular e o envolvimento de um metabólito da progesterona, a alopregmolona. Em ratos, o bloqueio da alopregmolona restaura a resposta do HHA(39), mas faltam estudos conclusivos em seres humanos.

Um aspecto essencial para um melhor conhecimento da fisiologia e da fisiopatologia do eixo HHA neonatal é o entendimento dos mecanismos responsáveis pela sincronia do eixo HHA nas díades mãe-neonato (40), uma vez que essa sincronia, ou a falta dela, pode ter impacto no estabelecimento do tônus adrenal (e conseqüentemente no padrão de intensidade de resposta do eixo HHA às situações de estresse) nas várias etapas do crescimento e desenvolvimento, dos primeiros dias de vida até as décadas que se seguem. Um tônus adrenal aumentado constantemente ao longo da fase de lactente, pré-escolar, escolar e adolescência está relacionado a comorbidades cardiometabólicas ao longo da vida adulta, como predisposição à níveis pressóricos mais elevados, resistência insulínica e diabetes mellitus tipo 2.

Modelos teóricos, como o modelo de sincronia biocomportamental, propõem que através de interações mãe-criança, os processos autonômicos, neurológicos, hormonais e comportamentais das mães e de suas crianças se coordenam nos primeiros anos para promover o crescimento emocional ótimo das crianças(41), originando habilidades comportamentais e fisiológicas autorregulatórias. Também durante a infância, evidências robustas sugerem que as concentrações individuais de cortisol nas mães e suas crianças se relacionam significativamente com os comportamentos parentais e infantis relevantes para a previsão de futuros sintomas internalizantes (42). As implicações das concentrações individuais de cortisol nos desfechos ressaltam a importância de entender como o cortisol compartilhado funciona para moderar o risco de a criança internalizar os resultados longitudinalmente.

Pesquisas têm focado no estudo da reatividade do eixo HHA de crianças e seus cuidadores em resposta a estressores. Em reação a um desafio, as díades demonstram maior sincronia quando mães e filhos estão fisicamente juntos(43) e quando as mães são mais sensíveis e responsivas a seus neonatos (40).

Embora esses achados forneçam informações sobre fatores que podem estar associados à sincronia do cortisol em díades mãe-filho, existe uma escassez de pesquisas sugerindo como a sincronia do cortisol da mãe e da criança pode influenciar o desenvolvimento da primeira infância. A teoria recente sobre as influências biopsicossociais no desenvolvimento sugere que os fatores de risco individuais e familiares para o desajustamento devem ser considerados no contexto do funcionamento biológico das crianças (40). O funcionamento fisiológico da criança, no entanto, também é moldado pelo funcionamento biológico de seu cuidador durante o desenvolvimento inicial (44). Como tal, a sincronia do cortisol em díades mãe-neonato pode ser um importante moderador da associação entre fatores de risco e desfechos mal-adaptativos no desenvolvimento inicial.

1.4 AVALIAÇÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL NO NEONATO

Para avaliação do tônus do eixo HHA na mãe e no neonato é necessário dosar a concentração de cortisol no organismo. A abordagem clássica é a dosagem do cortisol sérico. Entretanto, nos últimos anos, a dosagem do cortisol salivar tem ganho espaço e representatividade nessa avaliação, por apresentar acuidade, sensibilidade e especificidade quando comparado ao cortisol sérico, além de ser um procedimento não invasivo como a coleta de sangue periférico. (29, 45)

Medir o cortisol na saliva tem várias vantagens sobre as medições de plasma, particularmente porque a coleta de saliva não causa estresse ou dor para o neonato(29). Além disso, tem sido argumentado que o cortisol salivar é mais representativo da fração biologicamente ativa do cortisol, em comparação com as concentrações plasmáticas de cortisol (46). Os intervalos de referência para as concentrações salivares de cortisol em crianças durante o primeiro ano de vida ainda não foram consensualmente estabelecidos.

Um dos fatores limitantes da coleta de saliva em recém-nascidos é o fato dos neonatos produzirem pequenas quantidades de saliva, possivelmente devido às glândulas salivares imaturas. O fenômeno da boca seca também foi relatado durante o estresse mental agudo, mas

foi investigado com sucesso limitado e ainda carece de mais estudos(47). Secura oral e hipercortisolismo como marcadores de estresse são relatados em pacientes idosos, indicando um papel potencial da hipofunção da glândula salivar (48, 49).

Na escolha de um método de coleta que permita volume suficiente de saliva, o mais comumente utilizado é através de swabs. Sucção da boca com seringa, tubo de alimentação de plástico ou cateter de sucção acoplado a uma seringa(50) são procedimentos invasivos e apresentam risco de danificar as mucosas delicadas, resultando em contaminação com sangue(51); lancetas oculares (52) podem não ser toleradas por recém-nascidos pré-termo (RNPT) (51); e usando dispositivos como rolo de algodão dental colocado na boca (43) tem sido criticado por coletar a quantidade necessária apenas em 54% dos casos (53). Um estudo obteve saliva de 65 RNPT colocando um cotonete de cada vez na boca do lactente por um a dois minutos, aumentando a quantidade de saliva coletada para pelo menos 100 μ L em 85% da amostra testada(51). Em terceiro lugar, a diversidade atual de parâmetros para a medição do cortisol impedindo a comparação entre os estudos (μ L, nmol/L ou mg/dL).

Por exemplo, Stenius et al. (54) encontraram níveis de cortisol salivar (CS) de 11,7 nmol/L pela manhã, 5,1 nmol/L à tarde e 2,9 nmol/L à noite em 203 lactentes com 6 meses de idade. Mörelius et al. (55) encontraram em uma coorte de 289 lactentes, com 36 semanas de idade pós-menstrual no momento da coleta de saliva, uma média de reatividade ao cortisol de 0,02 nmol/L. Tu et al. (43) encontraram, em 103 RNPT com mais de 32 semanas de idade gestacional, 0,20 μ g/dL comparado a 0,30 μ g/dL de 22 RNT (recém-nascidos a termo), para baixa condição de estresse parental; e 0,20 μ g/dL para RNT e RNPT para condições de estresse parental elevado. Para as mulheres, o SC variou de cerca de 2 a 5 nmol/L, dependendo da ingestão de contraceptivos orais, fase folicular (56), enfatizando ambientes que indicam extrema vulnerabilidade ao estresse em mulheres não trabalhadoras (57) e gravidez variando de 0,22 a 0,40 μ g/dL entre 18-20 a 36-38 semanas (58). Mães fumantes apresentaram níveis mais elevados de cortisol (0,21 μ g/dL) do que não fumantes (0,12 μ g/dL). Outros fatores como exposição a glicocorticoides, ganho de peso e obesidade também contribuíram para níveis mais elevados de cortisol (59).

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Embora os mecanismos e efeitos da desregulação do eixo HHA seja bem descrita em indivíduos adultos expostos a eventos estressores, são escassos estudos nessa área no período neonatal. Dados recentes mostram a influência da estruturação do eixo HHA fetal no tônus desse eixo e na programação metabólica sistêmica do indivíduo ao longo da vida(31-33). Desta forma, este estudo foi desenhado com objetivo de contribuir com mais dados científicos sobre o impacto do padrão materno de estresse no período gestacional e perinatal na resposta do eixo HHA neonatal. Os dados provenientes deste estudo podem ser ferramentas importantes para embasar outros estudos sobre as consequências clínicas e metabólicas da estruturação desse eixo no período fetal em etapas posteriores da vida.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto do estresse materno gestacional e perinatal na resposta do eixo HHA de seus neonatos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Analisar a correlação entre as concentrações de cortisol salivar (CS) basal de díades mãe-neonato e eventos estressores por eles vivenciados: intubação, punção venosa, punção lombar, aspiração traqueal, glicemia capilar, sondagem vesical, punção de calcâneo, cateterismo umbilical entre outros.

- Avaliar a correlação entre o número de eventos estressores vivenciados pelo neonato e seu volume salivar.

- Avaliar diferenças clínicas entre grupos RNT e RNPT e parâmetros neonatais (peso ao nascer, comprimento, perímetro cefálico, Apgar, sofrimento fetal, uso de corticoide antenatal, concentração de CS) e sua correlação com o volume salivar neonatal, volume salivar materno, dosagem de cortisol salivar materno e dosagem de cortisol salivar materno.

- Avaliar correlação entre número de consultas pré-natais e os referidos parâmetros neonatais.

4 MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde de Brasília (015/2010, Anexo I) e realizado de acordo com o Código de Ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsinki).

Para a realização do mesmo as mães foram convidadas a participar e àquelas que aceitaram foi solicitado que assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice I).

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este foi um estudo exploratório transversal com 58 díades mãe-neonato, desenhado com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

-Critérios de inclusão: recém-nascidos (RN) de ambos os sexos, com idade gestacional igual ou maior que 30 semanas, clinicamente estáveis, internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Os RNs a termo (RNT) deveriam estar próximos a sua 48^a hora de vida e os RN pré-termo (RNPT) entre sete e quinze dias de vida. Também foi critério de inclusão o RN ter uma adequada produção de saliva, uma vez que a coleta do cortisol salivar seria parte essencial do estudo.

-Critérios de exclusão: foram excluídos os RN cujas mães receberam tratamento prolongado com glicocorticosteroides (GC) durante a gravidez, exceto neonatos cujas mães receberam GC antenatal para a maturação pulmonar com dose máxima de 24 mg de betametasona, pois essa situação não se associa à supressão adrenal fetal (60). Outros critérios de exclusão foram hemorragia intracraniana de 3º ou 4º graus de acordo com a classificação de Papile *et al.* (1978); malformações cromossômicas ou congênitas ou anormalidades cardíacas; bem como distúrbios pulmonares, gastrointestinais e neurológicos, situações que potencialmente estão associadas a distúrbios do eixo HHA fetal (funcional) e materno (emocional).

A amostra foi recrutada por conveniência na UTIN HUB e dividida em dois grupos de acordo com a idade gestacional: RNT e RNPT. O cálculo amostral utilizado retornou que seriam necessárias pelo menos 26 díades mãe-neonato para adequado poder estatístico.

4.2. MEDIDAS DE ESTRESSE MATERNO E INFANTIL

Inicialmente foi solicitado às mães que preenchessem os protocolos para investigação de dados sociodemográficos (Apêndice 2), de históricos de eventos estressores no período gestacional e perinatal, escala de Depressão Pós-Parto de Edimburgo - EPDS (Anexo 3) e escala de Holmes & Rahe (Anexo 4).

Para a caracterização da condição socioeconômica considerou-se os indicadores de escolaridade materna, estado civil e perfil de renda familiar.

Para rastrear o estresse materno pré-natal, a cada mãe participante foi aplicada a escala Holmes & Rahe (1967), que é um instrumento validado e confiável, amplamente utilizado no estudo de estresse desde a década de 1960 (30, 61). Em relação ao seu impacto na vida cotidiana, atribui-se um valor específico a cada componente estressor e o escore final é classificado em três categorias: sem estresse (≤ 150 pontos); estresse em nível moderado (151 a 299 pontos); estresse em nível alto (≥ 300 pontos).

Para a avaliação da depressão pós-parto materna foi aplicada a Escala de Depressão Pós-Parto de Edimburgo (EPDS), analisando-se separadamente os fatores de ansiedade e depressão, além do escore total de depressão materna (62, 63).

Os dados clínicos dos neonatos foram obtidos de seus prontuários médicos: idade gestacional ao nascimento; uso de GC antenatal para maturação pulmonar; tipo de parto; sexo; Apgar no 1º e 5º minutos de vida; necessidade de procedimentos de reanimação na sala de parto; peso, comprimento e perímetro cefálico ao nascimento e sua correspondente classificação antropométrica em pequeno, adequado ou grande para a idade gestacional, conforme gráfico de Pedreira et al. (64). As variáveis categóricas foram classificadas como duplas na caracterização do sexo (masculino, feminino) e tipo de parto (vaginal, cesariana). As demais foram dicotomicamente codificadas como “sim” ou “não” como uso de analgesia durante o trabalho de parto, corticoides durante a gravidez, sofrimento fetal e procedimentos de ressuscitação. A história de tabagismo materno também foi uma variável codificada dicotomicamente, pois foi observado que as mães evitavam quantificar o tabagismo. O número de eventos invasivos e

dolorosos (por exemplo, aspiração das vias aéreas, intubação, sonda nasogástrica, cirurgia, cateter central, cateterismo umbilical, punção arterial e punção venosa) durante o período de internação neonatal foi utilizado para medir o estresse pós-natal do lactente e a soma de todos os eventos nociceptivos foi denominada de Índice de Evento Nociceptivo (*nociceptive event index* - NEI). A escolaridade materna e a renda familiar foram registradas em camadas de acordo com o sistema brasileiro e o nível de estresse materno seguiu a classificação do inventário de estresse de acordo com a escala de Holmes & Rahe.

4.3. COLETA DO CORTISOL SALIVAR MATERNO E NEONATAL

Examinadores treinados coletaram amostras de saliva de neonatos usando cotonetes universais (Absorb®, Brasil) e as mães receberam informações e treinamento específico para auto coleta. Tanto a mãe quanto os neonatos tiveram sua saliva coletada no mesmo momento. O cotonete foi mantido na cavidade oral, com o recém-nascido deitado de lado, de preferência entre a linha da mandíbula e a parte lateral interna da bochecha. A objetivo da posição do neonato foi facilitar a queda da saliva por gravidade. A saliva foi coletada próximo às 14 horas para todos os participantes, pelo menos uma hora após a ingestão alimentar e a higienização da boca (escovação dos dentes para as mães e lavagem com água para os recém-nascidos), para evitar contaminação por leite ou restos de alimento. Neonatos com baixo fluxo de saliva tiveram sua saliva coletada por um segundo ou terceiro *swab* em intervalos máximos de 20 minutos ou em intervalos menores se a quantidade adequada de saliva fosse observada. Para preservar o conforto do neonato o *swab* foi mantido no interior da boca por um *tempo* mínimo de 5 e máximo de 20 minutos. Quando utilizados, os vários cotonetes de um mesmo indivíduo foram armazenados juntos. As amostras foram acondicionadas em caixas de poliestireno com gelo seco para transporte, armazenamento e posterior dosagem no Laboratório Interdisciplinar de Biociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos a uma temperatura de 8°C e então armazenadas a -20 °C por aproximadamente 6 meses até o processamento da amostra. Para a estimativa do Kit de Cortisol Salivar (Salimetrics®, State College, EUA - código 1-3002), utilizou-se um imunoensaio enzimático competitivo específico e validado para a mensuração quantitativa de CS com alta sensibilidade. Neste ensaio competitivo, foi utilizada uma placa de microtitulação de 96 espaços revestida com anticorpos monoclonais para cortisol e cortisol marcados com peroxidase ligada a este anticorpo. Quando a amostra de saliva estava pronta, os controles ou padrões de referência foram adicionados à

placa do kit. Eles competem com o cortisol ligado à peroxidase, deslocando o anticorpo e afetando sua ligação a este anticorpo. Após a incubação, os componentes não ligados foram removidos por lavagem e a cortisol peroxidase ligada foi medida por reação à enzima peroxidase em substrato de tetrametilbenzidina (TMB). Esta reação produz uma cor azul, que na presença da solução de parada (ácido sulfúrico 0,1N), muda de cor para amarelo. Essa cor é lida em um leitor de placas padrão a 450 nm (filtro de correção 630nm). A densidade óptica (DO) obtida foi usada para medir a quantidade de cortisol detectado ligado à peroxidase. A intensidade da cor é inversamente proporcional à quantidade de cortisol presente na amostra. Para determinar as concentrações de amostras e controles por interpolação, utilizou-se uma curva de regressão não linear e os padrões de valores de DO da referência do kit. A curva foi calculada usando o software GraphPad PRISM® versão 5.0 (La Jolla, EUA).

Para realizar a dosagem de cortisol, as amostras foram inicialmente descongeladas e todos os reagentes foram mantidos à temperatura ambiente. Preparou-se a solução tampão de lavagem do kit (100 mL de tampão de lavagem para 900 mL de água destilada). Em seguida, 25 mL: cada um dos padrões contendo 3,0, 1,0, 0,333, 0,111, 0,037 e 0,012 mg/dL de cortisol, os dois controles positivos baixo e alto, e cada amostra de saliva foram distribuídos nos espaços da placa de microtitulação. Na etapa seguinte, 25 µL de diluente da amostra foram adicionados a cada espaço e, em seguida, 200 µL do conjugado de cortisol marcado contendo peróxidos e peroxidase (1:1.600) foram adicionados. A incubação foi realizada 55 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, a placa foi lavada 4 vezes com 300 µL de tampão de lavagem por poço em cada momento. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de TMB a cada poço e a placa foi incubada por 25 minutos no escuro à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 50 µl de solução de parada a cada espaço e as placas foram lidas em um intervalo máximo de 10 minutos após a adição do reagente.

Para amostras com menos de 5 µL de volume, definido como a quantidade mínima para permitir a análise do cortisol através dos kits ELISA, foi adicionada H₂O pura até o mínimo requisitado pelo kit, através de um modelo exploratório. Nesses casos, as triplicatas não foram possíveis.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação entre grupos de crianças RNT e RNPT, as características clínicas foram comparadas usando o teste U de Mann-Whitney para variáveis contínuas e o teste qui-quadrado

para variáveis categóricas. Com relação ao efeito das covariáveis clínicas e demográficas sobre as concentrações basais de CS, foi executado o Modelo Linear Geral, análise multivariada de covariância (MANCOVA) com grupo de lactentes como principal fator. Correlação bivariada de Spearman e correlação parcial com “grupo” como fator foram utilizadas para investigar a relação entre variáveis demográficas e clínicas e também para avaliar a relação entre variáveis relacionadas ao estresse materno e níveis de CS do neonato. O ajuste do intervalo de confiança foi feito usando o teste de Bonferroni. Análises de Regressão Linear Múltipla buscaram o impacto do estresse materno e variáveis relevantes sobre o cortisol salivar do neonato. Os dados foram corrigidos sendo iguais as variâncias não assumidas às variáveis que não atenderam aos pressupostos do teste de Kolmogorov-Smirnov Z ($p < 0,05$) e do Teste de Levine para homogeneidade das variâncias. Testes para a hipótese nula apontaram que a variância do erro das variáveis dependentes foi igual entre os grupos. O tamanho mínimo da amostra foi calculado em 26, permitindo um erro alfa de 5% e um erro beta de 20%, por um poder estatístico de 80%. As análises foram realizadas utilizando o programa SPSS versão 21.0 (IBM).

5 RESULTADOS

Originalmente, o grupo RNT foi composto por 37 RN saudáveis, sendo 22 do sexo feminino, idade gestacional entre 37 e 40 semanas (média $38,5 \pm 1,1$ semanas) e peso de nascimento com escore Z de $0,440 \pm$ desvios-padrão (DP).

O grupo RNPT foi composto por 21 neonatos, sendo seis do sexo feminino, com idades gestacionais entre 30 e 36 semanas (média de $32,6 \pm 2,1$ semanas) e peso de nascimento com média de escore Z de 0,567.

Quatro RN do grupo RNT e três do grupo RNPT não puderam ter sua saliva adequadamente coletada devido à xerostomia, sendo excluídos.

Trinta e três RNT e 18 RNPT compuseram a amostra estudada final. Os dados demográficos e clínicos desse grupo são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos de mães e neonatos do estudo

Características da amostra	Grupos		χ^2/U	p
	RNT (N=33)	RNPT (N= 18)		
Gênero [n (%)]			6.8	.009
Feminino	20 (60,6%)	4 (22,2%)		
Masculino	13 (39,4%)	14 (77,8%)		
Idade gestacional (M \pm DP)	$38,5 \pm 1,1$	$32,6 \pm 2,0$,000	,000
Cesariana	15 (45,5%)	13 (72,2%)	3,4	,066
Reanimação ao nascimento	1 (3,0%)	12 (75%)	14,8	,000
Comprimento Z-score	0,249	0,803	,0	,000
Peso ao nascer Z-score	0,440	0,567	3,0	,000
Perímetro cefálico-cm (M \pm DP)	$34,7 \pm 1,9$	$28,7 \pm 1,9$	1,0	,000
Apgar 1º min (M \pm DP)	$7,9 \pm 1,3$	$7,3 \pm 1,2$	137,0	,063
Apgar 5º min (M \pm DP)	$9,1 \pm ,5$	$8,5 \pm 0,8$	121,0	,011
Sofrimento fetal [n (%)]			11,2	,000
Agudo	3 (9,1%)	3 (20,0%)		
Crônico	0 (0,0%)	4 (26,7%)		

Complicações no parto [n (%)]	8 (24,2%)	7 (38,9%)	1,0	,304
Analgesia [n (%)]	4 (12,5%)	0 (0%)	2,3	,128
Classificação de crescimento intrauterino [n (%)]			5,1	,076
PIG	4 (12,1%)	9 (52,9%)		
AIG	26 (78,8%)	9 (52,9%)		
GIG	3 (9,1%)	0 (0%)		
Índice de Eventos Nociceptivos	3,4 ± ,5	31,8 ± 23.3	,000	,002
Corticoide antenatal [n (%)]	0,0 (0%)	9 (60,0%)	24,5	,000
Idade materna (M ± DP)	27,6 ± 7,1	26,1 ± 5.9	274,5	,657
Educação materna			11,6	,041
Educação básica (até 5º ano)	0 (0%)	1 (5,6%)		
Ensino fundamental (até 9º ano)	10 (30,3%)	2 (11,1%)		
Ensino médio incompleto	6 (18,2%)	2 (11,1%)		
Ensino médio completo	14 (42,4%)	8 (44,4%)		
Graduação incompleta	3 (9,1%)	1 (5,6%)		
Graduação completa	0 (0%)	4 (22,2%)		
Relacionamento [n (%)]			2,095	,533
Solteiras	11 (33,3%)	4 (22,2%)		
União estável	12 (36,4%)	6 (33,3%)		
Divorciadas	1 (3,0%)	0 (0%)		
Casadas	9 (27,3%)	8 (44,4%)		
Renda familiar			5,585	,134
Até 1 salário mínimo	5 (15,2%)	0 (0%)		
1-3 salários mínimos	14 (42,4%)	13 (66,7%)		
3-6 salários mínimos	7 (21,2%)	4 (23,8%)		
Acima de 6 salários mínimos	0 (0%)	1 (4,8%)		
Não declarada	7 (21,2%)	0 (0%)		
Notas: M = média; DP = desvio padrão; n = número, % porcentagem PIG= Pequeno para idade gestacional; AIG = Adequado para idade gestacional; GIG= Grande para idade gestacional.				

As correlações entre as variáveis (correlações de Pearson e Spearman para variáveis métricas e não-métricas, respectivamente) estudadas são mostradas nas tabelas de 2 a 15.

Tabela 2 - Correlação entre grupo (RNT e RNPT) e variáveis da pesquisa

Variáveis	Correlação	Significância
Sexo do neonato	-0,367	0,008
Idade gestacional	-0,913**	0,000
Peso do neonato	-0,876**	0,000
Classificação do peso	-0,488	0,000
Comprimento do neonato	-0,861**	0,000
Perímetro cefálico	-0,845**	0,000
Manobras de ressuscitação	0,698**	0,000
Apgar 1	-0,264	0,061
Apgar 5	-0,318	0,023
Sufrimento fetal	0,403	0,004
Uso de corticoide antenatal	0,627**	0,000
Número de procedimentos	0,538**	0,000
Gestações anteriores	-0,340	0,015
Desejo da gravidez	0,457	0,001

** : correlação moderada a forte (> 0,5 ou < -0,5)

Tabela 3: Correlação entre cortisol salivar materno e variáveis da pesquisa

Variáveis	Correlação	Significância
Cortisol salivar do neonato	0,572**	0,000
Comprimento do neonato	-0,243	0,093
Apgar 1 min	-0,109	0,446
Apgar 5 min	-0,076	0,595
Uso de analgesia	-0,310	0,029
Tabagismo materno	0,252	0,091
Cor declarada	-0,387	0,056
Escolaridade	-0,293	0,093
Rede de esgoto	0,267	0,058
Água encanada	0,286	0,042

** : correlação moderada a forte (> 0,5 ou < -0,5)

Tabela 4: Correlação entre cortisol salivar do neonato e materno

Variáveis	Correlação	Significância
Cortisol da mãe	0,572**	0,000

** : correlação moderada

Tabela 5: Correlação entre peso de nascimento do neonato e demais variáveis clínicas

Variáveis	Correlação	Significância
Comprimento	0,942**	0,000
Perímetro cefálico	0,952**	0,000
Manobras de ressuscitação	-0,687**	0,000
Apgar 1 min	0,246	0,091
Apgar 5 min	0,272	0,061
Uso de analgesia	0,275	0,062
Sufrimento fetal	-0,424	0,003
Uso de corticoide antenatal	-0,678**	0,000
Número de procedimentos	-0,566**	0,000
Número de consultas	0,314	0,062
Desejo da gravidez	-0,321	0,028
Nível socioeconômico	-0,295	0,055
Escolaridade	-0,367	0,010

** : correlação moderada a forte ($> 0,5$ ou $< -0,5$)

Tabela 6: Correlação entre volume salivar materno e demais variáveis clínicas

Variáveis	Correlação	Significância
Cortisol salivar do neonato	0,352	0,042
Manobras de ressuscitação	-0,369	0,022
Apgar 5 min	0,333	0,054
Uso de corticoide antenatal	-0,400	0,019
Rede de esgoto	0,392	0,022

** : correlação moderada a forte ($> 0,5$ ou $< -0,5$)

Tabela 7: Correlação entre volume salivar do neonato e demais variáveis clínicas

Variáveis	Correlação	Significância
Complicações no parto	0,416	0,018
Preferência de sexo	0,328	0,067

** : correlação moderada a forte (> 0,5 ou < -0,5)

Tabela 8: Correlação entre idade gestacional e demais variáveis clínicas

Variáveis	Correlação	Significância
Sexo do neonato	0,388	0,005
Peso do neonato	0,789**	0,000
Classificação de peso	0,518**	0,000
Comprimento do neonato	0,781**	0,000
Perímetro cefálico	0,847**	0,000
Manobras de ressuscitação	-0,655	0,000
Apgar 1 minuto	0,270	0,077
Sufrimento fetal	-0,311	0,028
Uso de corticoide antenatal	-0,630**	0,000
Número de procedimentos	-0,546**	0,000
Número de consultas	0,404	0,012
Gestações anteriores	0,298	0,033
Desejo da gravidez	-0,278	0,050
Escolaridade	-0,254	0,072

** : correlação moderada a forte (> 0,5 ou < -0,5)

Tabela 9: Correlação entre número de consultas pré-natais e demais variáveis

Variáveis	Correlação	Significância
Idade gestacional	0,404	0,012
Peso do neonato	0,339	0,043
Comprimento do neonato	0,350	0,036
Perímetro cefálico	0,514**	0,009
Manobras de ressuscitação	-0,500**	0,001
Número de procedimentos	-0,331	0,042
Proximidade do pai	-0,285	0,088
Reação do pai	-0,316	0,057

** : correlação moderada a forte ($> 0,5$ ou $< -0,5$)

Tabela 10: Correlação entre uso de glicocorticoide antenatal e demais variáveis

Variáveis	Correlação	Significância
Grupo (RNT, RNPT)	0,627**	0,000
Volume salivar materno	-0,400	0,019
Idade gestacional	-0,733**	0,000
Peso do neonato	-0,678**	0,000
Classificação do peso	-0,342	0,017
Manobras de ressuscitação	0,555**	0,000
Comprimento neonato	-0,617**	0,000
Perímetro cefálico	-0,522**	0,022

** : correlação moderada a forte ($> 0,5$ ou $< -0,5$)

Tabela 11: Correlação entre sofrimento fetal e demais variáveis clínicas

Variáveis	Correlação	Significância
Idade gestacional	-0,401	0,004
Peso neonato	-0,424	0,003
Comprimento do neonato	-0,503**	0,001
Perímetro cefálico	-0,378	0,050
Apgar 1 min	-0,482	0,000
Apgar 5 min	-0,453	0,000
Manobras de ressuscitação	0,503	0,000
Procedimentos nociceptivos	0,362	0,010

** : correlação moderada a forte ($> 0,5$ ou $< -0,5$)

Tabela 12: Correlação entre número de procedimentos nociceptivos e demais variáveis

Variáveis	Correlação	Significância
Idade gestacional	-0,546**	0,000
Peso neonato	-0,542**	0,000
Comprimento neonato	-0,484	0,000
Perímetro cefálico	-0,378	0,050
Apgar 1 min	-0,386	0,005
Apgar 5 min	-0,280	0,047
Manobras de ressuscitação	0,723**	0,000
Número de procedimentos	0,362	0,010
Uso de corticoide antenatal	0,501**	0,000
Sexo do neonato	-0,258	0,068
Número de consultas	-0,331	0,042
Escolaridade	0,340	0,015

** : correlação moderada a forte ($> 0,5$ ou $< -0,5$)

Tabela 13: Correlação entre Apgar 1' e demais variáveis clínicas

Variáveis	Correlação	Significância
Renda	0,321	0,032
Número de gestações	0,316	0,024
Sofrimento fetal	-0,490	0,000
Manobras de ressuscitação	-0,470	0,000
Grupo (a termo)	-0,320	0,022
Idade gestacional	0,250	0,077
Número de procedimentos	-0,386	0,005
Comprimento neonato	0,275	0,058

** : correlação moderada a forte ($> 0,5$ ou $< -0,5$)

Tabela 14: Correlação entre Apgar 5' e demais variáveis

Variáveis	Correlação	Significância
Cortisol salivar materno	0,333	0,050
Classificação do peso	0,241	0,098
Perímetro cefálico	0,342	0,081
Sofrimento fetal	-0,453	0,001
Manobras de ressuscitação	-0,297	0,034
Grupo (a termo)	-0,292	0,031
Gestações anteriores	0,357	0,010
Número de procedimentos	-0,280	0,047
Preferência do sexo	-0,236	0,099

** : correlação moderada a forte ($> 0,5$ ou $< -0,5$)

Na sequência, foram realizadas comparações entre as variáveis métricas, considerando os grupos de neonatos prematuros e a termo. Apesar da diferença no número de sujeito, o poder estatístico das análises variou entre 0,89 a 0,95.

Tabela 15 – Comparação das variáveis estudadas entre neonatos a termo e pré-termo

Variáveis	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)
Cortisol salivar materno	237,000	798,000	-1,184	0,237
Cortisol salivar do neonato	267,000	828,000	-0,591	0,554
Volume salivar mãe	74,500	119,500	-1,508	0,131
Volume salivar neonato	95,500	131,500	-0,022	0,982
Idade da mãe	273,500	444,500	-0,464	0,643
Comprimento do neonato	5,500	158,500	-5,587	0,000
Perímetro Cefálico	1,000	106,000	-4,378	0,000
Apgar 1 min	189,500	360,500	-2,264	0,024
Apgar 5 min	208,000	379,000	-2,067	0,039
Tabagismo	239,000	375,000	-0,054	0,957
Procedimentos nociceptivos	133,000	694,000	-3,930	0,000
Numero de consultas	89,500	225,500	-2,594	0,009
Filhos falecidos	286,500	457,500	-0,444	0,657
Gestações anteriores	178,500	349,500	-2,401	0,016
Nível socioeconômico	202,000	580,000	-0,975	0,329
Peso do neonato	4,500	157,500	-5,586	0,000

Para avaliar se o CS materno poderia prever o CS neonatal, foi realizada uma regressão linear simples entre as variáveis, com poder do teste de 0,96. Pela análise de regressão, o CS da mãe prediz o CS neonatal, $R^2=0,327$ $p<0,001$, $b=0,649$; $\beta=0,57$; $p=0,000$ (Gráfico 1).

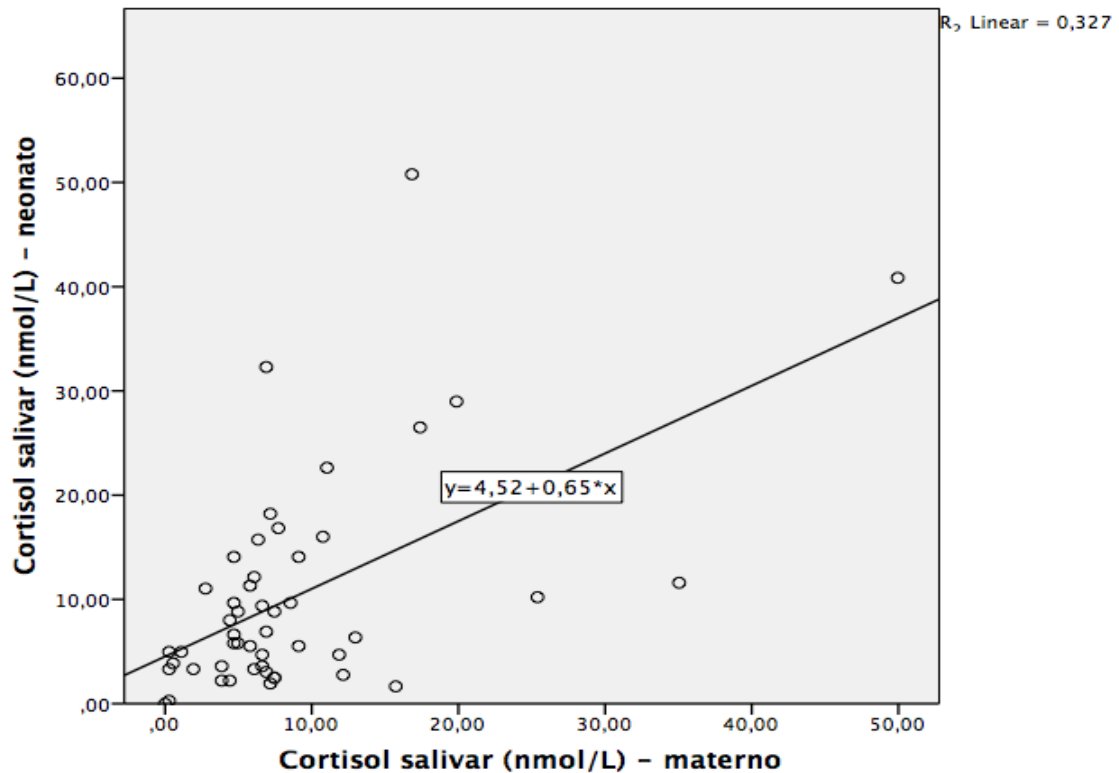


Gráfico 1 – Regressão linear Cortisol salivar materno e neonatal

O CS materno não influenciou o volume de saliva neonatal, verificado a partir de regressão simples não significativa. Foram realizadas regressões simples também para verificar se o cortisol materno tem influência na idade gestacional de nascimento, no peso e comprimento do neonato ao nascer e nos resultados do escore Apgar 1º e 5º minutos. Todas as regressões realizadas foram não significativas, tendo inclusive apresentado indicadores de correlação entre erros (Durbin-Watson menor que 1,0), o que indica outras variáveis intervenientes que influenciam essas relações.

Na sequência foram realizadas quatro regressões logísticas binárias com o objetivo de testar modelos para prever o CS (alto ou baixo) dos neonatos, o CS das mães (alto ou baixo) e os resultados do escore Apgar 1º e 5º minutos (alto ou baixo). Os valores de CS foram classificados em altos ou baixos em virtude do valor da mediana da distribuição, no caso 0,45. Os resultados dos testes Apgar 1' e 5' foram classificados em altos ou baixos em virtude do valor 7, considerado pela literatura. Para CS materno, foram inseridas as seguintes variáveis como preditoras: comprimento do neonato, analgesia, tabagismo, cor declarada, escolaridade,

rede de esgoto e água encanada. Os resultados indicaram um valor inicial do -2LL foi de 27,037 para o modelo vazio. Após a inserção das variáveis explicativas, o -2LL foi reduzido para 5,439.

O valor de Qui-quadrado de 21,553 (gl=9; p=0,010) identifica que o modelo com as variáveis explicativas contribui para a compreensão do fenômeno. Os valores de Cox & Snell e Nagelkerke indicam uma explicação de 0,59 e 0,88, respectivamente. Os valores não significativos do teste de Hosmer e Lemeshow ($\chi^2=1,421$; gl=8; p=0,994) indicam que não há diferenças estatisticamente significativas entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo. O modelo apresenta um percentual de classificação correta de 91,7 (acima de 80% para ambas as categorias), sendo que nenhum preditor foi considerado significativo para este modelo. O fato de nenhum preditor ser considerado significativo pode ter ocorrido em virtude da baixa variabilidade amostral, embora o poder do teste esteve em 0,86.

O segundo modelo testado (variável dependente nível de cortisol do neonato) teve as seguintes variáveis como predictoras: CS materno, volume de saliva materno, idade da mãe, idade gestacional, peso do neonato, comprimento do neonato. Os resultados indicaram um valor inicial do -2LL foi de 37,371 para o modelo vazio. Após a inserção das variáveis explicativas, o -2LL foi reduzido para 30,808. O valor de Qui-quadrado de 6,543 (p=0,365) identifica que o modelo com as variáveis explicativas não contribui para a compreensão do fenômeno. Os valores de Cox & Snell e Nagelkerke indicam uma explicação de 0,19 e 0,27, respectivamente. Os valores não significativos do teste de Hosmer e Lemeshow ($\chi^2=8,785$; gl=8; p=0,361) indicam que não há diferenças estatisticamente significativas entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo. O modelo apresenta um percentual de classificação correta de 80,6% (95,5% de classificação correta para os sujeitos de cortisol baixo), sendo que nenhum preditor foi considerado significativo para este modelo. O fato de nenhum preditor ser considerado significativo pode ter ocorrido em virtude da baixa variabilidade amostral, embora o poder do teste estivesse em 0,82.

O terceiro modelo testado (variável dependente “Apgar 1”) teve as seguintes variáveis como predictoras: renda familiar, número de gestações, sofrimento fetal, ressuscitação, grupo, idade gestacional, número de procedimentos, comprimento do neonato. Os resultados indicaram um valor inicial do -2LL foi de 48,361 para o modelo vazio. Após a inserção das variáveis explicativas, o -2LL foi reduzido para 22,687. O Qui-quadrado de 25,616 (gl=11; p=0,007) identifica que o modelo com as variáveis explicativas contribui para a compreensão

do fenômeno. Os valores de Cox & Snell e Nagelkerke indicam uma explicação de 0,46 e 0,67, respectivamente. Os valores não significativos do teste de Hosmer e Lemeshow ($\chi^2=3,105$; $gl=8$; $p=0,928$) indicam que não há diferenças estatisticamente significativas entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo. O modelo apresenta um percentual de classificação correta de 88,1% (percentual de classificação correta acima de 70% para ambos os grupos), sendo que nenhum preditor foi considerado significativo para este modelo. O fato de nenhum preditor ser considerado significativo pode ter ocorrido em virtude da baixa variabilidade amostral, embora o poder do teste esteve em 0,89.

O quarto modelo testado (variável dependente “Apgar 5”) teve as seguintes variáveis como predictoras: CS materno, classificação do peso, perímetro cefálico, sofrimento fetal, ressuscitação, grupo, gestações anteriores, número de procedimentos, preferência por sexo. Os resultados não foram significativos para nenhum dos indicadores e o poder do teste foi 0,79.

Variáveis mediadoras

Para testar as relações indiretas entre CS materno, idade gestacional e CS do neonato foram realizadas regressões lineares simples para testar a mediação. Uma variável mediadora é aquela que altera, para mais ou para menos, a probabilidade de ocorrência de um efeito da variável independente (VI) sobre a variável dependente (VD). Outro aspecto importante da mediação é que ela explica a forma (ou uma das formas) pela qual a VI (antecedente) influencia a VD (critério), estando, portanto, sempre relacionada a ela, segundo Parkes (1994) e Baron & Kenny (1986).

A análise da mediação somente por ser realizada por meio de regressões das variáveis uma a uma. Para testar essas relações, cada VI e mediadora deve ser submetida a regressões individuais com a VD.

As concentrações de cortisol salivar materno predisseram significativamente as concentrações de cortisol salivar nos recém-nascidos ($r = 0,572$, $p < 0,000$) (Gráfico 2).

Nenhuma diferença significativa nas concentrações de cortisol foi encontrada entre RNT e RNPT.

Para avaliar se o CS materno predisse o CS neonatal, também foi realizada uma regressão linear simples entre as variáveis, com nível de poder de teste de 0,96.

Por regressão, o CS materno prediz o CS do neonato, $r^2 = 0,327$, $p < 0,001$, $b = 0,649$; $\beta = 0,57$; $p = 0,000$. O cortisol da mãe não influenciou o volume da saliva fetal, verificado a partir da regressão simples não significativa (Gráfico 3).

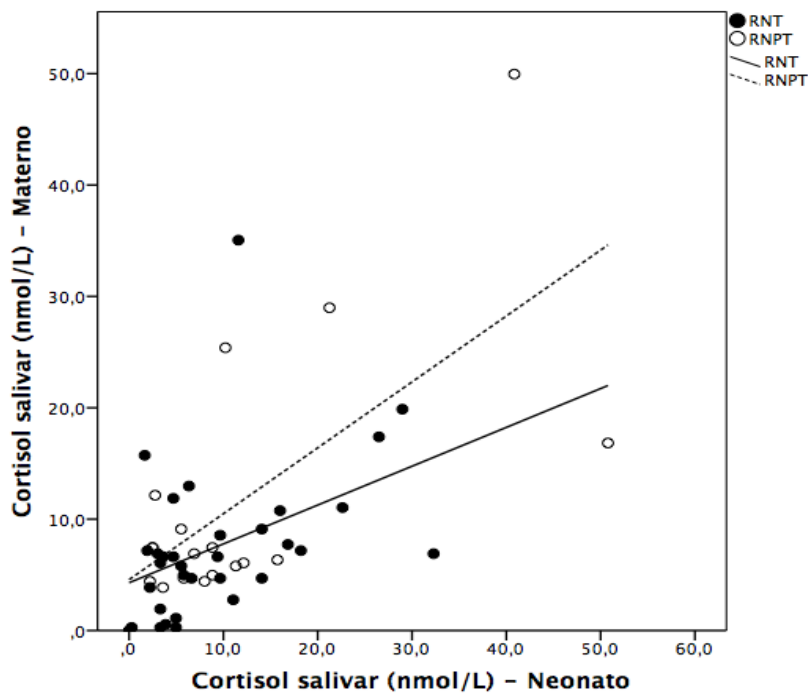


Gráfico 2 - Regressão linear Cortisol salivar materno e grupos RNT e RNPT

Regressões simples também foram realizadas para verificar se o cortisol materno estava vinculado à idade gestacional, ao peso ao nascer, ao comprimento e aos escores de Apgar 1' e 5'. Todas as regressões não foram significativas, incluindo indicadores de correlação entre erros (Durbin-Watson $< 1,0$), que indicaram outras variáveis intervenientes nessas relações.

Efeito do grupo e covariáveis sobre as concentrações de cortisol salivar materno-infantil

Os grupos RNT e RNPT não diferiram entre as concentrações basais de CS e o volume salivar, nem para os neonatos nem para suas mães (Tabela 16).

Tabela 16 - Dados descritivos das medidas de estresse, com base nas variáveis emocionais e fisiológicas auto referidas nas mães e nas concentrações fisiológicas de cortisol para os neonatos.

Características emocionais e fisiológicas de Estresse	Grupos		χ^2/U	p
	RNT (N=33)	RNPT (N= 18)		
Escore Holmes–Rahe	22.3 ± 129.3	248.9 ± 139.4	159.5	0.650
Classificação				
Holmes–Rahe [n (%)]				
.sem estresse	9 (36.0%)	4 (28.6%)	0.3	0.878
.moderado	10 (36.0%)	6 (42.9%)		
.alto	7 (23.1%)	4 (28.6%)		
Escore escala de Edimburgo	26.6 ± 4.1	25.7 ± 5.9	343.5	0.650
Fatores de ansiedade	8.15 ± 1.8	7.8 ± 2.7	334.0	0.687
Fatores de depressão	5.8 ± 1.0	5.8 ± 1.0	354.0	0.954
Cortisol salivar materno (µg/dL)	0.28 ± .24	.42 ± .40	296.0	0.134
Cortisol salivar neonato (µg/dL)	0.35 ± .30	.44 ± .48	275.0	0.664
Volume de saliva materno (µL)	140,2 ± 92.6	106.7 ± 79.1	73.0	0.150
Volume de saliva do neonato (µL)	80.7 ± 65.2	81.9 ± 76.5	86.0	0.781

Valores expressos em M ± DP: média ± desvio padrão

Notas: n = número, % porcentagem.

Não houve correlação entre o volume de saliva e o CS neonatal, analisada pela correlação parcial controlada pelo grupo ($r = ,26$, $p = ,709$), nem para as mães ($r = -0,90$, $p = 104$), como mostrado no Gráfico 3.

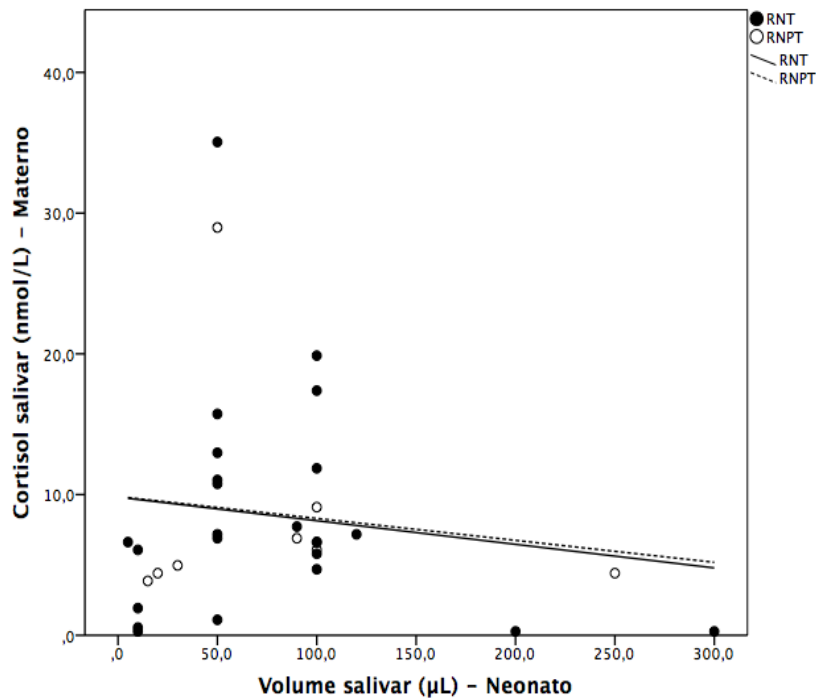


Gráfico 3 – Volume salivar neonatal em modelo de predição pelas concentrações de cortisol salivar materno em análise de regressão linear.

Uma MANCOVA foi realizada para analisar o efeito do grupo de variáveis independentes (RNT vs RNPT), covariáveis clínicas e demográficas nas concentrações de CS materno e neonatal. As concentrações de CS dos neonatos apresentaram correlação com o índice de eventos nociceptivos ($F = 11,834$, $p = 0,0041$). O nível de estresse materno durante a gestação ($F = 4,412$, $p = 0,060$) e o nível de CS materno ($F = 3,333$, $p = 0,079$) mostraram efeito marginal sobre o CS do lactente. Nenhuma outra variável apresentou efeito significativo nas concentrações de CS do lactente.

O escore materno nos inventários de auto relato para estresse e estados emocionais não mostrou diferença significativa entre os grupos RNT e RNPT (Tabela 16). Quando os escores da escala de estresse gestacional de moderado e alto nível de estresse foram colapsados em um

nível denominado “estresse” versus “sem estresse” em uma variável simulada “sim/não”, observou-se um aumento no número de mães em condição de estresse: 40% (n: 13) no grupo RNT e 44,4% (n: 8) no grupo RNPT, embora os grupos ainda não diferissem ($\chi^2 = 0,375$, $p = 0,540$). Como não foi encontrada diferença entre os grupos para as variáveis estudadas, as análises subsequentes foram relacionadas à amostra categorizada por “estresse gestacional materno” versus “não estresse” com base nos escores da escala de estresse de Holmes-Rahe. A Tabela 17 mostra os principais resultados dos indicadores de estresse, de acordo com a condição de estresse versus ausência de estresse para escore da escala de estresse materno, valores de CS e volume salivar para mães e neonatos.

Tabela 17 - Indicadores de estresse analisados pelo nível materno de estresse (estresse vs. sem estresse).

Indicadores de estresse	<i>Estresse</i>	<i>Sem estresse</i>	<i>t</i> (df = 30)	<i>p</i>
Escore escala Holmes–Rahe	337.31 (115.1)	92.7 (42.6)	6.366	0.000
Escore escala Edimburgo	27.14 (4.5)	26.53 (5.0)	-.352	0.246
Fatores de ansiedade	8.14 (2.1)	5.82 (0.9)	.328	0.749
Fatores de depressão	5.86 (1.0)	8.41 (2.1)	-.091	0.928
Cortisol salivar materno (µg/dL)	0.27 (0.17)	0.32 (0.33)	.504	0.619
Volume de saliva materna (µL)	120.5 (52.5)	121.5 (45.8)	.051	0.960
Cortisol salivar neonatal (µg/dL)	0.44 (0.33)	0.26 (0.26)	-1.364	0.187
Volume de saliva neonato (µL)	51.5 (30.9)	118.2 (94.2)	2.132	0.046

Valores expressos em M±DP: média ± desvio-padrão

Análises da amostra completa de fatores estressantes relacionados à mãe e ao neonato

Considerando todo o grupo classificado no estresse pré-natal e sem condições de estresse, as análises de regressão linear mostraram que as concentrações maternas de CS predisseram significativamente as concentrações de CS de seus neonatos ($R = 0,56$, $R^2 = 0,32$, $p = 0,000$), Gráficos 1 e 2. No entanto, um poder de predição não significativo foi encontrado entre CS e

volume de saliva dos neonatos ($R = 0,180$, $R^2 = 0,032$, $p = 0,332$). O volume de saliva dos neonatos correlacionou-se negativamente com o uso de glicocorticosteroides durante o período gestacional ($r = -0,991$, $p = 0,000$). A variável *dummy* para estresse materno (para estresse materno moderado e extremo) correlacionou-se positivamente às concentrações de CS dos neonatos ($r = 0,37$, $p = 0,036$) e negativamente com o volume de saliva dos neonatos ($r = -0,44$, $p = 0,046$). O “estresse” vs. “ausência de estresse” das mães durante a gestação foi utilizado como fator em um teste t para amostras independentes, buscando o seu efeito sobre os indicadores de estresse. O efeito significativo foi encontrado apenas sobre o volume de saliva dos neonatos, $p = 0,046$ (Tabela 17).

Observamos uma ampla faixa etária materna, desde adolescentes até mulheres com mais de 35 anos. Uma MANCOVA foi aplicada aos dados maternos que incluíam a idade materna como fator aleatório, as covariáveis do peso do nascimento e da idade gestacional do neonato, juntamente com covariáveis da mãe do estado civil e medidas do estado emocional (Tabela 3). Em relação ao CS materno, nem a idade da mãe nem as covariáveis tiveram efeitos significativos.

Análises de regressão múltipla foram realizadas para avaliar o valor preditivo do efeito do número de eventos nociceptivos experimentados pelos neonatos, número de fatores de depressão, ansiedade, nível de estresse materno durante a gravidez e idade materna sobre o CS neonatal. Essas variáveis estatisticamente predisseram significativamente as concentrações de CS dos lactentes, $F(4,4) = 7,372$, $p = 0,039$, $R^2 = 0,881$, sendo o número de eventos nociceptivos a variável que mais contribuiu à essa predição, $p = 0,015$.

6 DISCUSSÃO

A análise das díades mães e RNT e mães e RNPT mostrou que não havia diferença entre elas quanto aos fatores emocionais maternos, estresse gestacional nem quanto às concentrações de CS. Embora tenham sido encontrados valores médios mais elevados de CS entre as díades mãe-RNPT, essas díades também apresentaram maior variabilidade nesses valores, de forma que não se observou diferença significativa com o grupo mãe-RNT. Essa maior variabilidade do CS no grupo RNPT pode ser explicada pelos diferentes graus de impacto da prematuridade na regulação e maturação do eixo HHA nos RN entre 30 e 36 semanas, enquanto há menor variabilidade nesses valores entre os RNT.

Ao se analisar todo o grupo de díades, observou-se influência do estresse materno sobre a concentração de CS do neonato, incluindo o estresse materno decorrente do número de eventos nociceptivos experimentados pelos seus filhos.

A análise multivariada dos parâmetros demográficos e clínicos para comparar os dois grupos de díades (mãe-RNT e mãe-RNPT) não mostrou haver efeito significativo desses parâmetros sobre os indicadores de estresse. Uma possível explicação para a falta de diferença entre grupos nas concentrações de CS dos RN pode estar no fato de que a concentração de cortisol decai após o nascimento já ao longo dos primeiros dias, como demonstrado por Cabral et al. (2013). Esses autores investigaram prematuros criticamente doentes e recém-nascidos saudáveis no 2º, 9º e 14º. Em nossa amostra, a saliva de RNT foi coletada próximo à 48ª hora de vida, enquanto a saliva do grupo RNPT foi coletada em torno de uma semana de vida. Assim, como não encontramos diferenças entre os grupos, entendemos ser importante um estudo futuro com uma análise mais aprofundada para se avaliar o efeito do estresse materno durante a gravidez e dos indicadores emocionais pós-parto sobre o CS das díades RNT e RNPT-mães, coletando-se o CS no mesmo período de vida.

Um importante resultado deste estudo foi que a concentração de CS materno foi uma variável preditora da concentração de CS neonatal, independente da idade gestacional. As maiores concentrações de CS materno foram inversamente relacionadas ao menor volume de saliva em mães e neonatos. A relação entre a reatividade materna ao estresse durante a gravidez e/ou os sintomas depressivos e a regulação emocional do neonato tem sido explorada por outros autores utilizando CS (32), apesar da maioria dos estudos reportarem tal correlação em amostras de neonatos e lactentes em idades diferentes das deste estudo (por exemplo: neonatos com 10

dias de vida por Boltenet al., 2013; lactentes com 16 meses por Ludmeret al., 2015 (65), 2, 9 e neonatos com 14 dias por Cabral et al., 2013 (66).

Neste estudo avaliamos também o efeito do estresse gestacional no volume de saliva, demonstrando que quanto mais intensos esses fatores eram, menor era o volume de saliva produzido. Especificamente, os sintomas depressivos em mães implicaram em seu próprio menor volume de saliva, enquanto o estresse gestacional materno foi relacionado com menor volume de saliva em neonatos.

As variáveis “índice de eventos nociceptivos”, “número de fatores de depressão”, “nível de estresse materno durante a gravidez” e “idade materna”, quando estudadas através de análises de regressão múltipla, explicaram 88% da variância CS dos neonatos. Este efeito tem sido apontado na literatura como desenvolvimento dependente de experiência. As sequelas da experiência nociceptiva precoce podem potencialmente trazer prejuízos, como alterações na resposta à dor, pois as exposições dolorosas repetidas estão associadas a uma regulação negativa do eixo HHA, diminuindo o tônus adrenal, e a uma resposta mais baixa ao estresse (29).

Em nossa amostra, os neonatos com maiores concentrações de CS haviam sido submetidos a maior índice de eventos nociceptivos. Podemos especular que os neonatos que tiveram mais complicações clínicas e realizaram procedimentos mais invasivos poderiam atingir os níveis de exaustão propostos por Selye (1950) (67) em sua "síndrome de adaptação geral", na qual o corpo se torna vulnerável nos níveis psicológico e imunológico, tornando-se mais frequentemente doente, menos reativo e assim desenvolver uma reprogramação metabólica em vários tecidos e sistemas do organismo, incluindo concentrações mais baixas de cortisol (68).

Em relação ao volume de saliva, emergiu um cenário mais complexo, demonstrando que mesmo RNT saudáveis podem apresentar altos níveis de estresse a ponto de afetar o volume de saliva. Um esforço considerável dos pesquisadores deste estudo para coleta de pequenos volumes de saliva em neonatos foi realizado. A medida do cortisol foi adaptada para volumes muito pequenos de saliva obtidos e permitiu que valores consistentes fossem analisados. Em nossa amostra, alguns lactentes produziram valores abaixo de 5 µL de saliva em ambos os grupos (RNT e RNPT), mostrando que essas pequenas quantidades não são necessariamente devidas apenas à idade gestacional, mas a outros fatores como estresse materno e uso de corticosteroides durante o período gestacional. Também observamos que até mesmo

quantidades menores de glicocorticosteroides recebidos por gestantes com risco de parto prematuro (até 24 mg de betametasona para assegurar a maturação pulmonar fetal) podem reduzir o volume de saliva dos neonatos, apesar destes valores não terem efeito na supressão da função adrenal do neonato(60).

Neste trabalho associamos aspectos de dois métodos publicados anteriormente para coleta de saliva e dosagem de CS em lactentes, com o método de múltiplos *swabs* (45, 51, 69) e ajuste da rotina laboratorial (45) para análise de saliva. Nossos resultados foram concordantes com os achados reportados por Tu et al. (2007) (43) referentes às concentrações de CS dos neonatos filhos de mães com baixo nível de estresse, mostrando média de 0,20 µg/dL para RNPT e 0,30 µg/dL para RNT. Entretanto não obtivemos o mesmo sucesso de Glover et al (2013) (31) em relação ao tamanho da amostra, pois apenas 67% da nossa amostra de RNPT pode ser analisada, apesar de usarmos processo semelhante para coletar saliva e trabalhar com quantidades menores que 5 µL. Eles obtiveram de 50 a 350 µL de saliva em 85% da amostra de lactentes prematuros. Isso pode ter acontecido porque coletamos apenas três *swabs* no período máximo de uma hora, tentando não prolongar o tempo do procedimento, o que poderia ser outra variável de confusão em relação ao estresse. No entanto, como Mörelius et al. (2004 e 2012)(45, 55), também atingimos volume salivar adequado em 86% das amostras considerando os dois grupos da amostra com sucesso na coleta de saliva e replicando o volume obtido. Mörelius et al. (2004)(45) utilizaram duas maneiras de obter mais material de saliva para análises por ELISA: diminuir a temperatura de incubação enquanto prolonga-se o tempo de incubação e diluir os ingredientes do processo de dosagem. O antissoro foi diluído na razão 1:40 (em vez de 1:20), e o rádio-ligante foi diluído até 100 µL Seguimos a estratégia de diluir as amostras de saliva até o mínimo requerido pelo kit ELISA para trabalhar com as amostras.

Uma questão que surgiu dessas análises foi “*o que fazer com neonatos que não fornecem saliva*”? Se a boca seca pode ser um subproduto do estresse, isso pode significar que este é possivelmente um sintoma do nível final de estresse e tem duas implicações: em primeiro lugar, devemos encontrar outro marcador fisiológico de estresse em neonatos que é sensível em todas as condições de sofrimento. Em segundo lugar, neonatos que apresentam boca seca devem ser eleitos para altos níveis de controle de estresse em ambientes clínicos, enquanto investigações mais profundas estão sendo realizadas para entender as razões da boca seca.

Assim, nossos dados mostram haver real impacto do padrão de estresse materno nos

períodos gestacional e perinatal sobre a resposta do eixo HHA de seus neonatos, afetando o volume salivar e as concentrações de CS neonatal.

Os resultados deste estudo também geram oportunidade para outras condutas de seguimento dos neonatos a médio e longo-prazo. Uma das linhas de investigação atual nas ciências da saúde busca reconhecer o real impacto epigenético de estressores ambientais no eixo HHA do feto, com consequências em etapas posteriores da vida e inclusive em gerações futuras que não tiveram contato com o agente estressor (efeito transgeracional). O impacto transgeracional nos vários tecidos do organismo da prole em decorrência da exposição materna ao sofrimento físico e emocional durante a gravidez tem sido investigado em modelos murinos. Os dados mostram que efeitos epigenéticos podem se manifestar até a terceira geração de ratos, cuja primeira geração foi a única exposta ao estresse no final da gestação(70). A primeira e as duas seguintes gerações mostraram redução gradual de alguns parâmetros clínicos, como o tempo gestacional, o ganho de peso materno, qualidade da atividade comportamental, aumento das concentrações de glicose no sangue, além de reduzir o crescimento da prole e retardar o desenvolvimento comportamental. Foi proposto um fator epigenético operante sobre a adaptação de estresse mediada por micro Ácidos ribonucleicos (miRNA) que supostamente abrangem tanto a indução de um miRNA (rnomiR-466b-1-3p) quanto a supressão da expressão de três miRNAs (rno-miR-145-3p, rno -miR-24-1-5p e rno-miR-375) no córtex frontal.

Limitações do Estudo:

Existem algumas limitações deste estudo que podem ter interferido tanto nos resultados obtidos como na comparação dos nossos resultados com outros reportados na literatura. A faixa de idade gestacional dos neonatos, o viés de gênero e a falta de uma medida padronizada comportamental de estresse em relação aos neonatos são variáveis que podem interferir nos resultados do CS e conseqüentemente em uma melhor compreensão do comportamento do eixo HHA no período neonatal.

(a) Nossa amostra não incluiu RNPT extremos, que apresentam maior risco de apresentar sequelas no desenvolvimento neurológico, incluindo a formação do eixo hipotalâmico-hipofisário e a regulação da adrenal neonatal. A precocidade do nascimento relaciona-se ao período durante o qual o córtex cerebral e a rede subcortical são imaturos e a organização

neuronal do lobo frontal ainda não ocorreu(71). Um estudo anterior que encontrou diferenças nas concentrações de cortisol entre RNPT e RNT incluiu aquelas nascidas com 26 semanas de gestação (30), enquanto o nosso estudo foi limitado a neonatos nascidos a partir de 30 semanas de gestação.

(b) A amostra deste estudo apresentou tamanho pequeno, fato que, apesar da investigação de variáveis importantes, não permitiu cobrir outros pontos importantes como a proposição de valores de referência as concentrações de cortisol salivar para a resposta ao estresse da díade mãe-neonato.

(c) Outra característica deste estudo foi a maior prevalência de RN do sexo masculino, chegando a representar 70% no grupo RNPT. Há uma conhecida diferença na resposta e no equilíbrio do eixo HHA entre homens e mulheres. Espera-se um efeito mais intenso na biologia do cortisol em meninas após estresse materno, uma vez que elas apresentam a amígdala direita maior, o que está associado a um maior potencial no incremento do cortisol e maiores concentrações de cortisol materno no período gestacional inicial (30, 72). Assim, estudos futuros devem ter um maior controle da distribuição de gênero.

(d) A avaliação do estresse infantil no modelo unimodal também pode interferir na interpretação dos resultados. Avaliar o estresse em idades tão precoces exige mais de uma modalidade de medida e também um rigoroso controle das covariáveis maternas e ambientais interferentes no processo de estresse neonatal. Essa análise mais complexa e completa pode ser feita em neonatos, por exemplo, utilizando-se escalas de estresse uni e multimodais ou através de medições fisiológicas do estresse obtidas a partir do potencial de resposta evocado (ERP), condutância da pele associados à dosagem de hormônios relacionados ao estresse, como a beta-endorfina e CS. No entanto, alguns autores referem que neste aspecto as concentrações de CS dependem da magnitude da interação entre o sistema nervoso simpático (SNS) e o eixo HHA e parece não se comportar linearmente às concentrações séricas de cortisol em condições como a gravidez, pois na gestação há mudanças nas concentrações séricas de globulina ligadora de cortisol, alterando a medicação do cortisol total (mas não do cortisol livre, cuja mensuração ainda carece de tecnologia adequada)(56).

(e) Além desses pontos, a dosagem do CS tem sido apontada por alguns autores como uma medida controversa da avaliação do estado de estresse de um indivíduo e que não deveria ser usado como uma medida única para estresse agudo (32). Apesar dessa colocação, no nosso

estudo não explorou a reação das díades a um teste de estresse agudo, mas analisamos as concentrações CS explorando o funcionamento contínuo do sistema nervoso simpático das díades mãe-RN. Fica a proposta para estudos futuros medirem a reação do eixo HHA de neonatos a estressores agudos.

(f) Outro ponto importante é a necessidade de se definir consensualmente os valores de corte para se caracterizar o nível do estresse materno, pré e pós-parto. Esse conhecimento pode ter impacto na interpretação da resposta ao estresse pelo neonato.

7 CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo mostram que:

-As concentrações de CS materno estão correlacionadas às concentrações de CS neonatal.

-As concentrações do CS e o volume salivar neonatal estão correlacionados com o estado emocional e o padrão de estresse materno.

-As concentrações do CS e o volume salivar neonatal estão correlacionados ao estado clínico do neonato e ao número de eventos nociceptivos por ele vivenciados, independente da idade gestacional.

-Concentrações mais baixas de CS do neonato estão correlacionadas com o uso de glicocorticoide durante a gestação.

-O volume de saliva do neonato não depende apenas da idade gestacional ou do estado maturacional das glândulas salivares, mas também parece estar relacionado ao perfil de estresse materno.

- O número de consultas pré-natais está correlacionado ao perímetro cefálico e frequência de manobras de ressuscitação, embora a correlação seja moderada.

Neste estudo avaliamos também o efeito do estado depressivo materno e do estresse gestacional no volume de saliva, demonstrando que quanto mais intensos esses fatores eram, menor era o volume de saliva produzido. Especificamente, o estresse vivenciado pelas mães no período gestacional materno foi relacionado com menor volume de saliva em neonatos.

Assim, nossos dados descrevem real impacto do padrão de estresse materno nos períodos gestacional e perinatal sobre a resposta do eixo HHA de seus neonatos, afetando o volume salivar e as concentrações de CS neonatal.

8 RECONHECIMENTO

A idealização deste estudo teve como mentora intelectual a Professora Rosana Tristão, a qual participou exaustivamente das etapas de elaboração do projeto, execução e análise dos dados.

Este estudo recebeu suporte para coleta e análise do cortisol salivar de Brena Bardonasci, Vanessa Caroline Martins, Bruno César Rodrigues do Amaral, Tatiana Santos e Teresa Cristina Cardoso Tristão.

A mensuração do cortisol salivar também teve o suporte do Laboratório Interdisciplinar de Biociências, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goodnite PM. Stress: A Concept Analysis. *Nursing Forum*. 2014;49(1):71-4.
2. Goldstein DS, Kopin IJ. Evolution of concepts of stress. *Stress*. 2007;10(2):109-20.
3. Schwarzer R, Schulz U. Stressful life events. *Handbook of psychology*. 2003.
4. Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flugge G, Korte SM, et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(5):1291-301.
5. Janevski MR, Vujičić A, Đukić SM. Salivary Cortisol as a Biomarker of Stress in Mothers and their Low Birth Weight Infants and Sample Collecting Challenges. *J Med Biochem*. 352016. p. 118-22.
6. Shaw RJ, Bernard RS, Deblois T, Ikuta LM, Ginzburg K, Koopman C. The relationship between acute stress disorder and posttraumatic stress disorder in the neonatal intensive care unit. *Psychosomatics*. 2009;50(2):131-7.
7. Vetulani J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacol Rep*. 2013;65(6):1451-61.
8. Conde-Agudelo A, Diaz-Rossello JL. Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birthweight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(4):Cd002771.
9. Fernandez EF, Watterberg KL. Relative adrenal insufficiency in the preterm and term infant. *J Perinatol*. 2009;29 Suppl 2:S44-9.
10. Levine S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30(10):939-46.
11. Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(8):2692-701.
12. Martocchia A, Stefanelli M, Falaschi GM, Toussan L, Ferri C, Falaschi P. Recent advances in the role of cortisol and metabolic syndrome in age-related degenerative diseases. *Aging Clin Exp Res*. 2016;28(1):17-23.
13. Reynolds RM, Walker BR, Syddall HE, Andrew R, Wood PJ, Whorwood CB, et al. Altered control of cortisol secretion in adult men with low birth weight and cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(1):245-50.
14. Bensley JG, De Matteo R, Harding R, Black MJ. The effects of preterm birth and its antecedents on the cardiovascular system. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2016;95(6):652-63.

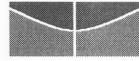
15. Guyton, A. C., & Hall, J. E. 1. Textbook of medical physiology. 11th ed. 2005. Philadelphia : New Delhi: Elsevier Saunders. 1152pp
16. Utiger RD. Adrenal gland: Encyclopædia Britannica, inc.; 2018 [updated Abril 25, 2018. Available from: <https://www.britannica.com/science/adrenal-gland>.
17. Yoshida-Hiroi M, Bradbury MJ, Eisenhofer G, Hiroi N, Vale WW, Novotny GE, et al. Chromaffin cell function and structure is impaired in corticotropin-releasing hormone receptor type 1-null mice. *Molecular Psychiatry*. 2002;7:967.
18. Meskell M. Principles of Anatomy and Physiology. *J Anat*. 2010;217(5):631.
19. Koepen B; Stanton B (eds). Berne & Levy Physiology. 2017. 7th Edition. Philadelphia,PA. Elsevier. 880pp.
20. Liu D, Ahmet A, Ward L, Krishnamoorthy P, Mandelcorn ED, Leigh R, et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;9(1):30-34.
21. Born J, Fehm H. The neuroendocrine recovery function of sleep. *Noise and Health*. 2000;2(7):25-37.
22. Gagnon N, Fréchette I, Mallet P-L, Dubé J, Houde G, Fink GD. Establishment of reference intervals for the salivary cortisol circadian cycle, by electrochemiluminescence (ECLIA), in healthy adults. *Clinical Biochemistry*. 2018;54:56-60.
23. Juruena MF, Cleare AJ, Pariante CM. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2004;26:189-201.
24. He X, Findling JW, Auchus RJ. Diagnosis and Management of Adrenal Insufficiency. In: Levine AC (ed). *Adrenal Disorders: Physiology, Pathophysiology and Treatment*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 199-215.
25. Pulopulos MM, Vanderhasselt MA, De Raedt R. Association between changes in heart rate variability during the anticipation of a stressful situation and the stress-induced cortisol response. *Psychoneuroendocrinology*. 2018;94:63-71.
26. Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2008;19(5):175-80.
27. Szeszko PR, Lehrner A, Yehuda R. Glucocorticoids and Hippocampal Structure and Function in PTSD. *Harv Rev Psychiatry*. 2018;26(3):142-57.

28. Grunau RE, Haley DW, Whitfield MF, Weinberg J, Yu W, Thiessen P. Altered Basal Cortisol Levels At 3, 6, 8 And 18 Months In Infants Born At Extremely Low Gestational Age. *The Journal of pediatrics*. 2007;150(2):151-6.
29. Grunau RE, Holsti L, Haley DW, Oberlander T, Weinberg J, Solimano A, et al. Neonatal procedural pain exposure predicts lower cortisol and behavioral reactivity in preterm infants in the NICU. *Pain*. 2005;113(3):293-300.
30. Quesada AA, Tristao RM, Pratesi R, Wolf OT. Hyper-responsiveness to acute stress, emotional problems and poorer memory in former preterm children. *Stress*. 2014;17(5):389-99.
31. Glover V. Prenatal stress and its effects on the fetus and the child: possible underlying biological mechanisms. *Adv Neurobiol*. 2015;10:269-83.
32. Graignic-Philippe R, Dayan J, Chokron S, Jacquet AY, Tordjman S. Effects of prenatal stress on fetal and child development: a critical literature review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;43:137-62.
33. Zijlmans MAC, Beijers R, Riksen-Walraven MJ, de Weerth C. Maternal late pregnancy anxiety and stress is associated with children's health: a longitudinal study. *Stress*. 2017;20(5):495-504.
34. Dreiling M, Schiffner R, Bischoff S, Rupprecht S, Kroegel N, Schubert H, et al. Impact of chronic maternal stress during early gestation on maternal-fetal stress transfer and fetal stress sensitivity in sheep. *Stress*. 2018;21(1):1-10.
35. Sandman CA. Fetal Exposure To Placental Corticotropic-Releasing Hormone (PCRH) Programs Developmental Trajectories. *Peptides*. 2015;72:145-53.
36. Li J, Chen YP, Wang ZN, Liu TB, Chen D, Dong YP, et al. A functional fetal HSD11B2[CA]_n microsatellite polymorphism is associated with maternal serum cortisol concentrations in pregnant women. *Kidney Blood Press Res*. 2013;38(1):132-41.
37. Non AL, Binder AM, Barault L, Rancourt RC, Kubzansky LD, Michels KB. DNA methylation of stress-related genes and LINE-1 repetitive elements across the healthy human placenta. *Placenta*. 2012;33(3):183-7.
38. Glover V, Bergman K, Sarkar P, O'Connor TG. Association between maternal and amniotic fluid cortisol is moderated by maternal anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(3):430-5.
39. Holmberg E, Sjöstedt J, Malinina E, Johansson M, Turkmen S, Ragagnin G, et al. Allopregnanolone involvement in feeding regulation, overeating and obesity. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2018;48:70-7.

40. Kalomiris Anne E, Kiel Elizabeth J. Mother–Toddler Cortisol Synchrony Moderates Risk of Early Internalizing Symptoms. *Infancy*. 2017;23(2):232-51.
41. Tarullo AR, St. John AM, Meyer JS. Chronic stress in the mother-infant dyad: Maternal hair cortisol, infant salivary cortisol and interactional synchrony. *Infant Behavior and Development*. 2017;47:92-102.
42. Merwin Stephanie M, Smith Victoria C, Dougherty Lea R. “It takes two”: The interaction between parenting and child temperament on parents' stress physiology. *Developmental Psychobiology*. 2015;57(3):336-48.
43. Tu MT, Grunau RE, Petrie-Thomas J, Haley DW, Weinberg J, Whitfield MF. Maternal Stress and Behavior Modulate Relationships between Neonatal Stress, Attention, and Basal Cortisol at 8 Months in Preterm Infants. *Developmental psychobiology*. 2007;49(2):150-64.
44. Saxbe Darby E, Golan O, Ostfeld-Etzion S, Hirschler-Guttenberg Y, Zagoory-Sharon O, Feldman R. HPA axis linkage in parent–child dyads: Effects of parent sex, autism spectrum diagnosis, and dyadic relationship behavior. *Developmental Psychobiology*. 2017;59(6):776-86.
45. Morelius E, Nelson N, Theodorsson E. Salivary cortisol and administration of concentrated oral glucose in newborn infants: improved detection limit and smaller sample volumes without glucose interference. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004;64(2):113-8.
46. Strahler J, Skoluda N, Kappert MB, Nater UM. Simultaneous measurement of salivary cortisol and alpha-amylase: Application and recommendations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2017;83:657-77.
47. Fedele S, Wolff A, Strietzel FP, Martin-Granizo Lopez R, Porter S, Konttinen YT. [Electrostimulation for the treatment of dry mouth]. *Harefuah*. 2010;149(2):99-103, 23.
48. Cappetta K, Beyer C, Johnson JA, Bloch MH. Meta-analysis: Risk of dry mouth with second generation antidepressants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018;84:282-93.
49. Shigeyama C, Ansai T, Awano S, Soh I, Yoshida A, Hamasaki T, et al. Salivary levels of cortisol and chromogranin A in patients with dry mouth compared with age-matched controls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(6):833-9.
50. Candia MF, Osaku EF, Leite MA, Toccolini B, Costa NL, Teixeira SN, et al. Influence of prone positioning on premature newborn infant stress assessed by means of salivary cortisol measurement: pilot study. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2014;26(2):169-75.

51. Gover A, Chau V, Miller SP, Brant R, McFadden DE, Poskitt KJ, et al. Prenatal and Postnatal Inflammation in Relation to Cortisol Levels in Preterm Infants at 18 Months Corrected Age. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2013;33(8):647-51.
52. Donzella B, Talge NM, Smith TL, Gunnar MR. To Spear or Not to Spear: Comparison of Saliva Collection Methods. *Developmental psychobiology*. 2008;50(7):714-7.
53. Herrington CJ, Olomu IN, Geller SM. Salivary cortisol as indicators of pain in preterm infants: a pilot study. *Clin Nurs Res*. 2004;13(1):53-68.
54. Stenius F, Borres M, Bottai M, Lilja G, Lindblad F, Pershagen G, et al. Salivary cortisol levels and allergy in children: the ALADDIN birth cohort. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(6):1335-9.
55. Morelius E, Brostrom EB, Westrup B, Sarman I, Ortenstrand A. The Stockholm Neonatal Family-Centered Care Study: effects on salivary cortisol in infants and their mothers. *Early Hum Dev*. 2012;88(7):575-81.
56. Hellhammer DH, Wust S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(2):163-71.
57. Sjors A, Ljung T, Jonsdottir IH. Diurnal salivary cortisol in relation to perceived stress at home and at work in healthy men and women. *Biol Psychol*. 2014;99:193-7.
58. Kane HS, Dunkel Schetter C, Glynn LM, Hobel CJ, Sandman CA. Pregnancy anxiety and prenatal cortisol trajectories. *Biol Psychol*. 2014;100:13-9.
59. Aubuchon-Endsley NL, Bublitz MH, Stroud LR. Pre-pregnancy obesity and maternal circadian cortisol regulation: Moderation by gestational weight gain. *Biol Psychol*. 2014;102:38-43.
60. Tegethoff M, Meinschmidt G, Pryce C. Effects of Intrauterine Exposure to Synthetic Glucocorticoids on Fetal, Newborn, and Infant Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Humans: A Systematic Review. *Endocrine Reviews*. 2009;30(7):753-89.
61. Kopp MS, Thege BK, Balog P, Stauder A, Salavecz G, Rózsa S, et al. Measures of stress in epidemiological research. *Journal of Psychosomatic Research*. 2010;69(2):211-25.
62. Malloy-Diniz LF, Schlottfeldt CGMF, Figueira P, Neves FS, Corrêa H. Escala de Depressão Pós-Parto de Edimburg: análise fatorial e desenvolvimento de uma versão de seis itens. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2010;32:316-8.
63. Phillips J, Charles M, Sharpe L, Matthey S. Validation of the subscales of the Edinburgh Postnatal Depression Scale in a sample of women with unsettled infants. *J Affect Disord*. 2009;118(1-3):101-12.

64. Pedreira CE, Pinto FA, Pereira SP, Costa ES. Birth weight patterns by gestational age in Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2011;83:619-25.
65. Ludmer JA, Levitan R, Gonzalez A, Kennedy J, Villani V, Masellis M, et al. DRD2 and SLC6A3 moderate impact of maternal depressive symptoms on infant cortisol. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;62:243-51.
66. Cabral DM, Antonini SR, Custodio RJ, Martinelli CE, Jr., da Silva CA. Measurement of salivary cortisol as a marker of stress in newborns in a neonatal intensive care unit. *Horm Res Paediatr*. 2013;79(6):373-8.
67. Selye H. *The physiology and pathology of exposure to stress*. Oxford, England: Acta, Inc.; 1950. xx, 822; 203-xx, 822; 203 p.
68. Merlot E, Couret D, Otten W. Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain Behav Immun*. 2008;22(1):42-51.
69. Morelius E, Nelson N, Theodorsson E. Saliva collection using cotton buds with wooden sticks: a note of caution. *Scand J Clin Lab Invest*. 2006;66(1):15-8.
70. Yao Y, Robinson AM, Zucchi FC, Robbins JC, Babenko O, Kovalchuk O, et al. Ancestral exposure to stress epigenetically programs preterm birth risk and adverse maternal and newborn outcomes. *BMC Med*. 2014;12:121.
71. Kleberg A, Hellstrom-Westas L, Widstrom AM. Mothers' perception of Newborn Individualized Developmental Care and Assessment Program (NIDCAP) as compared to conventional care. *Early Hum Dev*. 2007;83(6):403-11.
72. Buss C, Davis EP, Shahbaba B, Pruessner JC, Head K, Sandman CA. Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(20):E1312-9.

10 ANEXOS**ANEXO 1****TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **015/10**

Título do Projeto: “Desenvolvimento do sono na criança e condições clínicas associadas”.

Pesquisadora Responsável: Kelly Cristina Santos de Carvalho

Data de Entrada: 05/02/2010

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **015/10** com o título: “Desenvolvimento do sono na criança e condições clínicas associadas”, analisado na 1ª Reunião Ordinária, realizada no dia 23 de fevereiro de 2010.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 02 de março de 2010.

Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB

ANEXO 2

DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO DO AUTOR NA PESQUISA

Declaração (Orientador)

Universidade de Brasília
Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação

Nome : ROSANA MARIA TRISTAO
CPF : 41709756187
Origem : Faculdade de Medicina

Declaramos, a pedido e para os devidos fins, que o interessado acima identificado é orientador do Programa de Iniciação Científica da UnB - PIC/UnB, no edital 2012 ProIC/CNPq/FAPDF/UnB, sendo responsável pela orientação do(s) seguinte(s) aluno(s) e respectivo(s) plano(s) de trabalho:

Aluno	Plano de Trabalho	Entrada	Saída
Bruno Cesar Rodrigues do Amaral	Habituação à dor em neonatos: correlação entre parâmetros fisiológicos (SCMS) e a escala comportamental BIIP.	01/08/2012	31/07/2013
Leticia Bernardes Marçal	Habituação à dor em neonatos: medida da condutância da pele, dos níveis de cortisol salivar, e de parâmetros comportamentais da escala de dor NFCS	01/08/2012	31/07/2013
Lucas Albanaz Vargas	O impacto da cesariana nas respostas de dor em neonatos.	01/08/2012	31/07/2013
Naiara Viudes Garcia Martins	Habituação à dor em prematuros: análise multidimensional pela escala COMFORTE condutância elétrica da pele.	01/08/2012	31/07/2013
Sara da Rocha Viana	Tipo de parto e sua indicação e a relação com habituação a dor em neonatos.	01/08/2012	18/03/2014

***** Esta declaração é válida somente por 30 (trinta) dias e com autenticação da UnB *****

Autenticação



23/12/2015
Data/Hora

Rosana Maria Tristão
Assinatura/Carimbo

IstDeclaracaoOrientador

ANEXO 3

ESCALA DE EDIMBURGO



Universidade de Brasília

I. ESCALA DE EDIMBURGO¹

Como você teve há pouco um bebê nos gostaríamos de saber como você este se sentindo. Por favor, marque a resposta que mais se aproxima de como você tem se sentindo NOS ÚLTIMOS SETE DIAS, não apenas como você está se sentindo hoje. Aqui está um exemplo já preenchido:

Eu tenho me sentido feliz

Sim, o tempo todo. Sim, a maior parte do tempo. Não, Raramente. Não, nunca.

Esta resposta quer dizer: “Eu me senti feliz na maior parte do tempo na última semana”.

1. NOS ÚLTIMOS SETE DIAS Eu tenho sido capaz de rir e ver o lado engraçado das coisas

- Como eu sempre fiz
 Não tanto quanto antes
 Sem dúvida menos que antes
 De jeito nenhum

2. Eu tenho olhado para o futuro com entusiasmo

- Como sempre fiz
 Um pouco menos que antes
 Bem menos que antes
 Quase nunca

3. Eu tenho me culpado sem necessidade quando as coisas saem erradas

- Sim, a maior parte do tempo
 Sim, algumas vezes
 Raramente Não, nunca

4. Eu tenho estado ansiosa ou preocupada sem um bom motivo

- Não, de maneira alguma

Pouquíssimas vezes

Sim, algumas vezes

Sim, muitas vezes

5. Eu tenho me sentido com medo, ou muito assustada, sem grande motivo

Sim, muitas vezes

Sim, algumas vezes

Não, só raramente Não, nunca

6. Eu tenho sentido que são coisas demais se acumulando sobre mim

Sim, na maioria das vezes não tenho conseguido resolvê-las

Sim, às vezes não consigo resolvê-las como antes

Não, na maioria das vezes consigo resolvê-las sem dificuldade

Não, tenho conseguido resolver tão bem quanto antes

7. Eu tenho me sentido tão infeliz que tenho tido dificuldade para dormir

Sim, a maior parte do tempo

Sim, algumas vezes

Raramente Não, nunca

8. Eu tenho me sentido triste ou muito infeliz

Sim, a maior parte do tempo

Sim, muitas vezes

Raramente Não, nunca

9. Eu tenho me sentido tão infeliz que eu tenho chorado

Sim, quase o tempo todo

Sim, muitas vezes

De vez em quando Não, nunca

10. A idéia de fazer mal a mim mesma passou por minha cabeça

Sim, muitas vezes

Algumas vezes

Muito raramente Nunca

¹ Cox, J L., Holden, J M. & Sagovsky, R. (1987)© British Journal of Psychiatry. Tradução: Alberto Zaconeta (2004)

ANEXO 4

ESCALA DE HOLMES & RAHE



 Universidade de Brasília
II- ESCALA DE HOLMES & RAHE²

Pontuação de 300+: Risco de doença.

Pontuação de 150-299: O risco de doença é moderado. (Reduzido em 30% do risco acima)

Pontuação <150: Pouco risco de doença.

Estressores	Nº de pontos
Morte do cônjuge	100
Divórcio	73
Ser preso	63
Morte de pessoa querida da família	63
Ferimento ou doença pessoal grave	53
Casamento	50
Demissão do emprego	47
Reconciliação com cônjuge	45
Aposentadoria	45
Doença grave em pessoa da família	45
Gravidez	40
Dificuldades sexuais	39
Chegada de novo membro à família	39
Adaptação a novo emprego ou negócio	39
Alteração da situação financeira	38
Morte de amigo(a) querido(a)	37

² Holmes TH, Rahe RH (1967). "The Social Readjustment Rating Scale". *J Psychosom Res.* **11** (2): 213–8. doi:10.1016/0022-3999(67)90010-4. PMID 6059863.



Universidade de Brasília

Mudança para outra área de trabalho	36
Variação na frequência de discussões com o cônjuge	35
Dívidas	31
Mudança de responsabilidade no emprego	29
Filho(a) saindo de casa	29
Dificuldades com os sogros	29
Façanha pessoal incomum	28
Cônjuge começa ou para de trabalhar	26
Início ou término de estudo escolares	26
Alteração nas condições de vida	25
Revisão de hábitos pessoais	24
Dificuldades com o chefe	23
Mudança nas condições ou horários de trabalho	20
Mudança de escola	20
Mudança de tipo de lazer	19
Mudança de atividades sociais	18
Alteração nos hábitos de dormir	16
Alteração nos hábitos de comer	15
Férias	13
Natal	12
Transgressões (não graves) da lei	11
TOTAL:	

11 APÊNDICES

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa: **“Desenvolvimento do sono na criança e condições clínicas associadas”** que será realizada sob a coordenação de Kelly Cristina Santos de Carvalho Bonan do Hospital Universitário de Brasília e sob orientação da Profa Dra. Rosana Maria Tristão e do Prof. Dr. Dioclécio Campos Junior das Faculdades de Medicina e de Saúde da Universidade de Brasília,

Este trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento do sono de bebês por meio do exame de polissonografia e investigar se os resultados podem estar associados ao nível do cortisol salivar e ao tipo de cuidado que o bebê recebeu enquanto esteve internado na unidade de terapia intensiva.

Você receberá todos os esclarecimentos necessários antes e durante a pesquisa e lhes asseguramos que o seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo (a) ou ao seu filho(a). Você participará de um exame, que será realizado por médico especializado em estudos do sono no ambiente do Hospital Universitário de Brasília durante o Período de internação e aos seis meses de vida.

Se você concordar em participar da pesquisa, mas, por algum motivo, mudar de ideia você terá todo o direito de sair a qualquer momento sem nenhum prejuízo. Esclarecemos ainda que esse termo encontra-se redigido em duas vias: uma cópia ficará com você e outra será entregue ao pesquisador.

Os resultados da pesquisa serão divulgados no setor da saúde podendo inclusive ser publicados posteriormente em revistas científicas.

Caso você tenha alguma dúvida sobre a pesquisa, estamos à disposição para quaisquer esclarecimentos.

Local e data: _____

Nome do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Mais informações:

Unidade de Neonatologia do HUB – Telefone (061) 3448 5502

Kelly Cristina Santos de Carvalho - e-mail: kellytitina@gmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Telefone (061) 3307-3799 / e-mail: cepfs@unb.br

APÊNDICE 2

QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO E INFORMAÇÕES DO PRONTUÁRIO



Universidade de Brasília

Inicialmente gostaríamos de conhecer um pouco sobre você e sua gravidez

Idade: _____.

1. Estado civil:

() Solteira () Casada () Separada () Viúva () Vive junto com o pai da criança
gravidez

2. Renda familiar:

() Até um salário mínimo [até R\$ 622,00]
() De um a três salários mínimos [de R\$ 622,00 a R\$ 1.866,00] () De três a seis salários mínimos [de R\$ 1.867,00 a R\$ 3.732,00] () Mais de seis salários mínimos [de R\$ 3.733,00]

3. Escolaridade:

Quantos anos de educação formal (ensino fundamental, médio e superior): _____

4. Características da habitação:

() Água encanada () Rede de esgoto
() Coleta de lixo

5. Número de Pessoas que moram na casa: _____

6. De 1 a 4 quanto a gravidez foi planejada (1- não foi planejada; 2- pouco planejada; 3- planejada; 4- muito planejada)?

() 1 () 2 () 3 () 4

7. De 1 a 4 quanto a gravidez foi desejada (1- não foi desejada; 2- pouco desejada; 3- desejada; 4- muito desejada)?

() 1 () 2 () 3 () 4

8. Quando você começou a realizar o acompanhamento pré-natal?

() 1º trimestre () 2º trimestre () 3º trimestre () Não realizei exames pré-natais

9. Já sofreu algum aborto?

() Não () Sim.
Quantos? _____

10. O pai da criança esteve ao seu lado durante o período da gestação?

() Não () Sim

11. Como o pai da criança reagiu a gravidez?

() Ficou muito feliz () Ficou surpreso
() "indiferente" () Rejeitou () Não sabe

12. Qual tipo de parto foi realizado?

() Parto Cesárea () Parto de Cócoras
() Parto Fórceps () Parto Humanizado

13. Houve alguma complicação no trabalho de parto?

() Não () Sim.
Qual? _____

Informações do parto

Nome da mãe: _____

Data do parto: _____

Idade: _____

Telefone: _____

Endereço: _____

Qual o sexo do seu bebê?

() Masculino () Feminino

Tamanho do bebê: (cm): _____

Peso do bebê: (g): _____

Perímetro cefálico do bebê: (cm): _____

APGAR 1' e 5': _____

Duração da gestação (sem): _____

Classificação da idade gest. (Pré-termo/ termo / pós-termo): _____

Classificação do peso: _____

Classificação quanto idade gest. (PIG / AIG / GIG): _____

Número de consultas pré-natal: _____

APÊNDICE 3

ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Stress



Edited by James P. Herman

ISSN 1075-5470
ISSN 1075-5488



Maternal stress and neonatal clinical state are correlated with high cortisol levels and low salivary volume in neonates

Journal:	<i>Stress</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Vargas, Lucas; Universidade de Brasilia, Department of Children and Adolescent Tristao, Rosana; School of Medicine, University of Brasilia, Jesus, José; Universidade de Brasilia, School of Medicine Castro, Luiz; Universidade de Brasilia, Department of Children and Adolescent
Keywords:	salivary cortisol, neonates, stress, maternal depression, HPA axis, salivary volume

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Maternal stress and neonatal clinical state are correlated with high cortisol levels and low salivary volume in neonates

Lucas Albanaz Vargas

– Postgraduate program in Medical Sciences. University of Brasilia School of Medicine. Brasília, DF – Brazil.

Rosana Maria Tristão

– Department of Pediatrics. Postgraduate Program in Medical Sciences. University of Brasilia School of Medicine. Brasília, DF – Brazil.

José Alfredo Lacerda de Jesus

– Department of Pediatrics. Postgraduate Program in Medical Sciences. University of Brasilia School of Medicine. Brasília, DF – Brazil.

Luiz Claudio Gonçalves de Castro

– Department of Pediatrics. Postgraduate Program in Medical Sciences. University of Brasilia School of Medicine. Brasília, DF – Brazil.

Corresponding author

Lucas Albanaz Vargas

Address: SCRN 702/703 Block F Enter 10 Apartment 201 – Asa Norte – Brasília-DF.
Brazil – 70720-660

Phone: +55(61)998561415

e-mail: albanazvargas@gmail.com

Maternal stress and neonatal clinical state are correlated with high cortisol levels and low salivary volume in neonates

ABSTRACT

Although the dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis has been well described in individuals exposed to life threatening events, studies in this area are scarce in the neonatal period. The aims of this study were: to investigate the influence of maternal stressful factors on the HPA axis of mothers and offspring, and the correlation between stressful events experienced by neonates and their salivary volume. For this purpose, salivary cortisol (SC) was collected from 33 full-term and 18 premature neonates and their mothers, being the multiple swabs method also tested for some of the neonates. Maternal stress history was inventoried through validated questionnaires. Maternal SC levels significantly predicted their neonates' SC levels ($R=0.56$, $R^2=0.32$, $p=0.000$), which were also impacted by prenatal maternal distress, postnatal maternal depressive symptoms and by the number of painful events experienced by the neonate. No difference in SC levels was found between full-term and premature neonates. Lower offspring' salivary volume was correlated with higher maternal stress levels, depressive state and glucocorticoid use during pregnancy. Our data pointed out that maternal stress and emotional state and the neonatal clinical state were correlated with both the neonates' SC levels and their salivary volume.

Key words: salivary cortisol; neonates; stress; maternal depression; HPA axis; salivary volume.

Introduction

In some instances, stressful environmental factors may impair hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis physiology and compromise the global development of children (Graignic-Philippe et al., 2014). Altered HPA axis has been described in children from orphanages, in at risk homes and among those exposed to abuse, neglect, undernutrition or maternal postpartum depression (Glover, 2015; Grunau et al. 2007; Tu et al., 2007). In a previous study of our group, it was reported long-term consequences of stressful events on the HPA axis, on the emotional drive and on memory of children who were born preterm (Quesada et al., 2014). Nevertheless, the physiology and pathophysiology of the HPA axis during the first days of life are still poorly understood. Currently, few studies have focused on understanding the stress disorders among in-patient mother-neonate dyads and the long-term consequences of early stressful events on the immature brain.

Measuring salivary cortisol (SC) levels has been used as a non-invasive and reliable method for assessing cortisol levels in neonates and older children in different scenarios (Hunter et al, 2011; Cabral

et al, 2013). Nevertheless, collecting saliva in neonates is a challenge and it can have some limitations. Neonates produce small amounts of saliva, possibly due to immature salivary glands. This phenomenon of dry-mouth has also been reported during acute mental stress, but it has been investigated with limited success and still lacks more studies (Fedele et al., 2010). Oral dryness and hypercortisolism as stress markers are also reported in elderly patients indicating a potential role of salivary gland hypofunction (Hugo et al., 2008; Shigeyama et al., 2008). Oral swabs are the most common tool for collecting saliva. Suctioning saliva using a syringe, a plastic feeding tube or a suction catheter attached to a syringe (Cândia et al., 2014) are invasive methods and present risk of damaging the delicate mucous membranes resulting in contamination with blood (Gover et al., 2013). Using devices as dental cotton roll placed in the mouth (Grunauet al., 2007; Tuet al., 2007) has been criticized once only in 54% of the cases it achieves the needed amount (Herrington et al., 2014). Ng et al (2013) obtained saliva from 65 premature neonates (PR) by placing one swab at a time in the neonate's mouth for 1–2 min, enhancing the amount of saliva collected to at least 100 µL in 85% of the sample. Beyond those factors, there is a current diversity of parameters for cortisol measurement, which prevents comparison among studies (e.g., different period of the day for collection or different units of measurement as nmol/L or µg/dL). For instance, Stenius et al. (2011) found SC levels of 11.7 nmol/L in the morning, 5.1 nmol/L in the afternoon and 2.9 nmol/L by night in 203 six-month-old infants. Mörelius et al. (2012) found in a cohort of 289 neonates, at 36 weeks of postmenstrual age at the time of saliva collection, a mean cortisol reactivity of 0.02 nmol/L. Tu et al. (2007) found in 103 PR older than 32 weeks of gestational age a mean SC level of 0.20 µg/dL compared to 0.30 µg/dL from 22 full-term neonates (FT), for low parenting stress condition, and 0.20 µg/dL for both PR and FT neonates for high parenting stress condition.

It is well described that stressors impairing HPA axis balance in children may have biological origin, such as prematurity, birth weight, birth complications, number of experienced nociceptive events, and/or environmental origin, as previous stressing maternal history, emotional state after delivery and socio-economic level.

So, the aims of this study were: (1) to analyse the basal SC levels of dyads mother-neonate and its correlation to biological and environmental stressors; and (2) to investigate the correlation between salivary volume and stressful events experienced by neonates.

Methods

Study design and participants

This was a comparative cross-sectional exploratory study.

The sample was divided into two groups: FT and PR neonate-mother dyads. Originally, 37 healthy FT neonates composed the sample, evaluated near their 48th hour of life, being 22 females, and gestational ages were between 37 and 40 weeks. The PR group was composed by 21 neonates, 6 females, gestational ages between 30 and 36 weeks, clinically stable and evaluated at a postnatal age between seven and fifteen days. They were recruited by convenience at the Neonatology Unit of the University Hospital of Brasilia, Brazil. Neonates were excluded if their mothers received prolonged treatment with corticosteroids during pregnancy, except neonates whose mothers received antenatal corticosteroids for lung maturation in a maximum dose of 24 mg of betamethasone; those with 3rd or 4th degrees intracranial haemorrhage according to the classification of Papile et al. (1978); chromosomal or congenital malformations or cardiac abnormalities; as well as those with pulmonary, gastrointestinal and neurological disorders.

This study was approved by the University of Brasilia School of Healthy Sciences Research Ethics Committee, which was carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and informed consent was obtained from mothers.

Maternal and neonate stress measures

After provided written informed consent, the mothers were asked to fill out protocols for investigation of sociodemographic and history of stressful events.

To screen maternal prenatal stress, for each participant, the Holmes & Rahe scale (1967) was administered. This is a validated and reliable instrument largely used in stress studies since the decade of 1960 (Rahe and Tolles, 2002; Quesada et al., 2014). Regarding its impact on life, it is attributed a specific value to each stressor and the final score is classified into three categories: no stress (≤ 150

points); moderate level (151 to 299 points); high level (≥ 300 points). For the assessment of maternal postpartum depression it was applied the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS), analysing separately factors of anxiety and depression, besides the total score of maternal depression (Malloy-Diniz et al., 2010; Phillips et al., 2009). Socioeconomic status considered the indicators of maternal education, marital status and family income profile.

Clinical data from neonates were taken from their medical records: gestational age at birth, the use of antenatal steroids for lung maturation, type of delivery, gender, Apgar score in the 1st and 5th minutes of life, the need for resuscitation procedures in the delivery room, weight and cephalic perimeter at birth, and the anthropometric classification as small, adequate or large for gestational age.

Categorical variables were classified as dual when response was gender (male, female) and type of delivery (vaginal, caesarean section), and the others were dichotomously coded as “yes” or “no” as use of analgesia during labor, glucocorticoids during pregnancy, fetal distress, resuscitation procedures at birth, corticosteroid use. History of maternal smoking was categorized a dummy coded variable (yes or no) as it was observed that mothers avoided to report the real number of daily cigars smoked. The number of potentially invasive and painful events (e.g., airway aspiration, intubation, and nasogastric probe pray, surgery, central catheter, umbilical catheterization, arterial puncture and venepuncture) to the neonate during hospitalization at the neonatal period was used to measure neonate’s postnatal stress and the sum of all painful events were called the Nociceptive Event Index (NEI).

Maternal and neonate salivary cortisol sampling

Trained examiners collected saliva samples from neonates using universal cotton swabs (Absorb™, Brazil) and the mothers received information and specific training for self-collection. Both mother and offspring had their saliva collected at the same moment. The swab was kept inside the mouth, with the neonate lying sideways, preferably between the jaw line and the inner cheek at the side. The neonate’s position was meant to facilitate saliva to drip down. Saliva was collected in the early afternoon around 14 o’clock for all participants, at least one hour after food ingestion and mouth cleaning, brushing teeth for mothers and wash cloth with water for neonates, to avoid contamination for milk or food residues. Neonates with low flux of saliva had their saliva collected by a second or third swab in maximum intervals of 20 minutes, or less if the saliva was observed in their mouth, to allow renewed flux. To preserve the neonate's comfort, it was kept inside the mouth for a minimum time of 5 minutes and maximum of 20 minutes. The multiple swabs of each neonate were stored together and analysed at the Interdisciplinary Biosciences Laboratory from the University of Brasilia School of Medicine.

After being collected, samples were centrifuged at 3.000 rpm for 5 min at a temperature of 8°C and then stored at -20°C until sample processing. For measuring SC Salivary Cortisol, it was used a specific competitive enzyme immunoassay kit (Salimetrics™, State College, USA - code 1-3002). In this competitive assay, a 96-well microtiter plate coated with monoclonal antibodies to cortisol and cortisol labelled with horseradish peroxidase linked to this antibody were initially present. When the saliva sample was ready, controls or reference standards were added to the kit plate, competing with cortisol linked to horseradish peroxidase, displacing the antibody and affecting its binding to this antibody. After incubation, unbound components were removed by washing and bound cortisol peroxidase was measured by reaction to the peroxidase enzyme on tetramethylbenzidine substrate (TMB). This reaction produced a blue colour, which in the presence of the stop solution (sulfuric acid 0.1N), changed the colour to yellow. The Optical Density (OD) obtained was used to measure the amount of detected cortisol bound to peroxidase. The intensity of the colour was inversely proportional to the amount of cortisol present in the sample. To determine the concentrations of samples and controls by interpolation, we used a non-linear regression curve and the OD values patterns of kit reference. The curve was calculated using the GraphPad PRISM ® version 5.0 software (La Jolla, USA).

To perform the cortisol dosage, samples were initially thawed, and all reagents were kept at room temperature. The wash buffer from the kit was prepared (100 mL of wash buffer to 900 mL of distilled water). Then 25 μ L: each of standards containing 3.0, 1.0, 0.333, 0.111, 0.037 and 0.012 mg/dL of cortisol, the two positive controls low and high, and each sample of saliva was distributed into the wells of the microtiter plate 96 wells. In the next step 25 μ L of sample diluent was added to each well, and then 200 μ L of the labelled cortisol conjugate containing peroxides and horseradish peroxidase (1:1.600) was added. Incubation was performed 55 minutes at room temperature. After this time has elapsed, the plate was washed four times with 300 μ L of wash buffer per well at each time. Subsequently,

was added 200 μL of TMB to each well and the plate was incubated for 25 minutes in the dark at room temperature. Then it was added 50 μL of stop solution to each well and the plates were read within a ten-minute-maximum interval after the addition of reagent. To samples minor than 5 μL , defined as the minimum amount to allow the analyses throughout ELISA kits, we added 25 μL of pure H_2O until the minimum required by the kit in an exploratory modelling. No triplicate was possible in those cases.

Statistical analyses

For comparison between PR and FT neonate-mother dyad groups the clinical characteristics were compared using Mann-Whitney U-test for continuous variables and chi-square χ^2 test for categorical variables. With respect to the effect of clinical and demographic variables over basal SC levels, it was run the General Linear Model, a multivariate analysis of covariance (MANCOVA) with group of neonates as main factor. Bivariate Spearman correlation and partial correlation with “group” as factor were used to investigate the relationship between demographic and clinical variables and also to assess the relationship between variables related to maternal stress and neonate’ SC levels. The confidence interval adjustment was done using Bonferroni test. Multiple Linear Regression analyses searched for the impact of the maternal stress and relevant variables over neonate’s salivary cortisol. Data were corrected being equal variances not assumed to variables that did not attend the assumptions of the test of Kolmogorov-Smirnov Z ($p < 0.05$) and Levene Test for homogeneity of variances. Tests for the null hypothesis pointed that the error variance of the dependent variables were equal across groups.

The minimum sample size was calculated at 26, allowing an alpha error of 5% and a beta error of 20%, pair a statistical power of 80%. Analyses were performed using SPSS version 21.0 (IBM) program.

Results

Thirty-seven FT and 21 PR neonate-mother dyads composed the original sample. Four neonates from each group could not have their saliva collected due to excessive dry-mouth and their data were excluded. The demographic and clinical data from the final 33 FT and 18 PR neonates are shown in Table 1.

The groups differed (Mann-Whitney U-test test for continuous variables and χ^2 test for categorical variables – Table 1) in gestational age, gender, length and weight, head circumference, Apgar 5th minute, reanimation at birth, fetal distress, antenatal corticosteroid, number of nociceptive events experienced by neonates and maternal education. Since 59.5% of mothers preferred not to declare ethnicity, this variable was excluded from the analyses.

Effect of group and covariates over maternal and neonate salivary cortisol levels

FT and PR groups did not differ for basal SC levels and salivary volume, neither neonates nor their mothers (Table 2). There was no correlation between the volume of saliva and concentration of SC in neonates, as analysed by partial correlation controlled by group ($r = .26$, $p = .709$), neither for mothers ($r = -.90$, $p = .104$). A MANCOVA was run to analyse the effect of independent variable group (FT vs. PR), clinical and demographic co-variables on maternal and neonate cortisol levels. Neonates’ SC levels presented a correlation with the NEI ($F = 11.834$, $p = .0041$). The level of maternal stress during pregnancy ($F = 4.412$, $p = 0.060$) and the level of maternal SC ($F = 3.333$, $p = 0.079$) showed marginal effect on neonate’s SC. None other variables showed significant effect on the neonate’s SC levels.

The maternal score at the self-report inventories for stress and emotional states did not show significant difference between groups (Table 2). When the pregnancy stress scale scores of moderate and high stress levels were collapsed into a level called “stress” vs “no stress” in a dummy yes/no new variable, it was observed an increased number of mothers in stress condition: 40% (n: 13) at the FT group and 44.4% (n: 8) at PR group, even though the groups still did not differ ($\chi^2 = 0.375$, $p = 0.540$). As no difference was found between groups for the studied variables, the subsequent analyses were performed using the sample categorized by maternal gestational stress vs. no stress condition based on Holmes-Rahe stress scale scores. In table 3 it is shown the results for main stress indicators, according to stress vs. no stress condition for maternal stress scale score, SC and saliva values for mothers and neonates.

Whole sample analyses of maternal and neonate related stress factors

The linear regression analyses showed that maternal SC levels significantly predicted the neonate SC levels ($R = 0.56$, $R^2 = 0.32$, $p = 0.000$), showed in figure 1a. The dummy variable for maternal stress (for moderate and extreme maternal stress) correlated positively with neonates' levels of SC ($r = 0.37$, $p = 0.036$) and negatively with neonates' volume of saliva ($r = -0.44$, $p = 0.046$). The stress vs. no stress condition of mothers during pregnancy was used as a factor in the T-test for independent samples, searching for its effect on stress indicators. A significant effect was found only on the salivary volume of neonates, $p = 0.046$ (Table 3). Nevertheless, no significant prediction was found between SC and salivary volume in neonates ($R = 0.180$, $R^2 = 0.032$, $p = 0.332$) (Figure 1b). The neonates' salivary volume was strongly and negatively correlated with corticoid use during gestational period ($r = -0.991$, $p = 0.000$).

There was a wide maternal age range, from teenagers to over 35-year-old women. So, a MANCOVA was run to evaluate maternal data, including maternal age as a random factor. Also, neonate's covariates of weight of birth and gestational age were evaluated with mother's covariates of marital state and emotional state measures (Table 3). Neither the mother's age nor none of the covariates had significant effects on basal maternal cortisol levels.

Multiple regression analyses were run to predict the effect of number of nociceptive events experienced by the neonates, maternal depression and anxiety levels during pregnancy and mother's age on neonate's SC levels. Those variables predicted the neonates' SC levels, $F(4,4) = 7.372$, $p = 0.039$, $R^2 = 0.881$, being the number of nociceptive events the variable that contributed more significantly to that prediction, $p = 0.015$.

Discussion

In our study, the dyads of both studied groups, mother-premature and mother-full term neonates, did not differ regarding maternal emotional factors, gestational stress or basal SC levels. It is important to remark that this study did not explore the reaction of mother-neonate dyads to a stress test, but we did look for the basal SC level exploring their sympathetic nervous system continuous function.

Although higher absolute values of basal SC were found among the mother-premature dyads, they also presented higher variability and no significant difference with FT group was found. To the whole sample analyses, it was found an influence of previous maternal stress on the basal SC level of the neonate, including number of experienced nociceptive events and score of mothers' depression factors. The multivariate analysis for demographic and clinical parameters comparing the two groups of dyads did not show significant effect on the investigated stress indicators. One possible explanation to the lack of difference between groups of neonates' SC levels may lay on the fact that the cortisol level decays after birth throughout postnatal days, as demonstrated by Cabral et al. (2013), who investigated critically ill premature and healthy neonates at the 2nd, 9th and 14th days of life. In our sample, the saliva of FT neonates was collected near at the 48th hour of life, while the saliva of PR group was collected around one week of life. Hence, as we did not find differences between groups, it should be necessary a further study focused on the effect of pregnancy maternal stress and postpartum emotional indicators on the basal SC for the FT and PR dyads collecting samples within the same period of life.

One important finding of this study was that the maternal SC levels predicted the neonate's SC level despite gestational age or days of life, as demonstrated in Figure 1a. The higher maternal SC levels were inversely correlated with lower saliva volume in both mothers and neonates. The correlation between maternal reactivity to stress during pregnancy and/or depressive symptoms and neonate's emotional regulation has been explored by other authors using SC (Graicnic-Philippe et al., 2014), though most of them reported such correlation for children at different ages from our study, e.g. 10 days of life by Bolten et al., 2013; 16 month-old by Ludmer et al., 2015, 2, 9 and 14 day-old by Cabral et al., 2013.

In this paper, we also studied the effect of maternal depressive state and gestational stress on the volume of saliva, demonstrating that the higher these factors were, the lower was the salivary volume. Specifically, depressive symptoms in mothers implied in their own lower salivary volume, while maternal gestational stress was correlated with lower neonate salivary volume.

The variable NEI, together with score of the depression factors, maternal stress level during pregnancy and maternal age, studied through multiple regression analyses, explained 88% of the neonates' basal SC variance. This effect has been pointed out at the literature as experience-dependent

development (Fitzgerald, 2012). The sequelae from early nociceptive experiences may potentially bring damages in stress responses in subsequent periods of life, such as impaired response to pain, as the repeated painful exposures may be associated with a down-regulation of the HPA axis, and with a lower cortisol response to stress, which in future can even promote unresponsiveness to morphine (Grunau et al., 2005; Hoppenbrouwers et al., 2005). In our sample, the neonates with higher levels of SC had also higher NEI. We can speculate that neonates who had more clinical complications and experienced more invasive procedures could achieve higher levels of exhaustion, as proposed by Grollman (1950) as part of the "general adaptation syndrome", in which the body becomes much more fragile and unresponsive to the expected psychological and immune responses to biological and environmental stressors. An exhausted neonate may become more prone to frequent illness, less reactive to stressful events, and more vulnerable to metabolic turndown for all systems, which represent consequences of altered body mechanisms, including lower SC levels (Merlot et al., 2008).

Regarding the salivary volume, a more complex scenario was found in this study, demonstrating that even healthy FT neonates can present high distress levels affecting it. Collecting and analysing small volumes of saliva in neonates was accomplished, as the measurement of SC was adapted to too small neonates' volumes of saliva. In our sample, some neonates produced values under 5 μL of saliva for both groups, showing that small amounts are not necessarily just due to gestational age, but to other factors as maternal stress and corticosteroid use during gestational period. We also found that even lower amounts of corticosteroids received by pregnant women (up to 24 mg of betamethasone for the neonate's lung maturation) can reduce the neonate's salivary volume.

In this work we worked with two previous published methods for collecting saliva and SC in neonates with multiples swabs (Mörelis et al., 2004 and 2006; Gover et al., 2013) and adjusted the laboratory routine (Mörelis et al., 2004) for saliva analyses. We replicated the findings of the SC levels from Tu et al. (2007) in an average of 0.20 $\mu\text{g}/\text{dL}$ for PR comparing to 0.30 $\mu\text{g}/\text{dL}$ of FT, for low parenting stress condition. We did not achieve the same success of Gover et al (2013) in size of the sample, as only 67% of our PR sample could be analysed, despite using similar process for collecting saliva and working with amounts lower than 5 μL . They obtained 50–350 μL of saliva in 85% of a premature sample. It may have happened because we only collected three swabs in one-hour-maximum period, attempting to not extend the time of procedure, which could be another confounding variable. However, as Mörelis et al. (2004 and 2012), we also achieved 86% considering both groups of the sample with success in collecting saliva and replicating the obtained volume. Mörelis et al. (2004) managed two ways to provide more saliva material for ELISA analyses: they decreased incubation temperature while also extending the incubation time and diluting the ingredients. Antiserum was diluted in the ratio 1:40 (instead of 1:20), the radio ligand was diluted until 100 μL , representing 3.000 counts per minute (CPM). We followed the strategy of diluting the saliva samples until the minimum required by the ELISA kit to the samples.

Results from this study also open possibilities for further approaches in medium- and long-term follow-up of those neonates. The possibility of maternal gestational and perinatal stress having definitive role on reorganization of noradrenergic circuit, current lines of investigation focus on early-life HPA impairment driving epigenetic impact throughout life, in the neonates' and in their offspring's metabolism. The transgenerational impact of maternal exposition to emotional and physical continued suffering during pregnancy has been investigated in several animal models which report late effect up to three generations of rats whose first dam was exposed to stress at the end of pregnancy (Yao et al., 2014). The first and following generations showed gradually reduced gestational length, maternal weight gain, behavioural activity, increased blood glucose levels besides reduced offspring growth and delayed behavioural development. It was proposed an epigenetic factor operating on miRNA-mediated stress adaptation axis which was supposed to be driven through an interplay between both the induction of a miRNA (rnomiR-466b-1-3p) and suppression of the expression of other three miRNAs (rno-miR-145-3p, rno-miR-24-1-5p and rno-miR-375) at the frontal cortex.

There are some limitations from this study: the wide range of gestational age of the neonates, the sample size, the SC collecting period being performed at different time of life between FT and PR, the gender effect and the lack of a behavioural measure of stress regarding the neonates. Those parameters may have impacted part of our results, although not unstrengthening their contribution.

A possible explanation for the lack of difference in SC levels among PR and FT neonates in our study, compared with other studies, may also be due to the fact that our sample did not include extreme

PR neonates, who are born in the late second or early third trimester of pregnancy, during which the cerebral cortex and subcortical network are immature and neuronal organization of the frontal lobe has not yet occurred (Kleberg et al., 2007). A previous study found difference in cortisol levels between PR and FT born children included those born from 26 gestational weeks (Quesada et al., 2014) while our study was limited to PR born from 30 gestational weeks.

Another characteristic of our study was the major presence of male newborns in the entire sample, achieving 70% in the PR group. There is a known different response and balance in the HPA axis between males and females. It is expected a stronger effect on the girls' cortisol biology after maternal stress since they present larger right amygdala, which is associated with a potential increase in cortisol and higher maternal cortisol levels in earlier gestational period, (Buss et al., 2012; Quesada et al., 2014). Thus, future studies are expected to better control this gender effect.

Conclusion

This study showed that maternal stress and emotional state and the neonatal clinical state were correlated with both the neonates' SC levels and their salivary volume, independent of gestational age. Lower neonatal salivary volume was also correlated with glucocorticoid use during pregnancy. Hence, our data points to a stronger effect on neonatal SC levels and salivary volume coming from environmental stressors. It also contributes with data corroborating that neonates with small volumes of saliva may have their SC levels adequately evaluated using the multiple swabs strategy.

Financial disclosures

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the study.

Funding source

This research was funded by the Interdisciplinary Bioscience Laboratory from the University of Brasilia School of Medicine. The funders had no involvement in study design, in the collection and clinical interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the article for publication.

Contributors

All authors have approved the final article.

All authors made substantial contributions to all of the following:

- (1) The conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data.
- (2) Drafting the article or revising it critically for important intellectual content.
- (3) Final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

This research received the support for salivary cortisol collection and analyses of Brena Bardonasci, Vanessa Caroline Martins, Bruno César Rodrigues do Amaral, Tatiana Santos, Teresa Cristina Cardoso Tristão. The measurement of salivary cortisol was also supported by the Interdisciplinary Bioscience Research Laboratory from the University of Brasilia School of Medicine.

References

- Bolten, M., Nast, I., Skrundz, M., Stadler, C., Hellhammer, D. H., & Meinlschmidt, G. (2013). Prenatal programming of emotion regulation: Neonatal reactivity as a differential susceptibility factor moderating the outcome of prenatal cortisol levels. *Journal of Psychosomatic Research*, 75(4), 351-357. doi:10.1016/j.jpsychores.2013.04.014
- Buss, C., Davis, E. P., Shahbaba, B., Pruessner, J. C., Head, K., & Sandman, C. A. (2012). Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20). doi:10.1073/pnas.1201295109

- Cabral, D. M., Antonini, S. R., Custódio, R. J., Martinelli, C. E., & Silva, C. A. (2013). Measurement of Salivary Cortisol as a Marker of Stress in Newborns in a Neonatal Intensive Care Unit. *Hormone Research in Paediatrics*, *79*(6), 373-378. doi:10.1159/000351942
- Cândia, M. F., Osaku, E. F., Leite, M. A., Toccolini, B., Costa, N. L., Teixeira, S. N., . . . Osaku, N. O. (2014). Influence of prone positioning on premature newborn infant stress assessed by means of salivary cortisol measurement: Pilot study. *Revista Brasileira De Terapia Intensiva*, *26*(2). doi:10.5935/0103-507x.20140025
- Donzella, B., Talge, N. M., Smith, T. L., & Gunnar, M. R. (2008). To spear or not to spear: Comparison of saliva collection methods. *Developmental Psychobiology*, *50*(7), 714-717. doi:10.1002/dev.20340
- Fitzgerald, M., 2012. The Biological basis of pain in neonates and children, in: Tracey, I. (Ed.), IASP: Refresher Courses on Pain Management. IASP: Milan, pp. 391-399.
- Glover, V. (2014). Prenatal Stress and Its Effects on the Fetus and the Child: Possible Underlying Biological Mechanisms. *Perinatal Programming of Neurodevelopment Advances in Neurobiology*, 269-283. doi:10.1007/978-1-4939-1372-5_13
- Graignic-Philippe, R., Dayan, J., Chokron, S., Jacquet, A., & Tordjman, S. (2014). Effects of prenatal stress on fetal and child development: A critical literature review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *43*, 137-162. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.03.022
- Grollman, A. (1951). The Physiology and Pathology of Exposure to Stress. Hans Selye. Montreal, Canada: Acta Endocrinologica, 1950. 1,025 pp. \$14.00. *Science*, *113*(2938), 462-463. doi:10.1126/science.113.2938.462-a
- Grunau, R. E., Haley, D. W., Whitfield, M. F., Weinberg, J., Yu, W., & Thiessen, P. (2007). Altered Basal Cortisol Levels at 3, 6, 8 and 18 Months in Infants Born at Extremely Low Gestational Age. *The Journal of Pediatrics*, *150*(2), 151-156. doi:10.1016/j.jpeds.2006.10.053
- Grunau, R. E., Holsti, L., Haley, D. W., Oberlander, T., Weinberg, J., Solimano, A., . . . Yu, W. (2005). Neonatal procedural pain exposure predicts lower cortisol and behavioral reactivity in preterm infants in the NICU. *Pain*, *113*(3), 293-300. doi:10.1016/j.pain.2004.10.020
- Gover, A., Chau, V., Miller, S. P., Brant, R., McFadden, D. E., Poskitt, K. J., . . . Grunau, R. E. (2013). Prenatal and postnatal inflammation in relation to cortisol levels in preterm infants at 18 months corrected age. *Journal Of Perinatology*, *33*, 647. <https://doi.org/10.1038/jp.2013.24>. doi:10.1038/jp.2013.24
- Herrington, C. J., Olomu, I. N., & Geller, S. M. (2004). Salivary Cortisol As Indicators of Pain in Preterm Infants. *Clinical Nursing Research*, *13*(1), 53-68. doi:10.1177/1054773803259665
- Holmes, T. H., & Rahe, R. H. (1967). The Social Readjustment Rating Scale. *Journal of Psychosomatic Research*, *11*(2), 213-218.
- Hoppenbrouwers, T., Hodgman, J. E., Rybine, D., Fabrikant, G., Corwin, M., Crowell, D., & Weese-Mayer, D. E. (2005). Sleep Architecture in Term and Preterm Infants Beyond the Neonatal Period: The Influence of Gestational Age, Steroids, and Ventilatory Support. *Sleep*, *28*(11), 1428-1436. doi:10.1093/sleep/28.11.1428
- Hugo, F. N., Hilgert, J. B., Corso, S., Padilha, D. M., Bozzetti, M. C., Bandeira, D. R., . . . Gonçalves, T. R. (2008). Association of chronic stress, depression symptoms and cortisol with low saliva flow in a sample of south-Brazilians aged 50 years and older. *Gerodontology*, *25*(1), 18-25. doi:10.1111/j.1741-2358.2007.00188.x
- Hunter, A. L., Minnis, H., & Wilson, P. (2011). Altered stress responses in children exposed to early adversity: A systematic review of salivary cortisol studies. *Stress*, *14*(6), 614-626. doi:10.3109/10253890.2011.577848
- Kleberg, A., Hellström-Westas, L., & Widström, A. (2007). Mothers' perception of Newborn Individualized Developmental Care and Assessment Program (NIDCAP) as compared to conventional care. *Early Human Development*, *83*(6), 403-411. doi:10.1016/j.earlhumdev.2006.05.024
- Ludmer, J. A., Levitan, R., Gonzalez, A., Kennedy, J., Villani, V., Masellis, M., . . . Atkinson, L. (2015). DRD2 and SLC6A3 moderate impact of maternal depressive symptoms on infant cortisol. *Psychoneuroendocrinology*, *62*, 243-251. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.08.026
- Malloy-Diniz, Leandro Fernandes, Schlottfeldt, Carlos Guilherme Maciel Furtado, Figueira, Patricia, Neves, Fernando Silva, & Corrêa, Humberto. (2010). Escala de Depressão Pós-Parto de

- Edimburg: análise fatorial e desenvolvimento de uma versão de seis itens. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 32(3), 316-318. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462010000300018>
- Merlot, E., Couret, D., & Otten, W. (2008). Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(1), 42-51. doi:10.1016/j.bbi.2007.05.007
- Mörelus, E., Broström, E. B., Westrup, B., Sarman, I., & Örténstrand, A. (2012). The Stockholm Neonatal Family-Centered Care Study: Effects on salivary cortisol in infants and their mothers. *Early Human Development*, 88(7), 575-581. doi:10.1016/j.earlhumdev.2011.12.033
- Morelius, E., Nelson, N., & Theodorsson, E. (2004). Salivary cortisol and administration of concentrated oral glucose in newborn infants: Improved detection limit and smaller sample volumes without glucose interference. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 64(2), 113-118. doi:10.1080/00365510410004452
- Mörelus, E., Nelson, N., & Theodorsson, E. (2006). Saliva collection using cotton buds with wooden sticks: A note of caution. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 66(1), 15-18. doi:10.1080/00365510500402166
- Papile, L., Burstein, J., Burstein, R., Koffier, A., 1978. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage in premature neonates: a study of neonates < 1500gms. *The Journal of Pediatrics* 92, 529-534. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(78\)80282-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(78)80282-0)
- Phillips, J., Charles, M., Sharpe, L., & Matthey, S. (2009). Validation of the subscales of the Edinburgh Postnatal Depression Scale in a sample of women with unsettled infants. *Journal of Affective Disorders*, 118(1-3), 101-112. doi:10.1016/j.jad.2009.02.004
- Quesada, A. A., Tristão, R. M., Pratesi, R., & Wolf, O. T. (2014). Hyper-responsiveness to acute stress, emotional problems and poorer memory in former preterm children. *Stress*, 17(5), 389-399. doi:10.3109/10253890.2014.949667
- Rahe, R.H., Tolles, R.L., 2002. The Brief Stress and Coping Inventory: A useful stress management instrument, *International Journal of Stress Management*. 9, 61-70. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1014950618756>
- Shigeyama, C., Ansai, T., Awano, S., Soh, I., Yoshida, A., Hamasaki, T., . . . Takehara, T. (2008). Salivary levels of cortisol and chromogranin A in patients with dry mouth compared with age-matched controls. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 106(6), 833-839. doi:10.1016/j.tripleo.2008.07.005
- Sjörs, A., Ljung, T., & Jonsdottir, I. H. (2014). Diurnal salivary cortisol in relation to perceived stress at home and at work in healthy men and women. *Biological Psychology*, 99, 193-197. doi:10.1016/j.biopsycho.2014.04.002
- Stenius, F., Borres, M., Bottai, M., Lilja, G., Lindblad, F., Pershagen, G., . . . Alm, J. (2011). Salivary cortisol levels and allergy in children: The ALADDIN birth cohort. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(6), 1335-1339. doi:10.1016/j.jaci.2011.07.038
- Tu, M. T., Grunau, R. E., Petrie-Thomas, J., Haley, D. W., Weinberg, J., & Whitfield, M. F. (2007). Maternal stress and behavior modulate relationships between neonatal stress, attention, and basal cortisol at 8 months in preterm infants. *Developmental Psychobiology*, 49(2), 150-164. doi:10.1002/dev.20204
- Yao, Y., Robinson, A. M., Zucchi, F. C., Robbins, J. C., Babenko, O., Kovalchuk, O., . . . Metz, G. A. (2014). Ancestral exposure to stress epigenetically programs preterm birth risk and adverse maternal and newborn outcomes. *BMC Medicine*, 12(1). doi:10.1186/s12916-014-0121-6

Table 1 - Demographic and clinical data from mothers and neonates.

Sample Characteristics	Groups		χ^2/U	<i>p</i>
	Full-term (N=33)	Premature (N= 18)		
Gender [n (%)]			6.8	.009
Female	20 (60.6%)	4 (22.2%)		
Male	13 (39.4%)	14 (77.8%)		
Gestational age (M ± SD)	38.5 ± 1.1	32.6 ± 2.0	.000	.000
Caesarean section	15 (45.5%)	13 (72.2%)	3.4	.066
Reanimation at birth	1 (3.0%)	12 (75%)	14.8	.000
Birth length Z-score (M ± SD)	48.9 ± 1.4	39.9± 3.6	.0	.000
Birth weight Z-score (M ± SD)	3,31 ± 609.4	1,0 ± 544.2	3.0	.000
Head Circumference in cm (M ± SD)	34.7 ± 1.9	28.7± 1.9	1.0	.000
Apgar 1 st min (M±SD)	7.9 ± 1.3	7.3± 1.2	137.0	.063
Apgar 5 th min (M±SD)	9.1± .5	8.5± 0.8	121.0	.011
Fetal distress [n (%)]			11.2	.000
Acute	03 (9.1%)	3 (20.0%)		
Chronic	0 (0.0%)	4 (26.7%)		
Complication of childbirth [n (%)]	8 (24.2%)	7 (38.9%)	1.0	.304
Analgesia [n (%)]	4 (12.5%)	0 (0%)	2.3	.128
Classification [n (%)]		9 (52.9%) !!!	5.1	.076
Small for gestational age	4 (12.1%)	50		
Appropriate for gestational age	26 (78.8%)	9 (52.9%) !!!		
Large for gestational age	3 (9.1%)	50		
		0 (0%)		
Nociceptive Event Index	3.4 ± .5	31.8 ± 23.3	.000	.002
Antenatal corticosteroid [n (%)]	0.0 (0%)	9 (60.0%)	24.5	.000
Maternal age in years (M ± SD)	27.6 ± 7.1	26.1± 5.9	274.5	.657
Maternal education			11.6	.041
Basic education	0 (0%)	1 (5.6%)		
Secondary complete	10 (30.3%)	2 (11.1%)		
High School Incomplete	6 (18.2%)	2 (11.1%)		
High School Complete	14 (42.4%)	8 (44.4%)		
Graduation incomplete	3 (9.1%)	1 (5.6%)		
Graduation complete	0 (0%)	4 (22.2%)		
Marital Status [n (%)]			2.095	.533
Single	11 (33.3%)	4 (22.2%)		
Stable union	12 (36.4%)	6 (33.3%)		
Dissolved union	1 (3.0%)	0 (0%)		
Married	9 (27.3%)	8 (44.4%)		
Family income			5.585	.134
Up to 1 minimum wage	5 (15.2%)	0 (0%)		
1-3 minimum wages	14 (42.4%)	13 (66.7%)		
3-6 minimum wages	7 (21.2%)	4 (23.8%)		
Over 6 minimum wages	0 (0%)	1 (4.8%)		
Not declared	7 (21.2%)	0 (0%)		

Notes: M = average; SD = standard deviation; n = number, % percentage.

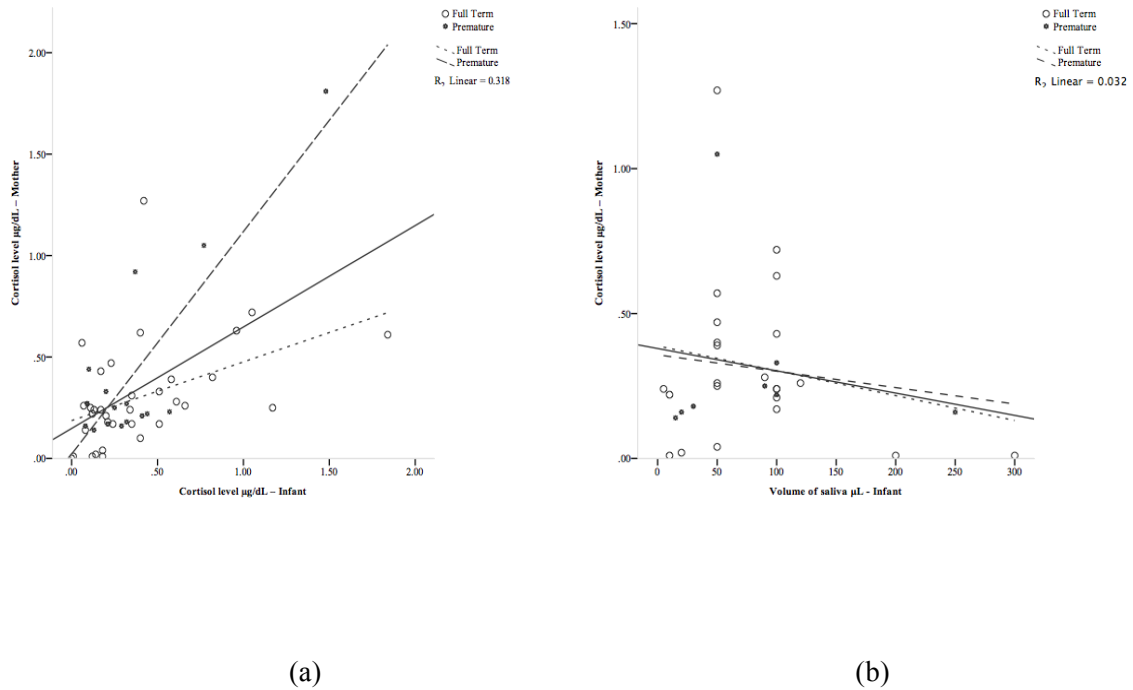


Figure 1 – Neonates’ salivary cortisol levels (a) and volume of saliva (b) predicted by the mothers’ salivary cortisol levels by linear regression analyses.

Table 2 – Descriptive data from stress measurements, based on self-reported emotional and physiological variables in mothers and on physiological (cortisol levels) for neonates.

Emotional and Physiological Stress Characteristics	Groups		χ^2/U	p
	Term (N=33)	Premature (N= 18)		
Holmes–Rahe score (M±SD)	220.3 ± 129.3	248.9 ± 139.4	159.5	0.650
Holmes–Rahe classification level [n (%)]			0.3	0.878
No stress	9 (36.0%)	4 (28.6%)		
Moderate level	10 (36.0%)	6 (42.9%)		
High level	7 (23.1%)	4 (28.6%)		
Edinburgh Scale score (M±SD)	26.6 ± 4.1	25.7 ± 5.9	343.5	0.650
Anxiety factors (M±SD)	8.15 ± 1.8	7.8 ± 2.7	334.0	0.687
Depression factors (M±SD)	5.8 ± 1.0	5.8 ± 1.0	354.0	0.954
Salivary cortisol level nmol/L – Mother (M±SD)	7.7 ± 6.6	11.6 ± 11.0	296.0	0.134
Salivary cortisol level nmol/L – Neonate (M±SD)	9.7 ± 8.3	12.1 ± 13.2	275.0	0.664
Volume of saliva µL – Mother (M±SD)	140.2 ± 92.6	106.7 ± 79.1	73.0	0.150
Volume of saliva µL – Neonate (M±SD)	80.7 ± 65.2	81.9 ± 76.5	86.0	0.781

Notes: M = mean; SD = standard deviation; n = number, % percentage.

Table 3- Stress indicators analysed by level of maternal stress (stress vs. no stress).

Stress Indicators	<i>Stress</i> (<i>x ± sd</i>)	<i>No Stress</i> (<i>x ± sd</i>)	<i>t</i> (<i>df = 30</i>)	<i>p</i>
Holmes–Rahe Scale score	337.31 (115.1)	92.7 (42.6)	6.366	0.000
Edinburgh Scale score (M±SD)	27.14 (4.5)	26.53 (5.0)	-.352	0.246
Anxiety factors (M±SD)	8.14 (2.1)	5.82 (0.9)	.328	0.749
Depression factors (M±SD)	5.86 (1.0)	8.41 (2.1)	-.091	0.928
Cortisol levels nmol/L – Mother	7.5 (4.7)	8.8 (9.1)	.504	0.619
Maternal salivary volume in µL	120.5 (52.5)	121.5 (45.8)	.051	0.960
Cortisol level nmol/L – Neonate	5.3 (9.1)	7.2 (7.2)	-1.364	0.187
Neonate salivary volume in µL	51.5 (30.9)	118.2 (94.2)	2.132	0.046