

**Universidade Nova de Lisboa**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**



**Cortisol e testosterona no plasma da  
grávida e no líquido amniótico: variação  
com o relaxamento e correlação com o  
rácio digital 2D:4D no Recém-Nascido**

**Maria Teresa Mateus Ventura**

**DOUTORAMENTO EM MEDICINA**

**(OBSTETRÍCIA/GINECOLOGIA)**

**2013**

**Universidade Nova de Lisboa**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**



# **Cortisol e testosterona no plasma da grávida e no líquido amniótico: variação com o relaxamento e correlação com o rácio digital 2D:4D no Recém-Nascido**

**Maria Teresa Mateus Ventura**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
OBSTETRÍCIA/GINECOLOGIA**

**Orientadores**

Professor Doutor Jorge Branco, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

**Co-Orientadores**

Professora Doutora Maria Teresa Neto, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa  
Professora Doutora Jerónima Teixeira

**2013**

*The real test of any good thing we do is perseverance. Otherwise it's just another bit of variety that punctuates our life.*

**Anónimo**

*À minha Mãe  
e a todas as Mães*

---

## PREFÁCIO

Trabalhar em Ciência é uma busca de visão no sentido que lhe é conferido na tradição dos índios Toltecas: com um propósito bem definido e bem alinhado connosco, com vontade, humildade, sinceridade e integridade, partimos com uma confiança absoluta em nós mesmos e com o intento de descobrir e de aceitar o que vier sem pré conceitos.

Ao realizar um trabalho com estas características, a interação social, cultural e científica faz-nos também compreender profundamente a palavra humildade e reconhecer que somos apenas uma pequena peça que interliga e coordena uma sequência inquantificável de acontecimentos à nossa volta.

Ajahn Sumedho, um proeminente monge budista que transmite ensinamentos muito directos, práticos e simples, disse "Ideals can inspire the mind, but in terms of developing a path, we have to let go off ideals". Por vezes o que idealizamos para um projecto não é exequível no espaço-tempo disponível porque o conhecimento existente é insuficiente para dar sustentabilidade às hipóteses formuladas, ou porque a onerosidade dos procedimentos necessários é incomportável na ausência de financiamento externo, como foi o caso desta tese, integralmente suportada pela autora, quer a nível nacional quer na componente internacional. O título inicialmente previsto "Sentimentos e emoções na vida intra-uterina: cortisol, prolactina, dopamina, serotonina, adrenalina e nor-adrenalina no sangue materno e líquido amniótico de fetos com 17-19 semanas: suas correlações com estados afetivos", pressupunha um caminho de investigação que não foi seguido pelas principais razões já apontadas. A visita em 2006 ao "*Fetal and Neonatal Stress Research Group*" no Imperial College, em Londres, e os debates com a professora Vivette Glover, que teve a amabilidade de me receber, foi determinante para a mudança de rumo. A existência de sentimentos e emoções no feto é uma possibilidade evidenciada em alguns estudos imagiológicos e hormonais, mas há ainda muito trabalho pioneiro a percorrer antes de se poder desenvolver o tema (Lagercrantz, 2009).

Perante a necessidade de reformular o rumo da investigação, segui a filosofia de Sumedho e procurei ser prática e simples. Sabendo-se ser o *stress* materno potencial modulador epigenético da resposta hormonal do feto e do padrão morfológico cerebral, os quais, por sua vez, têm repercussões relevantes para a vida extrauterina, optei por investigar formas de intervenção numa situação reconhecidamente indutora de ansiedade aguda na grávida: a realização eminente de uma amniocentese. Com esta primeira fase do estudo, adquirei dados valiosos para a caracterização hormonal da grávida e do líquido amniótico, pelo que

---

fazia sentido dar-lhe continuidade longitudinal, avaliando também o rácio digital 2D:4D do recém-nascido (RN) nas primeiras horas de vida. O rácio digital é considerado um marcador indirecto da acção androgénica/estrogénica in-útero podendo por isso apontar para riscos de patologia no adulto associada a variações desses níveis hormonais. A intervenção clínica em situações de ansiedade e *stress* antenatal, e o rácio digital no RN são áreas de investigação recente e esta tese propõe-se contribuir para o avanço do conhecimento neste domínio, com enquadramento na prática clínica.

Toda a metodologia do estudo, incluindo a componente laboratorial, foi laboriosamente planeada e operacionalizada por mim, e participei também em todos os ensaios clínicos. Por esse motivo, a componente laboratorial é descrita detalhadamente (vêr apêndices).

Desde que dei início ao propósito de realizar trabalho de investigação clínica para uma tese, um longo caminho foi percorrido, por vezes ziguezagueante, por vezes com escolhos que foi necessário remover. Não suspeitava ser tão exigente e moroso, porém, o que vale na vida não é o ponto de partida mas sim a caminhada. Esta caminhada transformadora foi longa e várias vezes assumiu o desencorajamento, pois o encerramento temporário do diagnóstico pré-natal no HDE, bem como o encerramento do Serviço de Urgência e mesmo questões de saúde pessoal, puseram em risco a concretização deste trabalho. No entanto, perspectivar no tempo este processo ajuda a compreender o que disse Luis de Camões “não se aprende Senhor na fantasia, senão vendo, tratando e pelejando”, sendo por si só gratificante tudo o que já foi alcançado.

Que este trabalho possa ser um humilde contributo para a Obstetrícia e para as gerações futuras.

---

## AGRADECIMENTOS

Fazer investigação e trabalho clínico em simultâneo, foi uma actividade exigente e solitária. Senti a falta de estar integrada num serviço com alicerces estabelecidos nesta área. A resultante, porém, foi uma enorme aprendizagem pessoal em diferentes áreas.

A interacção com família, pacientes, diversos profissionais de saúde e com outros investigadores, foi fundamental para ajudar a concretizar este trabalho.

A lista de agradecimentos a quem, de alguma forma, contribuiu para a realização desta tese é muito longa e nomes ficarão por individualizar. A todos os assim anónimos, a minha gratidão.

O meu primeiro agradecimento vai para as grávidas participantes. Este trabalho foi facilitado pela excelente aderência à participação, devendo-se-lhes em grande parte o bom termo desta tese.

Um grande agradecimento aos meus orientadores:

Professor Jorge Branco, por ter aceite a orientação da tese e por acreditar em mim. O seu apoio foi fundamental para a concretização deste trabalho.

Professora Maria Teresa Neto, pela disponibilidade, ética, paciência e incentivo e por assegurar desde a primeira hora, a qualidade nos procedimentos. Sempre atenta, foi facilitadora e muitas vezes inspiradora.

Professora Jerónima Teixeira, que conheci no Imperial College em Londres, pela sua exigência e por me ter apontado graus de rigor que procurei seguir neste trabalho e que o valorizaram.

Esta tese não teria sido possível sem algumas outras pessoas:

Professora Vivette Glover, que descobri através das minhas leituras iniciais e que amavelmente me recebeu em estágio no seu serviço, tendo-me estimulado a reformular o projecto inicial. Nesse estágio mostrou-me como são feitos os doutoramentos no Imperial College de Londres, envolveu-me em *workshops*, apresentou-me pessoas importantes para este trabalho, e mais tarde discutiu comigo os meus resultados mesmo por telefone, quando um vulcão obrigou milhares de pessoas a ficarem em terra. Através dela foi possível clarificar ideias e mostrar resultados consistentes.

Professora Teresa Carreira, que se prontificou a colaborar na parte laboratorial do meu trabalho, assegurando as condições de realização de todos os ensaios clínicos no plasma por radioimunoensaio (RIA) na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Departamento de Química e Bioquímica. O Departamento de Biologia Vegetal da mesma faculdade providenciou condições de armazenamento a -80º

---

C dos produtos colhidos no decorrer deste trabalho. Também um agradecimento à *Arium Diagnóstica* que disponibilizou os seus engenheiros químicos para todos os ensaios, assegurando a qualidade dos resultados e contribuindo para o sucesso desta tese. Ainda um agradecimento à Dra Rosa Barros, Directora da Área de Diagnóstico Biomédico do Centro Hospitalar de Lisboa Central, por me ter disponibilizado uma centrífugadora no piso de consultas, essencial durante todo o período de colheitas.

Professora Alyx Taylor-Vieira, Senior Lecturer do King's College, que com empenhamento assegurou o protocolo para realização dos doseamentos hormonais no líquido amniótico no laboratório da School of Biomedical Sciences do King's College, em Londres. Este trabalho ganhou por isso em qualidade.

Professor Manuel Carmo Gomes, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, por toda a colaboração e empenho na análise estatística dos dados, por ajudar a clarificar os resultados e por me ensinar a desenvolver e aplicar diferentes métodos estatísticos. Um amigo e colaborador precioso.

Agradecimentos ainda ao serviço de Neonatologia do HDE pelo interesse demonstrado no meu trabalho e em especial à Dra Ana Pita, pela dedicada colaboração no registo dos dados após o nascimento e ao Professor Doutor Luis Pereira da Silva pelo apoio demonstrado.

Ao serviço de ginecologia/obstetrícia do Hospital Dona Estefânea (HDE), agradeço o ter-me ajudado a adquirir uma nova forma mais eficaz de enfrentar e ultrapassar dificuldades, pois como disse Friedrich Nietzsche, "o que não me mata fortalece-me". Um especial apoio foi dado pelas Dras Ivone Dias e Ana Bernardo, os elementos do Departamento de Diagnóstico Pré-Natal (DPN) que realizaram as amniocenteses, bem como pelas enfermeiras da Enfermaria de Puérperas que colaboraram no registo das mãos. A enfermeira Susana Costa merece destaque por ter ajudado de forma eficiente nas colheitas sanguíneas e a Ana Almeida, secretária do Departamento, pela organização e simpatia.

Agradeço ainda a investigadores de diferentes países com que me cruzei pelo exemplo de simplicidade, acessibilidade, pelos esclarecimentos e pelo incentivo. Também ao Professor Mário Simões, por me ter ajudado numa fase inicial e pelo incentivo à realização do trabalho.

Pelo testemunho que me deixou de altruísmo, trabalho, rigor e vontade de aprender sempre mais, a memória da minha mãe esteve sempre presente. Foi testemunha do meu compromisso para com a realização deste trabalho, que não chegou a ver concretizado mas no qual acreditou desde início. O meu profundo agradecimento também a toda a família pelo apoio emocional e por acreditarem em mim. E a todos os meus amigos – por serem quem são e por partilharmos a vida.



---

## LISTA DE ABREVIATURAS MAIS USADAS

ACTH – Hormona Adrenocorticotropica

11 $\beta$ -HSD1 e 2 - 11 $\beta$  Hidroxiesteroidesdesidrogenase tipo 1 e tipo 2

C – Cortisol

CRH – Hormona libertadora de Corticotropina

2D:4D – Rácio entre o 2º e o 4º dedo

CHCL – Centro Hospitalar de Lisboa Central

EHHSR-G – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Supra-Renal-Gonadal

FCF – Frequência cardíaca fetal

GC – Glucocorticóides

HDE – Hospital Dona Estefânia

IMC – Índice de Massa Corporal

LA – Líquido Amniótico

LH – Hormona Luteinizante

RD – Rácio Digital

RG – Receptores de glucocorticoides

RN – Recém-Nascido

SNC – Sistema Nervoso Central

SNS – Sistema Nervoso Simpático

SR – Supra-renal

T - Testosterona

## ABREVIATURAS ESTATÍSTICAS

ANOVA - análise de variância

ANCOVA - análise de covariância

b - coeficiente de regressão

dp - desvio-padrão

---

IC - intervalo de confiança

n - tamanho da amostra

$p$  - probabilidade da estatística observada, quando a hipótese nula é verdadeira

r - coeficiente de correlação de Pearson

$r^2$  - coeficiente de determinação

## Publicações derivadas ou relacionadas com a tese

- 1) Ventura T, MC Gomes, A Pita, MT Neto, A Taylor (2013): Digit ratio (2D:4D) in Newborns: influences of prenatal testosterone and maternal environment. *Early Human Development*; 89(2):107-12.
- 2) Ventura T, MC Gomes, MT Neto (2013): Health benefits for the mother and child from music intervention in pregnancy, in *"Music: Social Impacts, Health Benefits and Perspectives"*, Nova Science Publishers, Inc. (Ed), New York (in press).
- 3) Ventura T, MC Gomes, T Carreira (2012): Cortisol and anxiety response to a relaxing intervention on pregnant women awaiting amniocentesis. *Psychoneuroendocrinology*; 37, 148-156.
- 4) Ventura T, MC Gomes, A Taylor, A Pita, MT Neto (2012): Testosterone and 2D4D Digit Ratio in Newborn Infants. 3rd International Congress of UENPS 2012, Speakers, Acta Med Port 2012; PO11:25(S2):148
- 5) Ventura T (2012): Acção do stress na mulher grávida e sua relação com prematuridade e baixo peso ao nascer, in Sá, E. (Ed) "Psicologia da Gravidez, do Feto e do Bebê", Almedina, Coimbra, Portugal (in press).
- 6) Ventura T, MC Gomes (2010): Análise Descritiva de Parturientes e Recém-Nascidos na Maternidade Hospital Dona Estefânia entre 2005 e 2008. *Acta Medica Portuguesa*; 23: 793-802
- 7) Ventura T, MT Neto, M Simões (2009): Efeitos do stress durante a gravidez na morfologia cerebral do feto e da criança. Uma revisão. *Progr Diag Trat Prenat*;21(2):77-84

---

## ÍNDICE

Prefácio.....	i
Agradecimentos.....	iii
Abreviaturas.....	v
Lista de Manuscritos.....	vi
Índice.....	vii
Resumo.....	xi
Abstract.....	xvi
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Definição de Conceitos .....	2
1.2 O eixo HHSR-G em investigação relacionada com o <i>stress</i> .....	3
1.2.1 Mecanismos fisiológicos de resposta ao <i>stress</i> na gravidez.....	4
1.2.1.1 Cortisol .....	7
1.2.1.2 Testosterona.....	8
1.2.1.3 Outros mecanismos.....	9
1.3 Mecanismos de transferência do <i>stress</i> materno para o feto.....	11
1.3.1 Níveis hormonais na mãe.....	11
1.3.2 Sistema enzimático placentar.....	12
1.4 Formas de investigação do <i>stress</i> antenatal.....	13
1.4.1 Questionário de Spielberger.....	14
1.5 Repercussões do <i>stress</i> antenatal sobre o indivíduo: do feto ao adulto.....	15
1.5.1 Modelo animal.....	16
1.5.2 Morfologia cerebral.....	17
1.5.3 Prematuridade e baixo peso ao nascer.....	19
1.5.4 Psicopatologia.....	22
1.5.5 Outros aspectos comportamentais.....	23
1.5.6 Teoria da programação fetal.....	24
1.5.7 Epigenética – hipóteses de um modelo evolucionista.....	26
1.6 Intervenções não farmacológicas para reduzir o <i>stress</i> na grávida.....	28
1.6.1 Modelo animal.....	29

---

1.6.2 Estudos em humanos.....	29
1.6.2.1 Massagem, Yoga, Psicoterapia.....	30
1.6.2.2 Som e música.....	31
1.6.3 Música e gravidez.....	32
A Grávida.....	32
O Feto.....	33
1.6.4 Relaxamento em ambiente clínicos.....	34
1.7 Rácio digital 2D:4D.....	35
1.7.1 Testosterona e rácio digital.....	37
1.7.2 <i>Stress</i> e rácio digital.....	38
1.7.3 Genética e 2D:4D.....	39
1.7.4 Implicações clínicas do rácio digital.....	41
1.7.5 Rácio digital no Recém-Nascido.....	42
<b>2. Prioridades, Objectivos e Estrutura da Tese.....</b>	<b>45</b>
2.1 Conclusões que levaram às prioridades da tese.....	47
2.2 Hipóteses e Objectivos.....	48
2.3 Estrutura Geral da Tese.....	50
<b>3. Métodos.....</b>	<b>51</b>
3.1 Cálculo da amostra inicial.....	53
3.2 Participantes e recrutamento.....	53
3.3 Protocolo da Fase 1 .....	55
3.4 Protocolo da Fase 2.....	56
3.5 Grupos de intervenção.....	56
3.6 Questionário de Spielberger – avaliação do estado e do traço de ansiedade.....	57
3.7 Variáveis fisiológicas.....	58
3.8 Índice de Massa Corporal (IMC).....	59
3.9 Frequência Cardíaca Fetal (FCF).....	59
3.10 Registos.....	59
3.11 Análise estatística.....	61
<b>4. Resultados.....</b>	<b>63</b>

---

Amostra Fase 1.....	65
Amostra Fase 2.....	65
4.1 Estatística descritiva Fase 1.....	68
4.2 Ansiedade, níveis hormonais e outras variáveis antes da intervenção.....	72
4.2.1 STAI-S e T.....	72
4.2.2 Pulso e pressão arterial.....	75
4.2.3 Cortisol no plasma.....	76
4.2.4 Testosterona no plasma.....	78
4.2.5 Cortisol no líquido amniótico.....	80
4.2.6 Testosterona no líquido amniótico.....	82
4.2.7 Frequência cardíaca do feto.....	83
4.2.8 Idade Gestacional no Parto.....	84
4.2.9 Peso do Recém-Nascido ao Nascer.....	85
4.3 Variações de escala de ansiedade, de parâmetros vitais, e de níveis hormonais por grupos de intervenção.....	87
4.3.1 Variações na grávida.....	87
Variação do estado de ansiedade.....	91
Variação do traço de ansiedade.....	92
Variação do pulso.....	92
Variação da pressão arterial sistólica.....	92
Variação da pressão arterial diastólica.....	93
Variação do cortisol no plasma.....	93
Variação da testosterona no plasma.....	95
Variação do cortisol e testosterona no plasma com e sem auscultadores.....	96
4.3.2 Variações no feto.....	96
Variação da frequência cardíaca fetal.....	96
Concentração de cortisol e testosterona no líquido amniótico.....	97
4.4 Racio digital 2D:4D no Recém-Nascido e correlações.....	98
4.4.1 Rácio digital.....	98
4.4.2 Rácio digital 2D:4D e hormonas no LA.....	102

---

<b>5. Discussão</b> .....	107
5.1 Amostra do estudo <i>versus</i> população base do HDE.....	109
5.2 Efeito psicológico, hormonal e fisiológico da intervenção.....	111
5.2.1 Ansiedade.....	111
5.2.2 Hormonas.....	112
5.2.3 Intervenção com música.....	114
5.2.4 Pulso, Pressão Arterial e Frequência Cardíaca Fetal.....	115
5.3 Associação entre variáveis psicológicas, hormonais e fisiológicas.....	117
5.3.1 Ansiedade e hormonas.....	118
5.3.2 Cortisol no plasma e no LA.....	119
5.3.3 Testosterona no plasma e no LA.....	120
5.3.4 Cortisol <i>versus</i> testosterona.....	122
5.3.5 Idade gestacional na Amniocentese e no Parto.....	126
5.3.6 Idade gestacional no parto e Peso ao Nascer .....	127
5.3.7 Pressão arterial, Índice de Massa Corporal e Pulso.....	129
5.4 Rácio digital 2D:4D.....	131
5.4.1 Nos Recém-Nascidos.....	132
5.4.2 Correlações com a mãe.....	134
5.4.3 Correlações com a testosterona.....	136
<b>6. Limitações e Perspectivas</b> .....	139
6.1 Limitações do estudo.....	141
6.2 Contribuição para a ciência.....	142
6.3 Conclusões.....	143
6.4 Perspectivas.....	145
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	147
<b>8. Apêndices</b> .....	175
Índice de Apêndices.....	177

---

## RESUMO

**Introdução** - O *stress* materno durante a gravidez, em animais e em humanos, tem sido consistentemente relacionado com modificações na estrutura e na função cerebral do feto, bem como com alterações duradouras na resposta do seu eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal-gonadal (HHSR-G). Essas modificações manifestam-se em diferentes etapas do desenvolvimento do indivíduo através de alterações cognitivas, comportamentais e emocionais, alterações essas que podem variar com o género. Aparentemente a ansiedade na grávida, mais do que a depressão, pode associar-se a restrição do crescimento fetal e parto pré-termo (PPT), resultantes possivelmente da acção do cortisol e de alterações no fluxo vascular. A evidência científica disponível sugere que os processos de *stress* e ansiedade maternos, por um lado e, por outro, a neurofisiologia comportamental do feto e do futuro indivíduo, estão interligados e têm uma função adaptativa e evolutiva. As alterações hormonais associadas ao *stress* condicionam alterações epigenéticas no feto, com posteriores repercussões no adulto, nomeadamente risco aumentado de doenças. Este conjunto de conhecimentos aponta para a necessidade de investigação clínica sobre formas de intervenção em situações de ansiedade na grávida e a possibilidade de detecção precoce de riscos acrescidos de doença no indivíduo.

Marcadores biológicos de risco acrescido para doenças no adulto, como o peso ao nascer ou o número de pregas palmares (impressão dermatoglífica), têm sido associados a exposição, respectivamente, ao cortisol e à testosterona pré-natal. O rácio digital é outro marcador biológico, com características dimórficas, amplamente investigado na última década por ser um potencial indicador de múltiplas características de risco no indivíduo, por aparentemente traduzir o nível de androgénios *versus* estrogénios in útero.

É objectivo deste estudo investigar formas de intervenção relaxante em grávidas que estão na eminência de uma situação ansiogénica, a realização de amniocentese (primeira fase do estudo), avaliar possíveis interações com o cortisol e a testosterona e correlacionar com dados no parto e com o rácio digital (RD) 2D:4D no recém-nascido (RN) e na mãe (segunda fase do estudo).

**Participantes e Métodos** - 184 grávidas saudáveis que realizaram amniocentese no HDE maioritariamente por idade materna, aceitaram participar na primeira fase do estudo e, destas, 106 pares de mãe-filho participaram também na segunda fase. Em ambas as fases era assinada no início folha de consentimento informado, previamente aprovada pela Comissão de Ética do Hospital, que aprovou também as duas fases do estudo. As grávidas foram aleatorizadas em três grupos de intervenção e, após colheita de dados demográficos, eram avaliadas quanto a parâmetros fisiológicos, estado e traço de ansiedade, usando as escalas de Spielberger (STAI-S e STAI-T), e níveis de cortisol (C) e testosterona (T) no plasma, antes e depois da intervenção, em períodos da manhã e da tarde. Era colocado no início um catéter endovenoso (EV) numa veia periférica e colhidos cerca de 5 ml de sangue imediatamente centrifugado,

---

antes e depois da intervenção. O plasma resultante era guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até processamento laboratorial por radioimunoensaio (RIA). As participantes eram distribuídas por grupos que ou ouviam música, ou liam revistas, ou aguardavam na sala de espera junto de um familiar durante 30min. Após esta intervenção, o catéter venoso era retirado e a grávida era encaminhada para a sala de amniocenteses onde o procedimento era então realizado. Antes e depois da amniocentese era avaliada e registada a frequência cardíaca fetal (FCF).

Nas grávidas cujo parto teve lugar no HDE, os dados obstétricos e neonatais foram recolhidos após o parto e uma cópia de ambas as mãos de cada par mãe-filho foi incluída no processo individual da participante. Os rácios 2D:4D foram calculados a partir de medições efectuadas por dois observadores independentes. A análise estatística de todos os dados foi feita em MS-Excel® e IBM® SPSS v19.

**Resultados** - A idade média das participantes foi de 37,7 anos ( $dp=2,9$ ) e a sua idade média de gestação 17,3 semanas ( $dp=1,2$ ). O seu estado de ansiedade (STAI-S) antes da intervenção relaxante foi em média 43,4 ( $dp=11,3$ ), enquanto o traço (STAI-T) foi 35,4 ( $dp=8,9$ ). As mulheres mais jovens e com mais baixa idade gestacional, tenderam a ter os maiores índices de ansiedade-estado. O valor médio de concentração de cortisol no plasma das participantes à chegada foi 577,8 nmol/L ( $dp=216$ ) e de testosterona foi 1,65 nmol /L ( $dp=0,87$ ). Nem o cortisol nem a testosterona no plasma das mães diferiram quanto ao sexo do feto. A concentração média de cortisol no líquido amniótico (LA) foi de 18,3 nmol/L ( $dp=9$ ) e a testosterona no LA apresentou um valor médio de 0,58 nmol/L ( $dp=0,43$ ). Observou-se uma diferença significativa entre os sexos quanto à concentração média de testosterona no LA (femininos e masculinos, respectivamente, 0,32 e 0,82 nmol/L), mas não quanto ao cortisol no LA. Após a intervenção de 30min, o STAI-S médio baixou significativamente de 43,4 para 37,3 ( $p=0,004$ ). Em média, a descida foi de -8,2 pontos no grupo da música, -5,7 na revista e -4,1 na sala de espera, diferenças estas que foram significativas ( $p=0,004$ ). Em média, o cortisol plasmático desceu 36,5 nmol/L, tendo a maior descida ocorrido no grupo que ouviu música (-60 nmol/L), significativamente mais do que na sala de espera ( $p<0,004$ ). A maior descida no cortisol do plasma teve sempre lugar de manhã. Também o nível médio de testosterona no plasma desceu no grupo da revista (-0,11 nmol/L) e da música (-0,08 nmol/L), tendo subido na sala de espera (0,06 nmol/L). A variação da testosterona e a variação do cortisol estiveram significativamente correlacionadas ( $r=0,53$ ,  $p<0,001$ ). Tanto a PA sistólica como a diastólica desceram em todos os grupos de intervenção: em média, a maior descida foi na revista, seguida da música. A FCF não foi estatisticamente diferente entre grupos de intervenção e não variou significativamente antes e depois da amniocentese.

O cortisol materno apresentou um padrão circadiano, com descida ao longo da manhã e ligeira subida após as 12h; tendeu a aumentar com a idade gestacional ( $r=0,19$ ,  $p=0,01$ ), mostrou correlação negativa com o IMC da grávida ( $r=-0,17$ ,  $p=0,02$ ) e, de tarde, correlação com o estado de ansiedade ( $r=0,22$ ,  $p=0,05$ ). O



---

cortisol materno mostrou-se ainda correlacionado com o cortisol no LA ( $r=0,3$ ;  $p<0,001$ ) em todas as gamas de idade gestacional, tanto em mulheres ansiosas ( $STAI-S \geq 40$ ) como em não ansiosas ( $STAI-S < 40$ ), e o cortisol no LA apresentou um padrão circadiano semelhante ao materno, mas menos acentuado.

Quanto à testosterona no plasma, as grávidas mais velhas tenderam a ter menor concentração que as mais novas ( $r=-0,31$ ,  $p<0,001$ ) e encontrou-se correlação positiva com a idade gestacional até às 18 semanas nos fetos femininos. A testosterona não se mostrou correlacionada com o nível de ansiedade, nem com outras variáveis da mãe. Não houve, também, correlação entre a testosterona no plasma e no LA. As concentrações de testosterona e de cortisol no LA, também não mostraram correlação entre si.

Não se detectou evidência de associação entre a ansiedade das mães, avaliada aquando da amniocentese, e a idade gestacional no parto. Já o nível de cortisol mais elevado de manhã nas mães tendeu a associar-se significativamente a partos mais cedo ( $r=-0,25$ ;  $p=0,01$ ), o mesmo não se observando relativamente ao cortisol da tarde. Houve 51% de recém-nascidos (RN) masculinos e 49% femininos (respectivamente,  $n=94$  e  $90$ ). Os rapazes pesaram, em média, significativamente mais que as raparigas, respectivamente,  $3395$  e  $3136$  g ( $p<0.001$ ).

Os RN masculinos apresentaram rácios médios 2D:4D mais baixos que os RN femininos e as diferenças foram significativas entre as mãos esquerdas (masculinos:  $0.927$ ; femininos:  $0.950$ ;  $p=0.004$ ), mas não entre as mãos direitas. As mãos dos RNs femininos mostraram correlação negativa com a testosterona do LA e positiva com o rácio das mães, mas os rácios dos RNs masculinos não mostraram associações significativas. A testosterona no plasma das mães, mostrou correlação negativa fraca com o RD dos RNs em ambos os sexos. Mães de RNs masculinos apresentaram menores rácios digitais que mães de femininos, e o rácio das mães foi maior que os dos seus filhos, independentemente do sexo. O 2D:4D na mão direita das mães mostrou correlação positiva significativa com ambas as mãos dos RNs femininos e correlação, mas não significativa, com as mãos dos RNs masculinos.

**Discussão** – O valor médio do estado de ansiedade (STAI-S) confirmou que a eminência de amniocentese é percebida como um acontecimento ansiogénico pela grávida, embora o traço de ansiedade (STAI-T) mostrasse que as mulheres não eram inerentemente ansiosas. Os resultados corroboram a hipótese de que mesmo um curto período de relaxamento pode ter efeitos positivos na saúde psicológica da mulher grávida sujeita a situações indutoras de *stress*. Os *scores* de ansiedade diminuíram em todos os grupos após a intervenção, sendo os ganhos significativamente maiores quando a pausa ocorreu com audição de música. Os ganhos foram particularmente bons nas mulheres mais ansiosas, que eram também as mais jovens. As intervenções promoveram ainda a descida no cortisol e na testosterona plasmáticos e, globalmente, foi encontrada evidência de que apenas 30 minutos, principalmente com audição de música relaxante seleccionada pelo próprio, são suficientes para baixar significativamente a ansiedade e os níveis de cortisol.

---

As causas da forte correlação encontrada entre a variação da testosterona e do cortisol após a intervenção não são evidentes, mas é possível que os mesmos mecanismos que desencadeiam uma subida transitória no cortisol e na testosterona no seguimento de *stress* agudo possam actuar de forma inversa em resposta ao relaxamento.

O STAI-S foi o preditor mais importante dos níveis de cortisol à tarde, mas não de manhã, o que corrobora outros relatos de ausência de resposta do cortisol ao *stress* de manhã, eventualmente porque os seus valores basais são já elevados. Encontrou-se evidência de ligação entre o cortisol no plasma materno e no LA, nomeadamente semelhança no padrão circadiano e significativa correlação entre eles, corroborando a existência de transporte através da placenta. A ausência de correlação entre o cortisol e a testosterona no LA, contrasta com os resultados de Sarkar e colaboradores que encontraram correlação positiva significativa em ambos os sexos. Isto pode dever-se a falta de potência estatística causada por uma amostra de tamanho insuficiente num contexto de grande variabilidade, mas sugere-se também a possibilidade de uma associação mais complexa entre as duas hormonas no LA. A variabilidade da testosterona aparenta ser gradualmente comprimida, à medida que o cortisol aumenta a sua concentração a partir dos 30nmol/L, um padrão que surge nestes dados em ambos os sexos e é aqui descrito pela primeira vez.

O cortisol no plasma em mulheres mais ansiosas de manhã mostrou uma correlação negativa significativa com a idade gestacional no parto, ou seja, quanto mais elevado o cortisol mais curta foi a gestação, corroborando relatos semelhantes de outros autores. A ausência de associação entre o traço de ansiedade (STAI-T) das mães, aquando da amniocentese, e a idade gestacional no parto, pode-se dever a que tanto o STAI-T como a gama de idades gestacionais no parto foi pouco variável (35-41 semanas), uma vez que os critérios de exclusão eliminaram valores baixos desta última.

Os resultados sobre o rácio 2D:4D mostram que o dimorfismo sexual já está presente na altura do nascimento tomando, como se esperava, valores mais altos nas raparigas que nos rapazes. No entanto as diferenças são subtis e há grande sobreposição entre os dois sexos. Os resultados também sugerem que o rácio 2D:4D aumenta desde o nascimento até à vida adulta uma vez que as mães apresentaram rácios digitais (RDs) significativamente maiores do que os seus RNs. Os rácios menores encontrados em mães com filhos masculinos vão ao encontro de estudos que sugerem associação entre a concentração de testosterona em ambos os progenitores na altura da periconcepção e o sexo do feto, associando-se concentrações mais altas de testosterona a maior probabilidade de conceber um filho masculino. O 2D:4D da mãe foi um predictor significativo do 2D:4D em ambas as mãos dos RNs femininos, mas não masculinos e a testosterona no LA também mostrou correlação negativa com o RD das raparigas, mas não dos rapazes. Os elevados níveis de testosterona característicos dos rapazes, podem estar na origem de grande variabilidade individual, limitando associações entre eles e as mães. Neste estudo, as diferenças entre sexos no 2D:4D dos RNs foram significativas para a mão esquerda mas não para a direita, o que contrasta com os

---

estudos em idades superiores a dois anos, sugerindo que a exposição pós-natal aos androgénios, em especial nos rapazes, é importante para a acentuação desse dimorfismo e principalmente para a estabilização do rácio na mão direita.

**Conclusão** - Este estudo sugere que mulheres grávidas beneficiam da prática rotineira de 30 min de relaxamento perante a eminência de um acontecimento indutor de *stress*. O benefício será tanto psicológico como fisiológico e será mais marcado de manhã do que de tarde. As mulheres com maior tendência ansiosa, tipicamente as mais jovens e com menos idade gestacional, serão as que mais beneficiam. Entre os tipos de intervenção experimentados, todos eles não dispendiosos, a audição de música foi globalmente o mais eficaz para o propósito pretendido.

A variação do cortisol e a variação da testosterona estão altamente correlacionadas, e este efeito poderá ser explorado em futuras intervenções relaxantes. Programas curtos de relaxamento poderão conduzir a benefícios para o bem-estar psicológico e para a saúde da grávida, com benefícios adicionais no desfecho da gravidez.

O rácio digital 2D:4D do recém-nascido apresenta características sexualmente dimórficas, sendo mais baixo em rapazes que em raparigas, confirmando a influência dos androgénios pré-natais, mas há grande sobreposição entre os sexos pelo que, isoladamente, não pode ser utilizado como marcador de risco. No entanto, se associado a outros marcadores biológicos, como o peso ao nascer e a circunferência cerebral, entre outros, poderá ser um parâmetro a valorizar desde cedo, possivelmente no acompanhamento pediátrico.

Nas raparigas, o RD da mãe e a testosterona no LA explicam uma proporção significativa do seu 2D:4D. Em ambos os sexos, o rácio 2D:4D aumenta após o nascimento e o dimorfismo sexual observado com base em amostras de crianças com mais de dois anos de idade, é afectado pela testosterona pós-natal, especialmente no que se refere à mão direita.

---

## ABSTRACT

**Introduction** - Maternal *stress* during pregnancy, both in human and in animals, has been consistently associated to modifications in the structure and function of the fetus brain. Long-lasting effects in the hypothalamic-pituitary-adrenal-gonadal (HPA-G) axis of the fetus have also been documented. Such modifications will be apparent at different developmental stages by way of cognitive, behavioural, and emotional disorders, and they may differ between genders. Apparently, anxiety during pregnancy, more than depression, may associate with restrictions in fetal growth and pre-term birth, eventually due to cortisol action and changes in the vascular flow. The available scientific evidence suggests that processes of stress and maternal anxiety interact with the neurophysiology of the fetus and the behavior of future adult and that this interaction has adaptative meaning. Hormonal changes promoted by maternal stress underlie epigenetic changes meant to prepare the fetus for an adverse external environment but, simultaneously, have a less favourable outcome in adulthood, namely an increased risk of disease. This bulk of information calls for the need of clinical research on how best to intervene in order to prevent anxiety effects during pregnancy and also on the early detection of increased risk of disease after birth. Biological markers of increased risk for disease, like low weight at birth or fluctuating dermatoglyphic asymmetry have been associated to exposition to, respectively, pre-natal cortisol and testosterone. The digital ratio is another biological marker, sexually dimorphic, which in the past decade has been largely investigated for being a potential indicator of risk for multiple diseases, as it appears to translate exposure to the balance between androgens and estrogens in uterus. The first part of this study examines the impact of relaxing interventions on pregnant women in the eminence of proceeding to amniocentesis, a situation usually considered anxiogenic, examines interactions among cortisol, testosterone, self-scored anxiety, and women physiological traits. The second part examines associations between hormones and data collected after delivery, namely the digital ratio 2D:4D in the newborn and in the mother.

**Participants and methods** – A total of 184 healthy pregnant women submitted to amniocentesis at the Dona Estefania Hospital (HDE), mostly because of maternal age, accepted to participate in the first part of the study. Among these, 106 mother-newborn pairs also participated in the second part. In both parts women signed an informed consent statement approved by the Hospital Ethical Committee who also approved the two-part study. The women were randomly assigned to three intervention groups and, once demographic data collected, were then evaluated for physiological parameters, and self-rated state and trait anxiety scores using a Spielberger scale (STAI-S and STAI-T). Concentration levels of plasma cortisol and testosterone were also measured before and after the relaxing intervention, both in the morning and in the afternoon, as described next. Before the intervention, a venous puncture was performed and an intravenous catheter was applied to a peripheral arm vein and kept in place until the end of the

---

intervention; 5 mL of maternal blood was collected before and after the intervention and immediately centrifuged. The supernatant plasma was kept at -80 °C for later radio-immunoassay (RIA). In the intervention groups the participants relaxed for 30 min, either listening to music, reading magazines, or sitting in the waiting-room with a relative. The venous catheter was taken out following the intervention and then women proceeded to the amniocentesis room. The fetal heart rate was measured before and after amniocenteses. For women who delivered at the HDE, the obstetric and neonatal data were collected after delivery and photocopies of both hands of the mother-child pair were taken and added to the participant file. The 2D:4D ratios were computed from measurements conducted by two independent observers. Data statistical analysis was conducted in MS-Excel® and IBM® SPSS v19.

**Results** – Women were on average 37,7 (sd=2,9) years old and their mean gestation age was 17,3 (sd= 1,2) weeks. The average S-STAI score before the intervention was 43,4 (sd=11,3), whereas the average trait (STAI-T) was 35,4 (sd=8,9). Younger women with lower gestation ages tended to have the higher scores of state anxiety. Maternal plasma cortisol, measured before relaxation, averaged 577,8 nmol/L (sd=216) and testosterone averaged 1,65 nmol/L (sd=0,87). Neither cortisol nor testosterone in the mother's plasma differed in regard to the fetus sex. The average concentration of cortisol in the amniotic fluid (AF) was 8,3 nmol/L (sd=9) and testosterone in the AF was on average 0,58 nmol/L (sd=0,43). There was a significant difference between sexes in regard to testosterone in the AF (males and females, respectively, 0,82 and 0,32 nmol/L) but not in regard to cortisol. After the 30min intervention, the average STAI-S decreased significantly from 43,4 to 37,3 (p=0,004). On average, the decrease was -8,2 points in the group who listened to music, -5,7 in the magazine group, and -4,1 in the waiting room; the differences among groups in regard to STAI-S decreases were statistically significant (p=0,004). On average, plasma cortisol decreased 36,5 nmol/L, with the greatest decrease in the group who listened to music (-60 nmol/L), significantly greater than in the waiting-room (p<0,01). The cortisol decreased more in the morning, regardless of the intervention group. The average concentration of plasma testosterone decreased in the magazine group (-0,11 nmol/L) and in the music group (-0,08 nmol/L), but went up in the waiting room (0,06 nmol/L). The variation of plasma testosterone and of cortisol were significantly correlated (r=0,53, p<0,001). Blood pressure, both systolic and diastolic, decreased at all intervention groups; on average, the greatest decrease being in the magazine group, followed by the music group. The fetus heart rate was not statistically different among groups and did not change significantly before and after the amniocenteses. Maternal plasma cortisol exhibited evidence of a circadian oscillation, decreasing in the morning and increasing slightly after noon. Cortisol tended to increase with gestational age (r=0,19, p=0,01), was negatively correlated with the body mass index (r=-0,17, p=0,02) and, in the afternoon, correlated with the state of anxiety (r=0,22, p=0,05). Maternal cortisol also correlated with cortisol in the AF (r=0,3; p<0,001).

---

across all ranges of gestational age, both in anxious (STAI-S  $\geq 40$ ) and in non-anxious (STAI-S  $< 40$ ) women. The AF cortisol exhibited a circadian pattern which resembled the one found in the mother plasma, although less pronounced. As for plasma testosterone, older women tended to have lower concentrations than younger ones ( $r=-0,31$ ,  $p<0,001$ ) and there was a positive correlation with gestational age till 18 weeks, when the fetus was a female. Testosterone did not correlate with anxiety or any other maternal variables. Also there was no correlation between plasma testosterone and AF testosterone. In the AF, there was also no correlation between the concentrations of testosterone and cortisol.

There was no evidence for association between women's anxiety, evaluated in this study at amniocentesis, and gestational age at delivery. Nevertheless, the concentration of morning cortisol in maternal plasma associated with earlier deliveries ( $r=-0,25$ ;  $p=0,01$ ); the same was not observed for afternoon cortisol. There were 51% male newborns (NBs) and 49% females (respectively,  $n=94$  and  $90$ ). Boys weighted on average significantly more than females, respectively,  $3395$  and  $3136$  g ( $p<0.001$ ).

Male NBs had lower mean 2D:4D ratios than female NBs and the difference was significant for left hands (males:  $0.927$ ; females:  $0.950$ ;  $p=0.004$ ), but not for the right hands. The digital ratios of the NB females were negatively correlated with testosterone in the AF and positively correlated with their mother's hands. The digital ratios of the NB males did not show significant correlations with either hormones or their mother's hands. Testosterone in the mother's plasma was also negatively correlated, although not significantly, with the ratios of both hands of NBs and in both sexes. Mothers of NB males had lower digital ratios than mothers of NB females and the ratio of the mothers was higher than the ratio of their children, regardless of hand and of sex. The 2D:4D in the right hand of the mothers was positively correlated with both hands of NB females, but not with those of NB males.

**Discussion** – The average score of anxiety state (STAI-S) of women at arrival confirmed that the eminence of amniocentesis was perceived as an anxiogenic event by pregnant women. The anxiety trait (STAI-T), however, suggested that women in this study were not inherently anxious. The results presented here corroborate the hypothesis that even a short period of relaxation can have positive effects upon the psychological health of pregnant women going through stressful situations. Anxiety scores went down in all groups following the intervention, with decreases being significantly greater when relaxation involved music listening. Anxiety decreases were particularly good for the most anxious women, which tended to be the younger ones. The relaxation interventions also promoted decreases in plasma cortisol and testosterone and, overall, evidence was gathered that 30 minutes alone, particularly listening to self-chosen relaxing music, are sufficient to lower anxiety and cortisol levels. The mechanisms underlying the strong correlation found between the variation in testosterone and cortisol after the intervention are not clear. It

---

is conceivable that the same mechanisms that trigger short-term increases in cortisol and testosterone following acute stressful events may also act in the opposite way in response to relaxation.

STAI-S was the most important predictor of cortisol levels in the afternoon, but not in the morning, which corroborates previous reports regarding the absence of cortisol response to stress in the morning, eventually due to its already elevated basal level at that time of the day. Evidence was presented for a link between plasma and AF cortisol, namely a similitude in their circadian pattern and a significant correlation between them, suggesting that there is transport across the placenta. The absence of correlation between cortisol and testosterone in the AF contrasts with the results of Sarkar and collaborators who found a positive correlation in both sexes. This could of course be attributed to lack of statistical power caused by insufficient sample size in a context of great variability, but an alternative explanation is also possible, as the data suggest a more complex association between the two variables in the AF. The variability in testosterone appears to be gradually compressed, as the cortisol concentration increases above 30 nmol/L, a pattern shown clearly in both sexes and is described here for the first time.

Plasma cortisol in those who were more anxious, was negatively correlated with gestational age, thus the earlier the gestational age the higher tended to be cortisol, corroborating similar reports from previous authors. The lack of correlation between the women's anxiety trait (STAI-T) at amniocentesis and gestational age at delivery might have been due to the restricted range of numerical values for both STAI-T and gestational ages (35-41 weeks), as the exclusion criteria eliminated extreme values in the latter.

The results provided evidence that dimorphism in the 2D:4D ratio is already present at birth and, as anticipated, is higher in girls than in boys. Nevertheless differences are subtle and there is a large 2D:4D distribution overlap between sexes. The results also showed that the 2D:4D ratio increases from birth to adulthood, as the digital ratios of mothers were significantly higher than those in their newborns. The lower ratios found in mothers with newborn males as compared to those with females, support studies claiming an association between the levels of testosterone in ascendants at the time of conception and the sex of their offspring, with higher levels of androgens promoting the conception of male offspring. The mother's 2D:4D ratio was a significant predictor of the 2D:4D in both hands of newborn females, but not of males, and the AF testosterone also correlated with digit ratio in females, but not in males. The high levels of testosterone which are typical of males may promote higher variability in their finger development, thus spoiling eventual correlations with the mother's ratios. In this study, the 2D:4D sexual dimorphism in newborns was significant for the left but not for the right hand, contrasting with previous studies which have involved subjects older than 2 years of age. This suggests that post-natal exposition to androgens, especially in boys, is important for the accentuation of the dimorphism and for the stabilization of the ratio mainly in the right hand.

---

**Conclusion** – This study suggests that pregnant women would benefit from the routine practice of 30min relaxation when at the imminence of a stressful event. The benefit would be both psychological and physiological and would be more pronounced in the morning than in the afternoon. Women tending to be more anxious, typically younger and at a lower gestational age, are the ones that benefit the most. Among the interventions investigated, all being non-expensive and easy to implement, listening to relaxing music was globally the most efficient for the benefit intended.

The variation of cortisol and the variation of testosterone are significantly correlated, an association that might be used in future relaxation interventions. It is feasible to conceive short relaxation programs aimed at benefiting psychological well-being and health in pregnancy, with additional benefits for pregnancy outcome.

The digital ratio 2D:4D is sexually dimorphic, being lower in males than in females, confirming the influence of pre-natal androgens. There is however large overlap between sexes, rendering the 2D:4D a risk marker not to be used in isolation but rather in association with other markers, like for instance the weight at birth and the head circumference, wherein it may be a relevant parameter for pediatric follow-up.

In newborn females, a significant amount of variability in 2D:4D is accounted for by their mother's digital ratio and AF testosterone. In both sexes, the 2D:4D ratio increases following birth and sexual dimorphism, as assessed from samples of subjects with more than 2 years of age, is affected by post-natal testosterone, especially in what concerns the right hand.



# **1. Introdução**

---

**Partes dos artigos Ventura et al 2013a e 2013b, Ventura 2012, Ventura et al 2012 e Ventura et al 2009 foram usados neste capítulo**

---

## 1. Introdução

O bem-estar da grávida e do feto podem ser afectados pelos níveis de ansiedade ou *stress* durante a gravidez e estes, quando elevados, estão associados a maior probabilidade de ocorrência de parto pré-termo e de baixo peso à nascença (Field et al 2003, Van den Bergh et al 2005, Eskenazi et al 2007), bem como a problemas de desenvolvimento e comportamento ao longo da vida (Huizink et al 2004, Talge et al 2007, Foley et al 2008, Glover 2011). A sociedade e, em particular, a ciência têm um papel importante no modo como a gravidez é vivida, mas os achados científicos levantam por vezes expectativas que tardam em ter tradução no contexto social. É importante promover maior interligação entre os achados da ciência e a vivência da gravidez na sociedade.

O tema da interacção entre mãe e feto é desde há muito considerado relevante, havendo referências escritas em várias sociedades e culturas. “*The same soul governs the two bodies and the desires and fears and sorrows are common...*” é um comentário sugestivo de Leonardo da Vinci (Ferreira A 1965) a este propósito. Nas últimas décadas foi desenvolvida muita investigação nesta área. Hans Selye (1936) chamou pela primeira vez “síndrome de *stress*” a um conjunto de sinais e sintomas observados em ratos sujeitos a várias formas de agressão que apresentavam também produção aumentada de glucocorticóides. Publicações posteriores (Thompson 1957, Levine 1957) sugeriram que o ambiente in-útero pode interferir na forma como aspectos emocionais e comportamentais são expressos após o nascimento alterando as respostas ao *stress*. A hiperactividade, o défice de atenção (Stott D 1973) e o chamado “síndrome de *stress* fetal”, caracterizado pela restrição do crescimento do feto, redução do tempo de gestação e distúrbios no desenvolvimento neurológico (Stott G 1981, Lou et al 1994), são fenómenos associados e investigados desde há muito. Sontag (1941, 1944) publicou artigos seminais pondo em evidência a importância de diferentes ambientes oferecidos pela mãe enquanto grávida para o futuro indivíduo. Stott (1973) chamou a atenção para a relação entre *stress* antenatal e hiperactividade nas crianças.

Compreender a interacção do *stress* com a mãe e com o feto requer conhecimento de processos moleculares, celulares, de circuitos neuronais, função placentar, integrados muito possivelmente numa perspectiva evolutiva (Coe et al 2003, Weinstock 2007, O’Donnell 2012, Glover et al 2010, Glover 2011). A vastidão do tema impede a sua abordagem exaustiva nesta tese. Apenas aspectos parciais, necessários ao enquadramento teórico e para a compreensão dos objectivos e hipóteses formuladas, serão desenvolvidos.

Até agora, tem sido atribuída uma conotação predominantemente negativa aos efeitos mais investigados do *stress*. Mais recentemente, porém, outras conotações, possivelmente adaptativas, começam a emergir e sugerem que não podemos falar em efeitos bons ou maus em termos absolutos (Claessens et al 2011). Aspectos ambientais e genéticos estão intrinsecamente envolvidos na modulação dos resultados finais das experiências precoces do indivíduo.

A avaliação dos níveis hormonais no ambiente materno e fetal pode ser uma ferramenta de diagnóstico em situações de *stress* psicológico e dos riscos a ele associados (Fan et al 2009), uma vez que se encontrou correlação entre os níveis de ansiedade e os de cortisol no plasma (Sarkar et al 2006). Por outro lado, sabe-se que a testosterona tem um efeito organizacional no cérebro e no sistema vascular do feto e, após o nascimento, um efeito ativacional sobre os receptores de androgénios. Esses efeitos podem traduzir-se no aparecimento de indicadores antropométricos sexualmente dimórficos (Honekopp et al 2007, Vermeersch et al 2008). Atendendo ao que já se conhece sobre os efeitos do *stress* antenatal, é urgente investigar formas de intervenção que possam reduzir os efeitos adversos associados ao *stress* in-útero e encontrar possíveis bio-marcadores que o evidenciem, sendo essa a temática desta tese.

## 1.1 Definição de Conceitos

Vários conceitos utilizados neste manuscrito carecem de esclarecimento prévio sobre as suas interpretações:

*Homeostasia* – pode ser definida como o equilíbrio dinâmico complexo que assegura a existência da vida tal como a conhecemos (Charmandari et al 2005). Alguns autores consideram que depende do sistema de “luta ou fuga” que traduz a reacção ao *stress* do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e do eixo Hipotálamo-Hipófise-Supra-Renal (HHSR), e do sistema de “calma e conexão” (Moberg 1993, 2000) que traduz a reacção fisiológica à tranquilidade, ambos promovendo adaptações para otimizar as possibilidades de sobrevivência face às adversidades do meio ambiente.

*Alostasia* – o estado de alterações homeostáticas crónicas associadas a respostas adaptativas excessivas ou prolongadas, com as quais o indivíduo sobrevive, mas com consequências adversas (Charmandari et al 2005).

*Ansiedade* - é um estado transitório de elevada tensão associado a taquicardia, sudação, aumento da frequência respiratória, sensação de aperto no peito. Acompanha-se de apreensão ou medo em relação a algo, conhecido ou não. Quando arrastada, tem repercussões que se enquadram num síndrome de *stress*. Ansiedade e *stress* são frequentemente usadas alternadamente porque ansiedade reflecte uma dimensão particular de *stress* (Spielberger 1976).

*Stress* – o termo começou por ser utilizado em ciências biológicas e hoje é amplamente usado em psicologia. *Stricto sensu*, em inglês significa “contenção/ restrição”, mas é em geral entendido de forma mais lata, dependente da formação de quem usa o termo: “resposta global do organismo a uma exigência ou pressão externa, tendo o indivíduo a percepção que lhe é exigido mais do que as suas capacidades adaptativas para a situação em causa, sentindo o seu bem-estar ameaçado” (enciclopédia médica on-line), ou “qualquer coisa que induza produção aumentada de glucocorticóides” (Levine 2000), ou

---

“acontecimento ameaçador para o indivíduo que elícita respostas psicofisiológicas e comportamentais” (McEwen 2000).

*Stress antenatal* – é em geral definido como um conjunto de factores psicológicos identificados pela grávida como ameaçadores e que se associam à activação directa do eixo HHSR (Obel et al 2005) e será este o conceito usado nesta tese. Quando falamos de grávidas, no entanto, além de factores psicológicos, outros factores como infecções, desnutrição, patologia placentar, hipertensiva, trombofilias ou outra patologia materna, e até mesmo situações não patológicas, como trabalho exaustivo ou exercício físico excessivo, podem actuar como *stressores* e têm potencialmente consequências idênticas.

*Distress* – situação de inadaptação a variadas situações de *stress* agudo/crónico, ansiedade ou depressão, que são conceitos inter-relacionados, sendo o termo *stress* o mais abrangente (Glover 2011).

## 1.2 O eixo Hipotálamo-Hipófise-Supra-Renal-Gonadal em investigação relacionada com o *stress*

O eixo HHSR é simultaneamente mediador e alvo dos efeitos do *stress* e da ansiedade antenatal (O'Donnell et al 2012). Existe evidência de que a exposição do feto a quantidades excessivas de glucocorticóides (GC) produzidos pela mãe desencadeia um mecanismo programador de alteração da função do eixo HHSR no próprio feto (Harris and Seckl 2011), modificando-o de forma permanente. Este eixo é, por outro lado, um dos dois principais sistemas de resposta ao *stress* na mãe e no feto. O tipo e grau de *stress* experimentado pela grávida tem acção reprogramadora na função basal deste eixo no feto e nas suas respostas reactivas (Glover 2011). Há como que um reajuste no funcionamento do eixo no feto e esse mecanismo está subjacente à associação entre o *stress*/ansiedade antenatal e consequências adversas para a vida futura do indivíduo (Charil et al 2010). A função do eixo HHSR pode ainda variar com factores psicossociais, obstétricos e de desenvolvimento, com o sexo e, nas raparigas, com a idade da menarca (Oskis et al 2009).

Alguns autores consideram que a função das gónadas faz parte do eixo (HHSR-G), pois a produção de testosterona e de estradiol desde a vida in útero é influenciada também pelo *stress*, tanto em animais (Lilley et al 2010) como em humanos (Bergman et al 2010a). Um estudo encontrou correlação positiva entre cortisol e testosterona no líquido amniótico (LA), sugerindo que a exposição aumentada do feto ao cortisol pode estar associada também a uma exposição aumentada à testosterona (Sarkar et al 2007a). A exposição pré-natal ao *stress* e a níveis elevados de testosterona, tem consequências parcialmente semelhantes no neurodesenvolvimento do indivíduo, o que sugere interacção recíproca entre hipotálamo-hipófise-supra-renal e gónadas (Viau 2002); na verdade, alguns dos resultados da exposição à testosterona podem ser previstos a partir da exposição ao *stress* pré-natal, sugerindo que existe uma ligação entre os dois (Claessens et al 2011). A correlação positiva entre cortisol e testosterona encontrada no líquido

---

amniótico (Sarkar et al 2007a) e no plasma fetal (Gitau et al 2005,) sugere também actuação conjunta na resposta ao stress (Bergman et al 2010a). Tanto a testosterona como os GC, representados habitualmente pelo cortisol, têm sido associados a programação do eixo HHSR-G com repercussões no desenvolvimento e comportamento do feto (Harris et Seckl 2011). Alguns estudos prospectivos em humanos evidenciam ter existido activação ou supressão duradouras no eixo HHSR-G resultante de *stress*/ansiedade a que estiveram sujeitos durante a gravidez (Gutteling et al 2004, O'Connor et al 2005, Tollenaar et al 2010, Grant et al 2009). No modelo animal, verificou-se que essa alteração da programação das respostas do eixo HHSR-G é transmitida pelos primeiros descendentes a gerações subsequentes pela linhagem materna (Mathews and Phillips 2011). Nos humanos, os resultados de alguns estudos também sugerem transmissão dos filhos aos netos, conferindo ao tema uma importância inesperada em saúde pública (Secção 1.5.7).

Estudos anteriores encontraram evidência de que as intervenções de relaxamento estão associadas ao aumento da dopamina e à descida do cortisol e da noradrenalina (DiPietro et al 2008, Field et al 2004, Field et al 1999, Teixeira et al 2005). Estes estudos são ainda escassos, especialmente os que avaliam formas de intervenção em grávidas. As intervenções efectuadas pretenderam modificar o estado psicológico e a produção e/ou expressão hormonal que tinham sido previamente alteradas por situações de *stress*. Um exemplo de situação habitualmente associada a episódios agudos de ansiedade na grávida é a realização de exames invasivos em contexto clínico (Chang et al 2003, Hayes et al 2003). Por si só, estes episódios serão clinicamente irrelevantes para as consequências do *stress*. Contudo, a acumulação de episódios de ansiedade pode ter repercussões (Van Den Bergh et al 2005) e as intervenções relaxantes podem contribuir para melhorar o bem-estar da grávida e os seus resultados obstétricos (Alder et al 2011).

### 1.2.1 Mecanismos fisiológicos de resposta ao *stress* na gravidez

Em geral, os processos bioquímicos e fisiológicos dos sistemas de resposta ao *stress* asseguram um desempenho adequado do indivíduo no dia a dia. Níveis de ansiedade elevados e inabituais ou persistentes têm implicações negativas, mas nem todos os indivíduos são afectados da mesma maneira e a maioria não é sequer significativamente afectada (Glover 2011). Nos humanos e em mamíferos, em geral, o *stress* desencadeia uma rede de respostas que envolve a interligação de vários circuitos e que em seguida se procura sistematizar de forma não exaustiva:

Sistema **Neuroendócrino** - É composto por dois sistemas principais: 1) *sistema nervoso autónomo* (SNA) com respostas autónomas e imediatas mediadas por adrenalina e noradrenalina, e 2) *eixo HHSR* com respostas mais lentas e adaptativas mediadas por GC, adrenocorticotropina (ACTH) e hormona corticotropica (CRH). Alguns autores englobam também neste sistema as gónadas e a sua produção de androgénios e estrogénios (eixo HHSR-G). Este eixo é regulado por um sistema de *feedback* negativo, isto é,

---

o aumento da produção de GC na supra-renal, suprime ou reduz a produção de CRH do hipotálamo (Tsigos et Chrousos 2002). Sinais neuroquímicos resultantes da sensação de ameaça chegam ao núcleo paraventricular do hipotálamo onde é libertada CRH que vai actuar de imediato na hipófise de onde a ACTH é libertada, induzindo, por sua vez, secreção de GC nas supra-renais, que actuam depois em receptores específicos no hipocampo e em outras zonas do SNC, desligando a resposta ao *stress* e restaurando o equilíbrio (Ligtman 1989, Herman 1989, Avishai-Eliner et al 2002). A integridade dos mecanismos de activação e desactivação do eixo HHSR-G é fundamental para a homeostasia em situações de *stress* agudo, evitando lesões provocadas por exposição a doses elevadas de GC (McEwen 1999). Este mecanismo é especialmente importante na fase precoce de desenvolvimento fetal, em que a exposição persistente a níveis inadequados de GC e de testosterona (T) pode alterar processos de crescimento e de maturação (Avishai-Eliner et al 2002). Perante um estímulo interno como dor, tensão ou preocupação, o ramo simpático (activador) do SNA aumenta a sua actividade e o parassimpático (inibidor) reduz a actividade (Pinel 2006). Em consequência, aumenta a frequência cardíaca e o sangue é redistribuído nos vasos sanguíneos, favorecendo o sistema muscular em prejuízo do tubo digestivo (Krout 2007). Adrenalina e noradrenalina, mediadores do SNA, e cortisol, mediador do eixo HHSR, actuam sinergicamente no músculo favorecendo a disponibilidade local de glucose para consumo imediato e para manter níveis adequados de glicemia (Pinel 2006). Ao contrário do *stress* prolongado, associado a inibição da libertação de Hormona Luteinizante (LH), o *stress* agudo associa-se a subida curta e transitória de LH e de testosterona, possivelmente resultante de alterações no volume plasmático e redução da metabolização hepática (Rivier et al 1991).

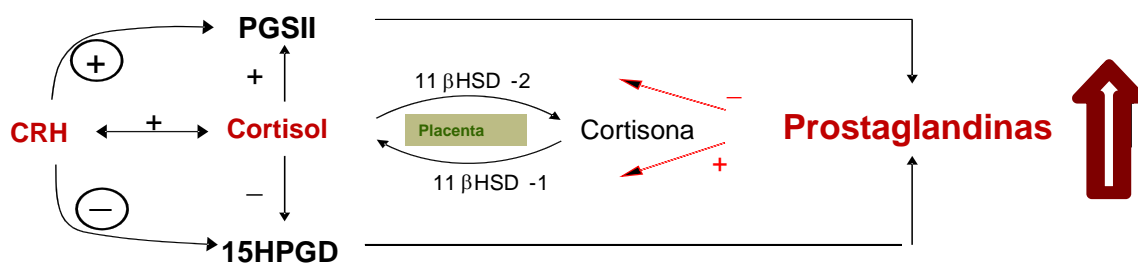
Estruturas do **Sistema Nervoso Central** (SNC) – Incluem o *córtex pré-frontal*, onde é feita a avaliação discriminativa dos estímulos psicológicos, o *sistema límbico*, considerado o centro das emoções, destacando-se a amígdala<sup>1</sup>, pequena estrutura com papel essencial na mediação do medo, da ansiedade, na regulação do humor e das respostas motoras associadas, o *hipotálamo* (local de produção de CRH) e a *hipófise* (local de produção da ACTH). Sinais emocionais e cognitivos de *stress* induzem precocemente no sistema límbico modulação da expressão genética que influencia, entre outras coisas, a consolidação da memória. Pensa-se que seja também a CRH, abundante na amígdala, hipocampo e áreas do córtex límbico (Behan 1997, citado em Avishai-Eliner et al 2002), o principal mediador deste processo, mas falta ainda entender muito sobre a identidade dos moduladores que actuam nestas estruturas.

Passemos agora aos mecanismos de resposta ao *stress* na gravidez. Numa gravidez normal, a produção de CRH na placenta ocorre habitualmente em quantidades crescentes desde o segundo trimestre, subindo

---

<sup>1</sup> Nos primatas existem fibras de ligação entre o sistema sensorial e o sistema motor, o que ajuda a compreender que o *stress* psicológico possa associar-se a respostas físicas de violência.

exponencialmente nas seis semanas que antecedem o parto (Hobel et al 1999). É regulada por factores enzimáticos locais do coriotrofoblasto, em particular pelas enzimas  $11\beta$  hidroxisteroide desidrogenase tipo 1 e tipo 2 ( $11\beta$  HSD 1 e 2). Estas enzimas regulam, respectivamente, a conversão da cortisona (inactiva biologicamente) em cortisol e do cortisol em cortisona (Charmandari et al 2005, Tomlinson et al 2004). As situações de *stress* parecem interferir na função e expressão destes enzimas. O próprio feto, através da sua produção autónoma de GC, vai progressivamente interferindo na produção de CRH placentar (Weiss 2000). O aumento progressivo do cortisol e da CRH, por sua vez, vai interferir na função de outros enzimas locais<sup>2</sup> capazes de estimular o aumento de prostaglandinas (PG), as quais promovem as contracções no músculo uterino levando ao parto (Majzoub et al 1999, Challis et al 2001) (Figura 1.1). O aumento exponencial do CRH e cortisol nas semanas que antecedem o parto tem por finalidade, por um lado, assegurar a maturação dos órgãos fetais de transição do meio intra-uterino (aquático) para o meio extra-uterino (aéreo), nomeadamente pulmões e cérebro, assegurando a viabilidade dos fetos mesmo quando nascem prematuramente. Por outro lado, vai preparar e estimular o miométrio e as membranas fetais a fim de desencadear o parto (Crespi et Denver 2005).



**PGSII** = Prostaglandina sintetase tipo II  
**15 H PGD** = 15 -hidroxiprostaglandina desidrogenase  
**11  $\beta$  HSD** = 11  $\beta$  hidroxisteroide desidrogenase (tipos 1 ou 2)

Figura 1.1 – Interacção do cortisol e CRH na produção de prostaglandinas. (Adaptado de Challis et al 2001). O cortisol aumenta a expressão da PGSII e reduz a expressão da 15HPGD nas membranas fetais, levando ao aumento das prostaglandinas (PG). As PG, por seu lado, vão interferir no sistema enzimático placentar, aumentando a expressão e actividade da  $11\beta$ HSD tipo1 no coriotrofoblasto, levando ao aumento de conversão local de cortisona em cortisol. O cortisol, local ou sistémico, leva ao aumento da CRH nas membranas placentárias. A CRH também interfere com a produção de PG, mas através dos receptores no segmento inferior do útero, onde promove o relaxamento.

<sup>2</sup> Estimula a Prostaglandina Sintetase tipo II (PGHS), que induz a produção de prostaglandinas, e inibe a função da 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase (PGDH), responsável pela sua degradação.

### 1.2.1.1 Cortisol

O cortisol é produzido principalmente na zona fasciculada do córtex supra-renal (SR) (90%); cerca de 10% periféricamente. A sua circulação exhibe uma oscilação circadiana regular ao longo das 24 horas (de Weerth et al 2003). A concentração do cortisol ao acordar (conhecida pela sigla CAR, de *cortisol awakening response*) em indivíduos normais caracteriza-se por uma subida rápida (50-75%) 30 a 60 min após o acordar (Pruessner et al 1997). Correlaciona-se com a resposta hormonal induzida pela ACTH na SR, o que sugere ser um marcador da actividade adrenocorticotrópica (Schmidt-Reinwald et al 1999), mas é independente da secreção diária de cortisol (Wilhelm et al 2007) e da secreção em resposta ao *stress* (Engert et al 2011). Ao CAR segue-se um declínio gradual nos valores de cortisol ao longo do dia, até ao seu valor mínimo 2-3 h após o início do sono noturno (Doman et al 1986). A produção diária de cortisol é de 10-20 mg por dia. Circula ligado à globulina específica circulante (CBG) e apenas 4% circula livre, com capacidade para se ligar aos respectivos receptores distribuídos por muitos tecidos e órgãos. O seu padrão circadiano traduz-se, como já referido, por valores mais elevados de manhã, com descida abrupta até às 12h, continuando a descer mais gradualmente até às 24h, apresentando os níveis mais baixos a meio da noite ou 2-3h após o início do sono, e recomeçando a subir desde essa altura até às 8h da manhã (Knutsson et al 1997). A informação sobre o ciclo luz-escuridão, subjacente a este processo, é transmitida a partir da retina aos núcleos supra-quiasmáticos do hipotálamo (Weitzman et al 1971). O padrão descrito não está estabelecido à nascença, estima-se que se desenvolva entre as 2 semanas e os 9 meses após o nascimento (de Weerth et al 2003).

A concentração normal de cortisol às 9h da manhã localiza-se no intervalo 180-620 nmol/l. Nas grávidas, porém, a concentração é maior e varia com o tempo de gestação. A libertação é controlada pelo hipotálamo, através da produção de CRH que vai desencadear na parte anterior da hipófise a secreção de ACTH, a qual por via sanguínea atinge o córtex da SR, onde desencadeia a produção de glucocorticóides e mineralocorticóides (Bernardi et al 1991). O cortisol é uma molécula muito parecida com a aldosterona, um mineralocorticoide, esta produzida na zona glomerulosa da SR também em resposta à ACTH, pelo que o cortisol também se liga aos receptores dos mineralocorticoides. A enzima 11 $\beta$  HSD2 controla a sua acção nos receptores de mineralocorticoides e o sistema enzimático 11 $\beta$  HSD, abundante na placenta, regula a sua produção. Também as redutases (5 $\beta$  e 5 $\alpha$ ) estão envolvidas no controlo dos níveis plasmáticos na grávida, pois participam na sua metabolização em tetrahydrocortisol (Bernardi et al 1991). O cortisol é o neurotransmissor mais lipófilo, tendo por isso mais capacidade para atravessar a placenta e alcançar o feto. A sua função principal é assegurar a manutenção de níveis adequados de glucose no sangue através da glicogenólise, interferindo no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas. É libertado em resposta ao *stress* e a níveis sanguíneos baixos de glucocorticóides. Tem acção supressora no sistema



---

imunitário, pelo que as grávidas podem ter mais complicações associadas a situações infecciosas (Charmandari et al, 2005). Ao longo da gravidez normal há um estado de hipercortisolismo fisiológico. O eixo HHSR apresenta-se refractário, permitindo o aumento progressivo dos níveis de cortisol, os quais atingem o máximo no terceiro trimestre (Challis et al 2001). Esse aumento do cortisol vai estimular a formação de receptores para a CRH em algumas regiões do cérebro, entre as quais algumas zonas do sistema límbico (Carr et al 1981) e também na placenta e no miométrio (Hillhouse et al 1993). O cortisol participa no controlo da actividade de muitos sistemas metabólicos e imunitários, bem como no sistema reprodutivo. A produção de cortisol, que se apresenta duas a quatro vezes aumentada no final da gravidez, desencadeia o início da produção de surfactante no feto a partir das 30-32 semanas, promovendo a maturação pulmonar. Formas sintéticas de cortisol, aliás, são por vezes usadas com este objectivo.

Na resposta ao *stress*, a cascata hormonal pode variar um pouco de espécie para espécie. O rato, por exemplo, não produz cortisol mas sim corticosterona, a qual desempenha funções equivalentes ao cortisol na espécie humana, onde é o GC dominante. A corticosterona nos humanos, pelo contrário, tem produção escassa e pouca expressão fisiológica, com funções indirectas na regulação final dos níveis de sódio e potássio (Bernardi et al 1991), não se relacionando com a resposta ao *stress*.

### 1.2.1.2 Testosterona

Na mulher, a testosterona é secretada maioritariamente nas células da teca no ovário, mas também nas supra-renais. Uma quantidade significativa é ainda produzida pela conversão periférica (pele), de androstenodiona e dihidroepiandrosterona (DHEA), sendo depois reduzida localmente (cerca de 7%) pela  $5\alpha$  redutase em dihidrotestosterona (DHT) (Mooradian et al 1987). A hormona luteinizante (LH) e a ACTH regulam, respectivamente, a produção de androgénios pelo ovário (testosterona e androstenodiona) e pelas supra-renais (essencialmente DHEA). A testosterona circulante está quase toda ligada a uma proteína conhecida por Sex Hormone Binding Globuline (SHBG), sendo biologicamente activa apenas a testosterona que se encontra livre (cerca de 1%) (Speroff et Fritz 2005). A metabolização da testosterona é predominantemente hepática, sendo depois excretada na urina (90%) e nas fezes; a sua semivida é de 2-4 horas e, como se viu, tem baixa biodisponibilidade. Na grávida, é metabolizada também na placenta, onde existe grande capacidade de produção de  $17\beta$  estradiol a partir da testosterona, regulada pela acção da enzima aromatase. Este processo é tão eficiente que poucos androgénios escapam à regulação, mesmo na presença de tumores produtores de androgénios (Speroff et Fritz 2005). Assim, mesmo quando existem altos níveis de testosterona na mãe, estes têm uma capacidade limitada de influenciar os níveis de testosterona no feto (Cohen-Bendahan et al 2005b). A conversão de testosterona em estradiol pela aromatase também ocorre em outros órgãos, como o cérebro, fígado e tecido adiposo, embora em muito pequena percentagem (cerca de 0,3%) (Meinhardt et Mullis 2002, Mooradian et al 1987).

Os valores normais da concentração de testosterona no plasma da mulher variam no intervalo 0.5-2.6 nmol/l (Turner et Was 2009). Os seus efeitos nos humanos, e em vertebrados em geral, fazem-se sentir através de dois mecanismos principais: a activação directa (ou através da DHT) do receptor de androgénio, e a conversão em estradiol seguida de activação selectiva de receptores de estrogénios (Hiipakka et Liao 1998, McPhaul et Young 2001). Através de um mecanismo de feedback negativo sobre o hipotálamo e a hipófise, níveis de testosterona elevados inibem, respectivamente, a libertação de CRH e de LH, conduzindo à redução da sua própria produção nas gónadas (Swerdloff et al 1992). A produção de testosterona nas gónadas é reduzida na sequência da activação prolongada do eixo HHSR-G. Esta ideia é corroborada por estudos efectuados em atletas envolvidos em exercício físico prolongado, como corredores de maratona e bailarinos, que mostraram presença de níveis plasmáticos elevados de cortisol, aumento da sua excreção na urina, baixos níveis de testosterona no plasma e níveis baixos de hormona libertadora de gonadotropinas (GRH) de origem hipotalâmica (Mac Connie et al 1986, Luger et al 1987).

Os receptores de androgénios (e de estrogénios) encontram-se distribuídos por muitos órgãos e tecidos. As respostas de indivíduos masculinos e femininos aos diferentes níveis circulantes desde a fase pré-natal, na puberdade e pela vida fora, explicam o conhecido dimorfismo sexual de certos caracteres fenotípicos. O pico de testosterona no plasma do feto ocorre entre as 14 e as 18 semanas e pensa-se que a maioria dos efeitos androgénicos ocorre entre as 7 e 12 semanas (Finegan et al 1989, Prince 2001). Apesar disso, no LA não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de testosterona ao longo dos trimestres de gestação (Sarkar et al 2007a), mas pensa-se que a testosterona fetal chega ao LA desde cedo, por difusão através da pele do feto e mais tarde através da urina (Nagami et al 1979, Klopper 1970, Robinson et al 1977). Ao contrário do que é observado em adultos sujeitos a *stress*, Sarkar et al (2008) encontraram uma correlação positiva entre cortisol e testosterona no LA de fetos masculinos e femininos, independente da ansiedade materna, da testosterona plasmática na mãe, da idade gestacional e da hora de colheita. Gitau et al (2005) encontraram o mesmo no plasma de fetos. Sabe-se que o *stress* se associa a níveis plasmáticos mais elevados de cortisol. De acordo com os resultados daqueles estudos, no feto poderá também associar-se a níveis aumentados de testosterona.

### 1.2.1.3 Outros mecanismos envolvidos no *stress* antenatal

Apresenta-se em seguida informação resumida sobre mecanismos hormonais e fisiológicos relevantes neste estudo, os quais serão posteriormente desenvolvidos em secções próprias.

SNC - Para manter a homeostasia e assegurar a sobrevivência em resposta ao *stress*, o Sistema Nervoso Central emite respostas comportamentais autónomas e cognitivas rápidas, através, por um lado, da

formação e libertação de moléculas e, por outro, da alteração da função e expressão de genes, podendo também rapidamente regressar ao seu estado basal (McEwen 1998). Esta capacidade de iniciar rapidamente a secreção de noradrenalina (NA) e de glucocorticóides e de efectivar alterações coordenadas na expressão genética, amplia a comunicação neuronal e permite a sobrevivência, mas por outro lado pode alterar imediatamente ou a longo prazo a função e integridade dos neurónios (Avishai-Eliner et al 2002). As relações entre o córtex pré-frontal<sup>3</sup> e a amígdala (secção 1.2.4.2), são fundamentais para o estabelecimento de comportamentos emocionais adequados e respondem a estímulos que necessitam de processamento discriminativo, nomeadamente o *stress* psicológico (Carlson et Glick 1989). Outros factores de *stress*, como a desnutrição ou a actividade física excessiva, embora activem também o eixo HHSR-G (Charmandari et al 2003) e possam levar a modificações epigenéticas (secção 1.2.4.7), não envolvem estes centros.

CRH – A *Corticotropin-Releasing Hormone* é o principal regulador hipotalâmico do eixo HHSR-G, estimulando a secreção de LH e de ACTH a partir da hipófise anterior, os quais por sua vez vão actuar respectivamente sobre as gónadas e sobre as supra-renais. A expressão genética da CRH aumenta na presença de estrogénios, sendo o gene da CRH um potencial mediador das diferenças entre sexos observadas na resposta ao *stress* e na activação do eixo HHSR (Grammatopoulos et Chrousos 2002). Os receptores da CRH têm sido detectados em várias zonas do SNC fora do hipotálamo, incluindo prosencéfalo, tronco cerebral, medula espinal e também na placenta (Majzoub et al 1999). Em modelos animais, a administração de CRH nos ventrículos cerebrais levou à activação do eixo HHSR e SNA (ramo simpático) e a respostas periféricas e comportamentais, sugerindo que desempenha um papel importante na coordenação das respostas ao *stress* (Tsigos et Chrousos 2002, Charmandari et al 2005). Na placenta, ao contrário do que acontece no hipotálamo, os glucocorticóides activam o gene promotor da CRH, estabelecendo um padrão de *feedback* positivo e permitindo o progressivo aumento de CRH e GC verificado na gravidez (Avishai-Eliner et al 2002). A progesterona compete com o cortisol na ligação aos receptores de GC e funciona como travão do sistema placentar, tendo um papel regulador no aumento da CRH. O efeito inibitório da progesterona é bloqueado por níveis elevados de cortisol, os quais fazem subir a expressão da CRH na placenta. Esta expressão aumentada traduz-se num número crescente de receptores que apresentam maior actividade e que iniciam uma sequência de alterações bioquímicas, envolvendo as prostaglandinas e a ocitocina. Estas substâncias vão actuar sobre o colo do útero, as membranas amnióticas e o miométrio, tendo como resultado final o parto (Majzoub et al 1999). Tanto situações de *stress* ante natal crónico como agudo induzem o aumento da produção de CRH na placenta, a qual pode penetrar a barreira hemato-encefálica do feto e influenciar a função e integridade do hipocampo (Avishai-Eliner et al 2002).

---

<sup>3</sup> Parte mais anterior do lobo frontal onde é interligada informação e delineadas estratégias de actuação

---

Enzimas - O sistema enzimático 11 $\beta$ HSD tipo 1 e 2 encontra-se em vários tecidos do organismo, desempenhando um papel especialmente importante na placenta (secção 1.3.2), onde parece estar envolvido na mediação dos efeitos do *stress* materno sobre o feto (O'Donnell et al 2012, Holmes et al 2006, McTernan et al 2001). A expressão da 11 $\beta$ HSD tipo 2 na placenta aparentou estar reduzida em mães mais ansiosas (O'Donnell et al 2012, Wachter et al 2009), mas em mães deprimidas com fetos femininos a actividade da enzima aparentou estar aumentada (O'Donnell et al 2012). Estes achados sugerem haver interacção entre o estado emocional da mãe e a função enzimática placentar, modelada pelo sexo do feto.

Fluxo placentar – Foi encontrada associação entre ansiedade materna e aumento da resistência no fluxo da artéria uterina (Teixeira et al 1999), evidenciando também a possibilidade de interacção entre o estado psicológico da mãe e o desenvolvimento comprometido do feto, com associação a baixo peso ao nascer.

### 1.3 Mecanismos de transferência do *stress* materno para o feto

A importância do *stress* na grávida, deve-se às repercussões potencialmente lesivas que pode ter para o feto, as quais têm sido validadas por resultados concordantes obtidos em animais e em humanos. Algumas dessas repercussões são desenvolvidas noutras secções deste documento e envolvem aspectos comportamentais, cognitivos e emocionais, bem como interferência no peso ao nascer e na idade gestacional no parto (Dawson et Woon 2011, Buitelaar et al 2003, Kim et al 2006, Peterson 2000). Quando os sistemas de resposta ao *stress* deixam de ser apenas adaptativos e de se cingir a assegurar o bem-estar do indivíduo, interferem no crescimento e desenvolvimento e podem conduzir a problemas metabólicos, endócrinos, auto-imunes e psiquiátricos (Carmandari et Chrosus 2005) e eventualmente a alterações na memória e a demência no adulto (McEwen 1999, 2000). A hipótese explicativa mais investigada para os mecanismos subjacentes a estas alterações na criança e no adulto, relaciona-as com exposição a níveis elevados de glucocorticóides de origem materna resultantes do *stress*, em períodos críticos do desenvolvimento fetal. Essa exposição fetal levará a alterações no desenvolvimento cerebral e no funcionamento do eixo HHSR-G (Van den Bergh et al 2005; Cottrell and Seckl 2009; Harris and Seckl 2011; Charil et al 2010; Glover et al 2010).

Além da produção aumentada de cortisol, haverá outros processos envolvidos na mediação dos efeitos do ambiente materno sobre o feto. A grande variabilidade encontrada na reprogramação do eixo HHSR, e as consequências diferenciadas de acordo com a natureza específica do ambiente gestacional, sugerem mecanismos evolutivos, que para alguns autores traduzem eventuais benefícios adaptativos (Glover 2011). Os níveis hormonais e a função enzimática placentar parecem estar interrelacionados.

### 1.3.1 Níveis hormonais da mãe

Alterações nos padrões de cortisol sérico encontradas em situações como estados de depressão, *stress* psicológico, hipoglicemia, febre, cirurgia, medo, dor, exaustão física, temperaturas extremas, autismo, entre outras, resultam da produção inibida ou aumentada de ACTH (Charmandari et al 2005) como o demonstram experiências em modelos animais. A variação na produção do ACTH, por sua vez, é mediada pelo menos parcialmente por níveis elevados de GC (Seckl and Holmes 2007). A título exemplificativo, quando se administrou ACTH a macacas Rhesus, a produção de cortisol aumentou e as crias mostraram alterações no neurodesenvolvimento, semelhantes às observadas em resposta ao *stress* antenatal (Schneider et al 1992). Num outro exemplo, a adrenalectomia administrada em ratos preveniu os efeitos do *stress* antenatal e a administração de corticosterona reintroduziu esses efeitos (Barbazanges et al 1996, Weinstock 2008).

A produção de CRH na placenta humana e o consequente aumento progressivo de cortisol durante a gravidez introduz características únicas à função do eixo HHSR-G, pois diferem da maioria dos modelos animais (Petraglia et al 1987). Nos humanos, encontrou-se uma redução progressiva na resposta do eixo HHSR resultante de *stress* induzido por exposição prolongada ao frio, ocorrida durante acidentes naturais (Kammerer et al 2002). No último trimestre não foi encontrada associação entre ansiedade/*stress* materno e níveis plasmáticos de cortisol (Sarkar et al 2007b), ou foi fraca e apenas detectada à noite (Obel et al 2005). Na espécie humana, os níveis de cortisol e de testosterona maternos parecem estar envolvidos na programação fetal (Secção 1.5.6). Numa pequena análise *in vitro* de amostras de fragmentos de cérebros fetais expostos a elevados níveis de cortisol, constatou-se alteração na expressão de mais de mil genes, principalmente os envolvidos no crescimento celular e no metabolismo (Salaria et al 2006), resultados que evidenciam a relevância da relação entre cortisol e alterações no neurodesenvolvimento fetal. Experiências em ratos, mostraram que períodos de *stress* ou de ansiedade na mãe durante a gravidez induzem níveis de GC elevados no sangue, os quais atravessam a placenta e penetram no ambiente fetal (Mairesse et al 2007).

### 1.3.2 Sistema enzimático placentar

A placenta apresenta um conjunto de enzimas que regulam as trocas entre mãe e feto, a chamada “barreira enzimática” da placenta. Esta barreira envolve, entre outras, a 11 $\beta$  hidroxisteroide desidrogenase (11 $\beta$  HSD) tipos 1 e 2, que regulam, como já foi dito, a inter conversão entre cortisona e cortisol (Brown et al 1993, O’Donnell et al 2009) e a aromatase, que regula a conversão de testosterona em estradiol (Speroff et Fritz 2005). A 11 $\beta$  HSD tipo 2 tem expressão essencialmente no sinciotrofoblasto (Sun et al 1997), prevenindo a passagem da maior parte do cortisol materno para o feto. Gitau et al (1998)

---

encontraram concentrações de cortisol na mãe cerca de 13 vezes superiores às do feto e 28 vezes superiores às do líquido amniótico (LA) (Sarkar et al 2007b), logo, alterações na função desta enzima, mesmo quando os níveis hormonais na mãe são normais, podem associar-se ao aumento de exposição fetal ao cortisol. Em ratos, o *stress* na última semana de gestação foi associado à redução da actividade e expressão genética da 11 $\beta$  HSD tipo 2 (Mairesse et al 2007). Quando lhes foi administrada carbenoxolona, um inibidor da 11 $\beta$  HSD 2, verificou-se expressão aumentada de mRNA nos receptores de GC, o que levou a programação da amígdala, com aumento da ansiedade pós-natal e comportamentos idênticos aos encontrados em animais sujeitos a *stress* durante a gestação (Welberg et al 2000). Também a reprodução heterozigótica de camundongos com ausência da enzima (por mutação) mostrou resultados idênticos (Holmes et al 2006).

Em humanos, O'Donnell et al (2012) encontraram reduzida expressão genética de 11 $\beta$  HSD 2 na placenta de grávidas com traço de ansiedade elevado submetidas a cesariana electiva (O'Donnell et al 2012) e nos fetos femininos, mas não nos masculinos, a placenta tinha a actividade enzimática aumentada, o que sugere diferenças entre os sexos no seu funcionamento. Embora não se conheçam as bases moleculares que medeiam a ansiedade e a expressão reduzida da enzima, é possível que seja o Sistema Nervoso Simpático, pelo menos parcialmente, o mediador deste processo (Charmandari et al 2005, Bornstein et Chrousos 1999) e que, durante a gravidez, o SNS seja mais reactivo à ansiedade/*stress* do que o eixo HHSR-G, que se vai tornando refractário (Charmandari et al 2005, O'Donnell et al 2012). A corroborar esta hipótese, Sarkar et al (2001) num estudo com células do trofoblasto humano, verificaram que a noradrenalina (NA) inibia a expressão genética da 11 $\beta$  HSD tipo 2. Num outro estudo (Chisaka et al 2005) as citocinas inflamatórias mostraram também reduzir a actividade e expressão genética da enzima. A aromatase, por sua vez, parece ter actividade alterada em situações de fluxo placentar comprometido (também constatado em situações de ansiedade – secção 1.2.1.3), pois encontrou-se associação positiva entre gravidade da pré-eclâmpsia e níveis de 17 $\beta$ -estradiol e seus metabolitos no plasma (Hertig et al 2010). A regulação da actividade enzimática na placenta, pode portanto ser um possível mecanismo mediador da programação fetal resultante da ansiedade ou *stress* da mãe na gravidez (O'Donnell et al 2012), com diferenças entre sexos.

#### 1.4 Formas de investigação do *stress* antenatal

Por razões éticas compreensíveis, a investigação do comportamento individual e da biofuncionalidade de órgãos e sistemas é mais acessível através de experimentação animal do que em humanos. Apesar disso, vários estudos têm sido efectuados em humanos (de Weerth et Buitelaar 2005), embora nestes haja muitos factores que contribuem para a variabilidade dos resultados, individualmente ou interagindo. Além de factores genéticos, há também factores sociais ou de personalidade e é necessário ter em conta

---

comportamentos “compensatórios” como tabagismo, alcoolismo, alterações alimentares, entre outros, que podem, por si só, associar-se a situações de baixo peso ao nascer e a prematuridade, confundindo ou potenciando efeitos também desencadeados pela acção do *stress* (Morken et al 2006, Zhu et al 2010). Além disso, a situação pós natal, como o bem-estar psicológico da mãe e a qualidade da interacção mãe-filho, são também fundamentais para reduzir ou intensificar os efeitos negativos do *stress* que possam ter tido lugar durante a gravidez (Caldji et al 2000, Bergman et al 2010b).

É importante a correcta e objectiva caracterização de todos os factores envolvidos. É essencial saber classificar esses factores como independentes, de confundimento, ou de interacção, nomeadamente recorrendo a métodos estatísticos multivariados envolvendo formas directas e indirectas de avaliação. Como exemplos de métodos indirectos, a medição da frequência cardíaca fetal dá informação sobre o desenvolvimento de redes neuronais no feto (Kisilevsky et al 2010), as variações no pulso e na pressão arterial na mãe (DiPietro et al 2004, Monk et al 2000) e os doseamentos hormonais e de neurotransmissores dão informações sobre a função dos eixos hormonais. Exames imagiológicos, como a ressonância magnética funcional (fMRI) (Paus et al 2008, Rapaport et al 2001) e a espectroscopia quase infravermelha (NIRS), detectam actividade no córtex cerebral, sem efeitos nocivos aparentes para a grávida (Roos et al 2011) e permitem o acesso a processamentos sensoriais. A ecografia-doppler em três ou quatro dimensões foi utilizada para estudos comportamentais do feto e seu desenvolvimento cerebral (Emory 2010), a tomografia óptica tridimensional para reconhecimento cerebral de emoções (Bluestone et al 2001) e outras técnicas de imagem para avaliação do sistema límbico (Bremner 2004). Testes e questionários psicológicos padronizados, como o questionário de Spielberger usado neste estudo, são também formas possíveis de investigação da ansiedade no ser humano.

Uma forma objectiva de estudar os efeitos do *stress* em humanos envolve estudos prospectivos de *follow-up* de coortes, por exemplo, após desastres naturais como terremotos (Glynn et al 2001), ou tempestades de neve (King et Lapalante 2005a), ou em grávidas sujeitas a perdas familiares, de emprego, ou com vida profissional muito agitada (Wadhwa et al 1993). Também se pode recorrer a estudos retrospectivos para avaliar o impacto de desastres naturais como inundações (Selten et al 1999), ataques terroristas (Berkowitz et al 2003) ou acidentes nucleares (Huzink et al 2007a,b).

#### 1.4.1 Questionário de Spielberger - Avaliação do Estado e do Traço de Ansiedade de Spielberger (State and Trait Anxiety Inventory – STAI: S e T)

A avaliação comportamental recorre frequentemente ao preenchimento de questionários padronizados e validados. O questionário de Spielberger é um teste de avaliação psicológica, amplamente utilizado em muitos países, e aplicado às participantes deste estudo. Os seus autores, Spielberger et al (1970),

procuraram desenvolver um instrumento de auto-avaliação da ansiedade, em que o Estado (como se sente neste momento) e o Traço (como se sente habitualmente) fossem avaliados separadamente. As qualidades avaliadas no “Estado” são sentimentos de apreensão, tensão, nervosismo e preocupação, pretendendo ser um indicador sensível a mudanças de ansiedade rápidas e transitórias (Daniel et al 2006). A escala do “Traço” é utilizada na clínica e em investigação para identificar elevados níveis de ansiedade, sendo as pontuações altas habituais em psiconeuróticos e deprimidos (Anexo III).

### 1.5 Repercussões do *stress* antenatal sobre o indivíduo: do feto ao adulto

Como já foi referido, os diferentes fenótipos encontrados no indivíduo após o nascimento dependem do sexo do feto (Kim et al 2006, Weinstock 2008). Esses fenótipos resultam do desenvolvimento em diferentes ambientes hormonais maternos, da idade gestacional em que ocorrem, da intensidade e da duração do estímulo de *stress* (Weinstock 1997, 2001, Newell-Morris 1989). Pensa-se que se possam dever a modificações epigenéticas na expressão dos genes (Ellison 2010) que são depois integradas na meiose e transmitidas às gerações seguintes (Talge et al 2007, Glover et al 2010). Os efeitos têm sido demonstrados em todas as espécies estudadas (Claessens et al 2011) e o significado adaptativo da programação fetal é tema de debate. É possível que esses efeitos tenham um significado adaptativo e evolutivo, e que o objectivo seja preparar o indivíduo para sobreviver em ambientes mais exigentes (Ellison 2010, Glover 2011). A ansiedade reflecte essa sensação de ameaça mais do que a depressão ou outras formas de *distress* (Glover 2011) e parece promover também mais efeitos programadores (O’Connor et al 2003, 2005). A investigação mais recente sugere que vários componentes ambientais, cognitivos e genéticos estão envolvidos numa forma intrincada na modulação dos resultados finais destas experiências precoces, mas há grande variabilidade de resultados, pelo que essas experiências não serão necessariamente determinísticas ou fatalistas (Claessens et al 2011).

Os acontecimentos emocionais licitam respostas que envolvem cortisol e adrenalina no armazenamento de memórias a curto prazo. A exposição prolongada ao cortisol danifica células do hipocampo e prejudica a memória e a aprendizagem (Mc Auley et al 2009). O cortisol controla também a gliconeogénese hepática (conducente a aumento da glicemia), o aumento da resistência à insulina, a diminuição do sistema imunitário (feedback negativo na interleucina-1) e da formação óssea (Chrousos et al 2005). Condiciona ainda o aumento da tensão arterial, por induzir maior sensibilidade vascular à adrenalina e noradrenalina, e reduz a fertilidade (Tsigos et al 2002, de Quervain et al 1998).

A testosterona produzida, por outro lado, sendo regulada pelo eixo HHSR-G, diminui com o *stress* no homem e aumenta na mulher decorrente da produção na supra-renal (James 1996), embora a produção nos ovários também seja reduzida. A acção da aromatase e as concentrações da T no plasma variam com a



---

idade (redução) e com a perda de peso (aumento) (Hiipakka et Liao 1998, McPhaul et Young 2001). Os efeitos da testosterona fazem-se sentir através da activação dos receptores de androgénios quer directamente, quer através da dihidro-testosterona, e por conversão em estradiol seguida de activação de alguns receptores de estrogénios (Charmandari et al 2005). Aparentemente é o estradiol que atravessa a barreira hemato-encefálica do feto e promove a masculinização do cérebro masculino, pois no feto feminino a alfafetoproteína liga-se ao estradiol e previne esse efeito (Nugent et al 2011, Kanaya et al 2012). Tendo em conta o conhecido pico de testosterona pré-natal, parece ser no segundo trimestre que se estabelece a identidade de género (Swaab et Falgueras 2009). Entre os dois e os 4-6 meses de idade pós-natal há um segundo pico, não se conhecendo bem a importância do papel desta subida (Forest et al 1973, Corbier et al 1992). Neste período a testosterona poderá actuar essencialmente no cérebro, pois não foram detectadas modificações evidentes noutras partes do corpo (Dakin et al 2008), mas o estabelecimento de outros caracteres dimórficos, como o rácio digital, poderá eventualmente ser consolidado nesta altura.

### 1.5.1 Modelo animal

A associação entre diferentes formas de *stress* pré-natal e posterior função alterada do eixo HHSR-G está bem estabelecida em diferentes espécies (Weinstock et al 2005, Pryce et al 2010). Esses dados evidenciam fortemente a possibilidade de reprogramação deste eixo nas crias expostas a *stress*/ansiedade pré natal (Glover et al 2010). Estudos em roedores mostram que o *stress* antenatal pode causar anomalias morfológicas no cérebro e reduzir a normal assimetria dos hemisférios (Weinstock 2001). Os resultados têm consistentemente mostrado que tanto os níveis basais de corticosterona como os de resposta, são sensíveis aos níveis maternos de *stress* antenatal, nas fêmeas de forma mais marcada que nos machos (Weinstock 2007). Nos ratos, a altura em que ocorre na gestação e a natureza do *stress* determinam a direcção dos níveis funcionais de corticosterona (equivalente no rato ao cortisol humano) após o nascimento. As diferenças variaram também com o sexo e com a idade (Weinstock 2005, 2008). Os níveis elevados de corticosterona em ratos durante a gestação afectaram negativamente a masculinização dos fetos machos (Ward et Weisz 1984), e masculinizaram as bebés fêmeas (Roberts et al 1997). Em primatas, a separação da mãe levou a alterações no ritmo circadiano do cortisol na cria, com redução nos níveis diurnos (Boyce et al 1995, Sanchez et al 2001). Vários factores de *stress* físico e emocional, aplicados a ratas grávidas associaram-se a fluxo uterino comprometido e a hipóxia, resultando em crias com baixo peso ao nascer, menor tempo de gestação e atraso no desenvolvimento psico-motor (Lordi et al 2000). O *stress* induzido por ruídos no final da gravidez também se associou a restrição no crescimento das crias. A música, pelo contrário, levou a aumento da neurogénese no hipocampo que se traduziu em melhor aprendizagem de tarefas espaciais (Kim et al 2006).

O conhecimento do tempo de desenvolvimento dos sistemas neuronais responsáveis pelo controlo comportamental e pelo desenvolvimento emocional, é fundamental para permitir estabelecer um quadro coerente para as diferentes espécies (Weinstock 2001). A sequência de maturação e desenvolvimento dos sistemas neuronais tem velocidades variáveis em humanos, primatas e roedores para cada região específica do SNC, pelo que a comparação selectiva entre regiões é mais adequada que a comparação geral de resultados (Avishai-Eliner et al 2002). Esta comparação é vantajosa para compreender diferentes etapas do desenvolvimento. Uma vantagem adicional dos estudos em animais é permitirem separar os efeitos do *stress* pré-natal e pós-natal na avaliação de comportamentos no adulto, através da utilização de medidas promotoras cruzadas. Manipulando o ambiente pós-natal, Del Cerro et al (2010) reverteram parte das alterações comportamentais manifestadas no grupo exposto a *stress*, após colocar animais sujeitos a *stress* in-útero a crescer com mães que não tinham sofrido *stress*. As crias sujeitas a *stress* antenatal tinham níveis de corticosteróides elevados e, apesar da melhoria nos resultados comportamentais no grupo manipulado, não houve qualquer redução nos altos níveis de corticosteróides, sugerindo um efeito persistente do ambiente pré-natal sobre o eixo HHSR-G.

### 1.5.2 Morfologia cerebral

O sistema nervoso central (SNC) é constituído essencialmente pelo cérebro, do qual fazem parte os hemisférios cerebrais, conectados entre si pelas fibras do corpo caloso. Os hemisférios cerebrais apresentam um padrão assimétrico de sulcos e circunvoluções com diferentes funcionalidades. Integram o SNC os gânglios da base, o prosencéfalo basal e o diencefalo (combinação do tálamo e do hipotálamo). A amígdala situa-se na profundidade de cada lobo temporal e é uma estrutura crítica na mediação do medo, ansiedade e regulação do humor. Nos primatas, há relação bidireccional com o córtex pré-frontal (Amaral et al 1992), o que ajuda a compreender comportamentos de violência física em resposta a emoções de medo.

As funções e estruturas cerebrais apresentam um padrão lateralizado: o hemisfério direito é geralmente dominante para as funções espaciais e emocionais e o esquerdo para a linguagem e processamento verbal. O desvio deste padrão verifica-se, por exemplo, em esquerдинos e ambidextros (Rasmussen et Milner 1977, King et al 2005) e encontrou-se associado, mais em rapazes que raparigas, a *stress* induzido por desastres naturais (King et al 2009), a níveis elevados de ansiedade pré-natal na mãe às 18 semanas mas não às 32 (Glover et al 2004b) e a estados psicopatológicos, como esquizofrenia, e distúrbios cognitivos (Weinstein et al 1999, Mellor 1992). Em condições normais, o desenvolvimento cerebral obedece a um arranjo espaço-temporal que é constante em cada espécie (Weinstock 2001). Como não há conexões neuronais directas entre a mãe e o feto, pensa-se que as alterações na morfologia neuronal do feto em resposta ao *stress* materno sejam produzidas pela acção de hormonas que estejam presentes quer em excesso, quer em

---

défi ce, em períodos cruciais do desenvolvimento (Weinstock 2005). Os mecanismos envolvidos nestas alterações funcionais e estruturais do cérebro do feto mostram envolvimento também na função e integridade do hipocampo (Avishai-Eliner et al 2002). Como já referido, a acção varia consoante a relação temporal e a intensidade do *stress* na mãe e com o ritmo de desenvolvimento de cada sistema neuronal em particular. Essa acção pode ser fisiológica (*stress* ligeiro a moderado por curtos períodos) ou patológica (níveis de *stress* severo). As respostas fisiológicas ao *stress* promovem eficácia nas sinapses com melhoria das funções cognitivas, já as respostas patológicas, pelo contrário, podem levar à morte neuronal com repercussões negativas imediatas e a longo prazo.

No feto humano, à semelhança de outras espécies de mamíferos, o desenvolvimento do sistema nervoso é gradual, começando pela periferia e progredindo para o cérebro (O'Donnell et Glover 2008). No cérebro são primeiro desenvolvidas as estruturas inferiores, progredindo no sentido ascendente para o tálamo e finalmente o córtex cerebral. As primeiras sinapses começam a formar-se pelas 5 semanas, mas o desenvolvimento do córtex começa apenas por volta das 17 semanas, envolvendo diferenciação e maturação dos neurónios, fibras da glia e vasos sanguíneos (Okado et al 1979, Zevedic et al 1999). Depois da proliferação neuronal<sup>4</sup>, dá-se a formação das sinapses primeiro na periferia, depois no centro. Este processo a partir das 20 semanas é, pelo menos parcialmente, dependente de estimulação sensorial (Rabinowicz et al 1996). Na segunda metade da gravidez há um aumento progressivo das circunvoluções e sulcos cerebrais, tornando-se o cérebro muito mais complexo e pesado. As fibras do tálamo penetram o córtex a partir das 24-28 semanas (Kostovic et Judas 2002). O desenvolvimento e diferenciação do SNC mantêm-se até ao nascimento. Ainda assim, o cérebro do recém-nascido tem apenas 25% do seu tamanho final, no adulto.

Tanto o cortisol como a testosterona intervêm nos efeitos do *stress* sobre o SNC e os exames de imagem têm mostrado resultados promissores no seu estudo. Grávidas com medo, num estudo recente por espectroscopia de quase infra vermelhos, apresentaram em todos os trimestres activação do córtex pré-frontal (CPF). Grávidas vivenciando ansiedade apresentaram maior activação do CPF direito e esquerdo e as habitualmente ansiosas mostraram maior activação do CPF dorso-lateral e menor nas regiões ventrais de todo o córtex (Roos et al 2011). Os níveis aumentados de cortisol associaram-se a maior activação do CPF direito e os níveis aumentados de testosterona a maior activação do CPF direito e esquerdo. Os estrogénios e a progesterona não mostraram associação à função cerebral. Outro estudo, por ressonância magnética funcional, mostrou redução do córtex cinzento em várias regiões do cérebro de crianças filhas de mães

---

<sup>4</sup> Atinge um máximo por volta das 28 semanas de gestação e depois declina, parecendo ter a apoptose um papel importante no desenvolvimento inicial do cérebro humano

sujeitas a ansiedade às 19 semanas de gravidez, o que não se verificou nas situações de ansiedade às 25 e 31 semanas (Buss et al 2009a).

Na grávida, a activação do eixo HHSR em resposta ao *stress* também poderá ter um papel importante na indução de alterações na morfologia do hipocampo do feto e na regulação da memória e da linguagem verbal (Kim et al 2006). Filhas adultas de mulheres expostas a um evento grave durante a gravidez, após administração de hidrocortisona (cortisol), mostraram memória associativa deficiente, o que não aconteceu nas filhas de mulheres não expostas a *stress* (Entringer et al 2009). Estes resultados reforçam a hipótese de associação entre exposição a *stress* pré-natal e efeitos moduladores do cortisol na memória, podendo reflectir um desenvolvimento comprometido do córtex pré-frontal durante o desenvolvimento *in* útero. O cortisol também tem um efeito regulador na síntese de proteínas dos microtúbulos, que promovem a adesão das células neuronais, e de factores neurotróficos, importantes na maturação dos neurónios e na estabilização das sinapses (Newell-Morris et al 1989). As quantidades excessivas de CRH segregadas na placenta (face fetal e face materna) durante *stress* gestacional subagudo e crónico (Kalantaridou et al 2010), podem penetrar a barreira hemato-encefálica do feto (Kastin et al 2002) e influenciar a função e integridade dos neurónios no hipocampo. É importante salientar que estudos em animais mostram que estes processos, mediados pela CRH, podem ser alvo de estratégias preventivas (Weinstock 2005).

O sistema nervoso simpático (SNS) também é activado com a exposição ao *stress*, respondendo com secreção e libertação de adrenalina e noradrenalina, que estimulam os receptores adrenérgicos nos tecidos-alvo espalhados pelo corpo (Gerra et al 2001), traduzindo a resposta momento a momento e alterando as actividades biológicas na maioria dos órgãos e tecidos. O eixo HHSR-G, assume uma resposta mais lenta, sendo as suas principais funções a produção basal de níveis adequados de glucocorticóides, a sua regulação retroactiva e o aumento continuado da actividade em resposta ao *stress*, da qual resulta também uma redução na produção de testosterona.

### 1.5.3 Prematuridade e baixo peso ao nascer

A altura em que o parto ocorre, e também o peso ao nascer, têm associação ao *stress* na mãe, tal como se constatou em muitos trabalhos realizados em humanos (Wadhwa et al 1993, O'Connor et al 2002, Obel 2003, Huizink 2007a). A CRH placentar, aumentada nessas situações, estimula todo o sistema cortico-adrenal do feto, acelerando a maturação dos órgãos, principalmente os que asseguram a sobrevivência pós-natal – cérebro e pulmão (Challis et al 2001), frequentemente à custa da restrição do seu crescimento (Crespi et Denver 2005). Há evidência clínica e laboratorial crescente mostrando que muitos partos pré-termo (PPT) se associam a *stress* materno ou fetal e que níveis altos de cortisol actuam na placenta

---

induzindo a produção de CRH, o que leva ao aumento da produção de prostaglandinas nos tecidos e promove o parto (Lockwood 1999). A teoria do relógio placentar (McLean et al 1995) estabelece que são os níveis de CRH de origem placentar a ditarem a altura do parto, sabendo-se que há um aumento exponencial desses níveis durante as 6 semanas que o antecedem. Contudo, o aumento da CRH de origem placentar no final da gravidez pode ser antecipado por situações de *distress* na mãe, na placenta ou no feto (Kalantaridou et al 2010). Grávidas com partos prematuros apresentaram níveis elevados de CRH desde as 18-20 semanas e nelas o *stress* correlacionou-se significativamente com os valores de CRH e com a duração da gestação (Hobel et al 1999b). O *stress* materno às 18-20 e às 28-30 semanas, também se associou a níveis mais elevados de cortisol e de CRH e a parto prematuro (Copper et al 1996, Dole et al 2003). A acção do *stress* na grávida, durante o primeiro ou segundo trimestre, conduz à antecipação da altura do parto, enquanto no terceiro trimestre parece interferir apenas no crescimento e maturação do feto (Zhu et al 2010, Wadhwa et al 2004). Foi encontrado comprometimento do fluxo uterino em mulheres ansiosas, podendo ser este um dos mecanismos subjacentes à restrição do crescimento *in útero* (Teixeira et al 1999). Essa restrição de crescimento é uma consequência transversal a todas as situações de *stress* antenatal e é independente da altura em que ocorre na gravidez. Parece resultar de preparação acelerada para a chegada precoce ao ambiente pós-natal em boas condições de sobrevivência (Morken et al 2006, Zhu et al 2010). Este processo tem semelhanças em todos os vertebrados (Crespi et Denver 2005) e a acção hormonal influencia sinergicamente a remodelação dos tecidos e a maturação dos órgãos. Estes mecanismos têm características adaptativas e imprimem uma alteração permanente na morfologia e fisiologia do indivíduo (Talge et al 2007).

Tanto a restrição de crescimento como o parto prematuro (PPT) parecem associar-se a reduzida expressão genética da 11 $\beta$  HSD tipo 2 (McTernan et al 2001, Schoof et al 2001, Causevic et Mohaupt 2007, Wachter et al 2009, O'Donnell et al 2012), a qual foi também observada em placentas de mulheres ansiosas e com cortisol mais elevado (O'Donnell et al 2012). Mais uma vez a intervenção do Sistema Nervoso Simpático (SNS) pode também ser importante, pois foi encontrada associação negativa entre níveis de noradrenalina na mãe e idade gestacional no parto, o mesmo não sucedendo com o peso ao nascer (Teixeira et al 2011). O peso parece antes associar-se à função do eixo HHSR, alterada por acontecimentos de *distress* grave na mãe (Zhu et al 2010). O mais alto e o mais baixo peso à nascença associaram-se a baixos níveis de cortisol em adultos (Kajantie et al 2007). A resposta do cortisol ao acordar (Cortisol Awakening Response – CAR), que já vimos ser aparentemente independente dos níveis basais e do padrão circadiano de produção, mostrou-se mais elevada em crianças de 10 anos nascidas prematuras do que nas de termo (Lupien et al 2001) e em grávidas exibiu uma atenuação progressiva ao longo da gravidez, associando-se a gestações mais curtas quando a atenuação era menor ou a CAR era maior (Buss et al 2009b). Um estudo prospectivo avaliou a concentração de cortisol e a auto percepção de *stress* em grávidas normais, constatando existir

associação significativa entre níveis mais altos de cortisol nas mães e menor peso e tempo de gestação nos filhos, mas não detectou associação com a percepção de *stress* (Bolten et al 2011).

Outras situações obstétricas como a pré-eclâmpsia, que se associa a fluxo placentar comprometido, bem como situações inflamatórias ou alterações nutricionais, podem associar-se a baixo peso ou a PPT por mecanismos interligados (Figura 1.2), pois têm também o potencial de estimular a produção placentar de CRH e desencadear o parto (Majzoub et al 1999). Hipertensão e pré-eclâmpsia associam-se a condições anóxicas e a aumento subsequente da CRH placentar (Chrousos et al 1998), potenciando a possibilidade de evolução espontânea para PPT (Lockwood 1999). Nas infecções (eg infecção por *Ureaplasma urealyticum* ou por *Mycoplasma hominis*) é inibida a degradação de prostaglandinas, aumentando o risco de PPT (Rich-Edwards et al 2005). A figura 1.2 sumaria os mecanismos subjacentes à acção do *stress* da grávida sobre a prematuridade: o *stress* materno antenatal, por razões psicológicas ou físicas, interfere com o funcionamento do eixo HHSR, promovendo níveis mais elevados de cortisol e de CRH, com implicações para a ocorrência do parto e o peso do feto.

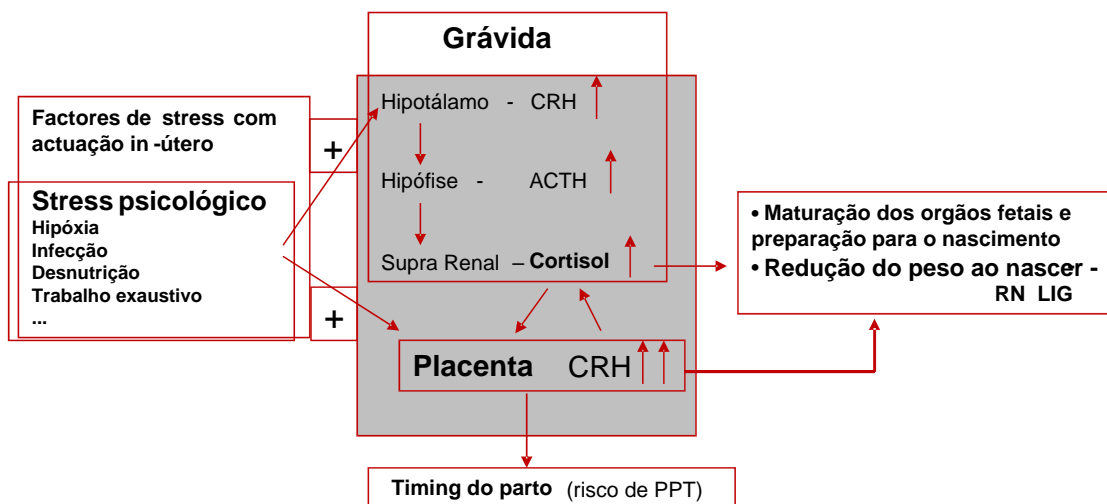


Figura 1.2 - Interação dos diferentes tipos de *stress* com o sistema hormonal na mulher grávida (adaptado de Ventura et al, 2009).

Num estudo populacional verificou-se que o *stress* psicossocial acumulado desde a infância e adolescência, levou a doença crónica, com associação a maior incidência de partos prematuros nessas mulheres (Rich-Edwards et al 2005). Noutra população (Ventura e Gomes 2010) foram encontradas diferenças significativas na percentagem de partos pré-termo e de RN leves para a idade de gestação (LIG) entre as diferentes etnias, evidenciando diferenças de vulnerabilidade resultantes, possivelmente, de factores socioculturais e de *stress*.

Têm sido encontradas também algumas diferenças de género: em rapazes mas não em raparigas, encontrou-se relação entre peso ao nascer e respostas ao stress e o baixo peso mostrou associação com os níveis de cortisol em raparigas mas não em rapazes (Jones et al 2006). Outro estudo em adolescentes com baixo peso no parto mostrou nos rapazes associação a níveis baixos de cortisol basal, quando comparados com controlos da mesma idade, sem alterações noutras medições nomeadamente na testosterona, e sugerindo função alterada da SR em jovens nascidos com baixo peso (Jensen et al 2011). Outros autores não encontraram estas associações em crianças de 10-12 anos (Rosmalen et al 2005), sendo necessária mais investigação.

A prematuridade acarreta custos de ordem económica, emocional e social para a sociedade, para as famílias e para o próprio indivíduo, sendo importante encontrar formas de intervenção que a contrariem. O relaxamento por massagem feito em grávidas com o diagnóstico de depressão major, resultou em melhoria dos sintomas e redução dos níveis de cortisol no pós-parto, e em menos nascimentos de RN prematuros ou de baixo peso (Field et al 2009). O relaxamento induzido por audição de programa curto diário de relaxamento em grávidas com ameaça de PPT reduziu significativamente a prematuridade extrema (Chuang et al 2012), embora não a percentagem global de PPT ou LIG. Outras formas de intervenção, como a música, devem ser também equacionadas.

#### 1.5.4 Psicopatologia

Tanto no modelo animal como em humanos tem-se verificado consistentemente que o estado emocional da mãe na gravidez pode predispor o seu filho para uma variedade de problemas psiquiátricos (Glover 2011). Há evidência da relação entre *stress* pré-natal e psicopatologia mais tarde na vida, independentemente de factores pós-natais poderem interferir também neste processo (O'Connor et al 2002, Bergman et al 2007). Doenças mentais como *stress* pós-traumático, esquizofrenia ou depressão, podem decorrer de vulnerabilidade relacionada com acontecimentos traumáticos precoces (Heim et al 2004, Seckl et Holmes 2007).

Verificou-se um aumento do risco de esquizofrenia quando o *stress* na mãe foi grave e ocorreu durante o primeiro trimestre, por exemplo a morte inesperada do cônjuge (Koeniga et al 2005, Khashan et al 2008). Acontecimentos no final da gravidez associaram-se a problemas comportamentais (O'Connor et al 2002b) e a autismo (Kinney et al 2008). Vários estados de *distress* foram associados a efeitos adversos de grau variável no feto e na criança tais como hiperactividade/défice de atenção (O'Connor et al 2002b, Obel et al 2003b, Van Den Bergh et al 2004, Loomans et al 2011), elevados níveis de ansiedade pós-natal (Van Den Bergh et al 2004, Bergman et al 2007), comportamentos agressivos e desobedientes (Huizink et al 2002, Van Den Bergh et al 2004) ou limitações cognitivas (Bergman et al 2007, Laplante et al 2008, Huizink et al

2003). Mães com ansiedade antenatal elevada duplicaram o risco de os seus filhos terem hiperactividade/défice de atenção até aos 7 anos de idade e o *stress*, a ansiedade ou a depressão pré-natal na mãe, contribuiu para explicar mais de 20% da variância em vários problemas comportamentais da criança (Van Den Bergh et al 2005).

Factores de ordem genética podem aumentar a vulnerabilidade ao *stress* em grau variável e esses factores podem explicar até 60% da variação nas respostas de cada indivíduo ao mesmo factor (Charmandari et al 2003). No entanto, a relevância clínica dos efeitos do *stress* antenatal resulta da associação destas patologias à desregulação do eixo HHSR-G (Watson et al 2004, Lopez-Duran et al 2009, Vreeburg et al 2009, Valeria et al 2010). A título exemplificativo, mais de 50% de doentes com depressão major apresentaram níveis elevados de cortisol e o tratamento farmacológico bem sucedido dessas depressões levou à normalização desses níveis (Pariante et al 2008). Os doentes com síndrome de Cushing, associado a cortisol aumentado, apresentam incidência elevada de depressão (Michaud et al 2009), o que também reforça esta ideia. Outros resultados relevantes indicam que mesmo níveis de *stress* moderados, são suficientes para conduzir a patologia (O'Connor et al 2002b) e a ansiedade materna aparenta ter mais efeitos nocivos sobre o feto do que a depressão (O'Connor et al 2002a, Field et al 2003, Keim et al 2011).

Paradoxalmente, um estudo encontrou ligeira aceleração no desenvolvimento motor e na linguagem associada a queixas depressivas na gravidez (Keim et al 2011). É provável que a pressão evolutiva tenha desenvolvido mecanismos para preparar a criança para ambientes adversos e a grande plasticidade de desenvolvimento inicial permita uma resposta flexível às variações desses ambientes (Glover 2011).

A associação entre psicopatologia e *stress* pré-natal evidencia bem a necessidade de encontrar formas de intervenção preventiva, em especial na ansiedade materna.

### 1.5.5 Outros aspectos comportamentais

Entre 15% a 22% dos problemas emocionais/comportamentais evidenciados por crianças e jovens, são atribuídos a ansiedade, *stress* ou depressão na mãe durante a gravidez (Van den Berg et al 2005, Glover et al 2010, Glover 2011). O papel do parceiro da mãe parece ser importante para o desenvolvimento do bebé, pois Van den Berg et al (2005) verificaram que grávidas com parceiros emocionalmente cruéis tinham filhos com mais problemas de desenvolvimento.

No modelo animal, o *stress* antenatal altera comportamentos reprodutivos em machos e fêmeas (Weinstock 2008), as fêmeas são menos maternais (Del Cerro et al 2010) e os machos menos tipicamente masculinos (Ward et Stehm 1991, Dörner et Döcke 1983) encontrando-se também alterações nas preferências de género em comportamentos sexuais (Meek et al 2006). Também em humanos os



problemas emocionais maternos associaram-se a problemas comportamentais na criança, de forma diferente em rapazes e raparigas (de Bruijn et al 2009), parecendo os rapazes ser os mais afectados (Loomans et al 2011).

As consequências do *stress* pré-natal são variáveis entre indivíduos (Bergman et al 2007), a maioria não é de todo afectada (O'Connor et al 2002b, Talge et al 2007) e alguns podem ser mais vulneráveis ou ter vulnerabilidades específicas, outros serão mais resilientes (Glover 2011). É provável que estas diferenças resultem da interacção entre factores ambientais e genéticos (Caspi et al 2003, Kim et al 2006, Rutter et Silberg 2002).

Talge et al (2007), numa revisão de estudos prospectivos, verificaram que a gravidez sujeita a *stress* se associou a risco aumentado de problemas cognitivos e emocionais nos filhos, como ansiedade crónica ou atraso na linguagem, hiperactividade e défice de atenção. Esses efeitos foram independentes da interacção mãe-filho após o nascimento. Outros estudos mostraram duplicação no risco de hiperactividade/défice de atenção e na incidência de esquerdismo (Glover et al 2004a) bem como atraso nos processos de aprendizagem e utilização de linguagem verbal (Bergman et al 2007, Laplante et al 2008, Huizink et al 2003). Estes processos são actualmente vistos como adaptativos e outros, por exemplo a maior incidência de esquerдинos e de ambidextros (Obel et al 2003b, Glover et al 2004b, Rodriguez et al 2010), não são adaptativos mas reflectem um padrão de lateralidade alterado, que em si será adaptativo (Glover 2011). O significado de alguns resultados não é claro, por exemplo a alteração do rácio de nascimentos em situações de *stress* pré-natal, tanto moderado como intenso (Obel et al 2007), com maior número de nascimentos femininos e maior número de fetos mortos masculinos (Peterka et al 2004), requerem mais dados para melhor avaliação. O baixo peso ao nascer, pelo contrário, tem-se revelado um marcador de risco para problemas comportamentais (Schlotz et Phillips 2009).

Uma boa interacção mãe-filho após o nascimento mostrou ter efeitos benéficos, evidenciando o potencial da interacção psicossocial da grávida (Bergman et al 2010b, Kaplan et al 2008). Os ambientes relaxantes, a massagem, ou a audição de música calma, poderão traduzir-se também em níveis hormonais mais favoráveis a um bom desfecho da gravidez.

### 1.5.6 Teoria da programação fetal

A teoria da programação fetal foi desenvolvida inicialmente por Barker et al (1998, 2002) a partir de estudos epidemiológicos populacionais onde se constatou que o baixo peso à nascença, seguido do aumento acelerado do índice de massa corporal entre os 3 e os 11 anos aumentava significativamente o risco para doença coronária (Barker 2002), diabetes tipo 2, hipertensão, ou obesidade (Barker et al 2006,

Barker 2005, Stein et al 1996, Barker et al 2002) e que esse risco era independente do tempo de gestação. Nascer com peso adequado para a idade gestacional, pelo contrário, associava-se a menor risco de patologias em adulto, independentemente do estilo de vida, mas nos nascidos com baixo peso, os estilos de vida adquiridos podiam potencializar riscos, mas não reduziam os programados (Barker et al 2001). A teoria postula que alterações ocorridas no ambiente fetal durante períodos sensíveis do desenvolvimento podem causar no indivíduo alterações permanentes nas suas estruturas e funções e programar doenças que se manifestam em adulto (Barker 1998), defendendo alguns autores que se trata de um fenómeno normativo, ou seja, a programação ocorre em todas as gravidezes (Glover 2011).

Neste contexto, Barker e colaboradores (Barker et al 2008) desenvolveram a hipótese de que a origem do cancro da mama se associa à exposição do tecido mamário dos fetos em desenvolvimento a níveis elevados de hormonas esteróides. O perfil dessas hormonas é estabelecido na puberdade, influenciando o crescimento dos ossos da pélvis. Mulheres com maior largura entre as cristas ilíacas e forma mais redonda, que reflectem níveis mais elevados de hormonas esteróides a partir da puberdade e pela vida fora, tiveram filhas com maior incidência de cancro da mama. Também níveis elevados de cortisol e de catecolaminas, mediadores das respostas neuroendócrinas clássicas, podem influenciar directamente a susceptibilidade à doença através dos seus efeitos no metabolismo e na formação dos vasos.

As modificações introduzidas podem, contudo, mostrar-se vantajosas (Phillips 2007). Especula-se sobre as vantagens adaptativas deste processo: em situações adversas pós-natais (por exemplo nascer num cenário de guerra), o indivíduo que nasceu com baixo peso e prematuro possivelmente está mais apto a sobreviver, pois é capaz de respostas rápidas aos desafios do meio. Contudo, se o meio envolvente não apresentar desafios significativos, esse mesmo indivíduo irá ficar em desvantagem, pois vai ter, por exemplo, maior fragilidade imunitária e possivelmente comportamentos desajustados (Phillips 2007). Hales e Barker (2001) sugeriram que este é um mecanismo adaptativo à previsão de recursos nutricionais escassos, mas muitas vezes não coincide com a abundância posteriormente experienciada na vida pós-natal do mundo industrializado.

A restrição de crescimento in-útero (RCIU) decorrente do *stress* ou da ansiedade da grávida pode portanto ser vista como uma adaptação fetal apropriada para sobreviver com escassos recursos nutricionais (Wadhwa et al 1993, Hosseini et al 2009, Rice et al 2010).

Na sua vida precoce, o feto humano tem grande plasticidade de adaptação ao ambiente materno (Eriksson et al 2000, Ellison 2010), atravessando um período crítico para a maioria dos seus órgãos e sistemas. Essa plasticidade vai-se perdendo de forma gradual e na vida pós-natal é adquirida progressivamente uma capacidade funcional fixa. A teoria da programação fetal postula que um ambiente caracterizado por

---

elevados níveis de glucocorticóides subsequentes ao *stress* na mãe, imprime uma reprogramação no eixo HHSR (G) do feto, o qual nasce com níveis basais de cortisol elevados, com respostas hormonais ampliadas a um mesmo estímulo de *stress* e com um risco aumentado para algumas doenças em adulto (Glover 2011). Este risco parece relacionar-se também com a reacção à dieta consumida após o nascimento, reacção que terá sido programada *in útero* (Barker 2002). Assim, o ritmo de crescimento após os primeiros anos de vida e a qualidade e quantidade dos nutrientes ingeridos mostra-se igualmente crítica. As dietas das grávidas e o seu metabolismo na gravidez e periconcepção deveriam ser repensadas, porque condicionam o desequilíbrio nutricional dentro e fora do útero experimentado por muitas crianças de hoje (Barker et al 2005).

Concluindo, a programação fetal reflecte a plasticidade do desenvolvimento (ver secção 1.5.7), mas pode-se revelar mal adaptada, devido à discrepância existente entre os factores desencadeantes *in útero* e os que são encontrados na vida pós-natal. Provavelmente, esta discrepância é cada vez mais frequente na sociedade moderna, devido à multiplicidade de factores stressantes para a grávida, apelando à implementação de medidas de equilíbrio em diversas vertentes.

### 1.5.7 Epigenética – hipóteses de um modelo evolucionista

O termo “epigenética” foi utilizado pela primeira vez para denominar a alteração do fenótipo de um indivíduo pela exposição ao ambiente envolvente. Significa modificação do genoma funcionalmente relevante, mas que não envolve a alteração da sequência dos nucleótidos (Glover 2011). São características específicas dos processos epigenéticos o seu estabelecimento de novo, a propagação e a reversibilidade. Estas alterações reversíveis ocorrem na estrutura quantitativa do microRNA e na acetilação e metilação de proteínas, nomeadamente das histonas, sendo esta a vertente molecular mais bem estudada (Glover 2011, Mathews et Phillips 2012). Nos processos de meiose que ocorrem durante a formação dos gâmetas, são apagadas a maioria das metilações, mas algumas das alterações do epigenoma são estáveis mesmo na meiose, sendo possível a sua transmissão a outras gerações (Chong et Whitelaw 2004).

Essas alterações podem ser induzidas por factores ambientais, tais como níveis hormonais na mãe ou no feto, e podem estar subjacentes a muitos dos processos envolvidos na programação fetal (O'Donnell et al 2012). Constatou-se que as alterações epigenéticas em mamíferos podem ser transmitidas a pelo menos duas gerações (Drake et al 2004, Matthews et Phillips 2011, Morgan et Bale 2011, Schopper et al 2011) e que se manifestam de forma diferente nos dois sexos (Glover et Hill 2012). O *stress* antenatal, associado a níveis elevados de cortisol, participa neste processo, embora não se conheçam os mecanismos exactos pelos quais os glucocorticóides afectam a metilação das histonas, ou a quantidade do microRNA. Os efeitos de programação traduzem-se na alteração da adaptação endócrina e cardiovascular da mãe à gravidez, e

após o parto também pelo comportamento materno alterado, podendo esses efeitos ocorrer isoladamente ou combinados (Matthews et Phillips 2012).

Constatou-se que em animais sujeitos a *stress* pré-natal os genes programadores do eixo HHSR-G sofrem modificações epigenéticas que são depois transmitidas às gerações seguintes (Schopper et al 2012). Os estudos em humanos que podem evidenciar esta transmissão transgeracional são escassos e maioritariamente representados por avaliações das consequências de acidentes ou catástrofes. Exemplificando, mulheres filhas de grávidas que sofreram *stress in útero* no primeiro trimestre durante a fome na Holanda em 1944, tiveram filhos com baixo peso, independentemente do seu próprio peso ao nascer (Painter et al 2008). Também os netos de mulheres que foram medicadas com diethylstilbestrol mostraram maior prevalência de hipospadias (Brouwers et al 2006) e os netos de sobreviventes do holocausto revelaram maior incidência de doença psiquiátrica (Sigal et al 1988). Os humanos expostos a adversidades pré (ou pós) natais apresentam com frequência dificuldade nas ligações afectivas, bem como comportamentos abusivos e reduzida capacidade de cuidar dos outros. Estes comportamentos tendem a persistir por várias gerações e são difíceis de eliminar. Os estudos epigenéticos em animais sugerem que estes efeitos transmitidos por várias gerações têm uma base biológica (Matthews et Phillips 2012).

A plasticidade do desenvolvimento é definida como o fenómeno pelo qual um mesmo genótipo pode dar origem a uma ampla gama de diferentes estados fisiológicos ou morfológicos em resposta a diferentes condições ambientais durante o desenvolvimento (Barker et al 2005) e é transversal a todas as espécies. Esta resposta adaptativa precoce à diversidade do ambiente visa manter ou melhorar a integridade e funcionamento do indivíduo, quer no período de crise (permitindo a sobrevivência), quer mais tarde na vida (Gluckman et al 2005, Gluckman et al 2007, Ellison 2010). As respostas neuroendócrinas em situações de *stress* e o estabelecimento de expressões fenotípicas de longo prazo apareceram precocemente na evolução dos vertebrados (Erica et al 2005). Por serem transversais a muitas espécies, estes mecanismos devem ser adaptativos e sugerem a existência de grande interacção entre o ambiente envolvente e o indivíduo, desde a concepção (Phillips 2007).

Os efeitos do *stress* antenatal no neurodesenvolvimento fetal terão como objectivo o sucesso do crescimento e desenvolvimento em ambientes adversos após o nascimento, com funções específicas para cada sexo, apesar desses efeitos também se associarem a problemas de crescimento e de nutrição (Gluckman et al 2005, Gluckman et al 2007, Glover et Hill 2012). A variabilidade do *stress* pré-natal, bem como variações na disponibilidade de nutrientes, levaram à evolução adaptativa de sistemas como o eixo HHSR-G e o sistema nervoso simpático (Davis et al 2011). Ambos evidenciam diferentes padrões de resposta após o nascimento, respostas que possivelmente variam também com a idade da criança e com a experiência pós-natal precoce (Rice et al 2010, Glover et Hill 2012). A restrição do crescimento e o baixo

peso ao nascer resultantes de *stress* estão frequentemente associados a doença no adulto, mas não são um pré-requisito para doença. Uma ampla gama de possíveis ambientes fetais tem um efeito gradual nas alterações epigenéticas no feto, que tudo indica têm carácter adaptativo, estando provavelmente enquadradas na evolução humana (Gluckman et al 2005, Gluckman et Hanson 2010, Matthews et Phillips 2012).

O baixo peso é um indicador de risco avaliado à nascença, mas é desejável que sejam encontrados outros marcadores para detectar precocemente alterações no desenvolvimento. O rácio digital ou as pregas palmares, por exemplo, são frequentemente associados ao grau de androgenização *in* útero e parecem acompanhar as mudanças adaptativas resultantes de alterações epigenéticas associadas ao *stress* (Lilley et al 2010, Kapoor et Matthew 2011, Sanders et al 2002). Neste contexto, a avaliação do rácio digital no recém-nascido e sua correlação com os níveis hormonais encontrados na mãe e no LA, desenvolvido nesta tese, acompanha a tendência para a investigação de fenótipos que possam ser facilitadores da detecção de risco e de intervenção precoce, traduzindo interacções genéticas e ambientais antes do nascimento.

## 1.6 Intervenções não farmacológicas para reduzir o *stress* na grávida

Estima-se que em cerca de 20% das gravidezes haja problemas psicológicos relacionados com ansiedade ou *stress* (Alder et al 2011). As associações entre *stress* crónico, desenvolvimento fetal e maior incidência de prematuridade e de baixo peso ao nascer, evidenciam a necessidade de programas de intervenção precoces na gravidez (Fink et al 2011, Van den Bergh et al 2005). Os efeitos acessórios e a relutância das grávidas em ingerirem fármacos, elegem as terapias alternativas como importante forma de intervenção para reduzir a ansiedade ou o *stress*. Na verdade, é necessário ponderar os riscos inerentes à medicação, pois sabe-se que antidepressivos e benzodiazepinas atravessam a barreira placentar (Hendrick et al 2003). Por outro lado, sabe-se que os estrogénios, em geral, aumentam a disponibilidade da serotonina, com implicações no humor durante a gravidez e pós-parto (Lokuge et al 2011) e o uso de antidepressivos interfere de forma diversificada nestes padrões. A fluoxetina, por exemplo, um dos mais prescritos eutímicos com acção inibitória na recaptura da serotonina, mostrou interferir de forma diferente nos níveis de cortisol e no comportamento de animais consoante foram ou não sujeitos a *stress* antes do nascimento (Pawluski et al 2012).

A psicologia comportamental diz-nos que a ansiedade responde bem a terapias comportamentais, pelo que grávidas ansiosas, com *stress*, ou deprimidas, deveriam utilizar intervenções não farmacológicas, evitando os efeitos acessórios e as interacções farmacológicas. São várias as técnicas disponíveis que têm mostrado eficácia em situações clínicas (Marc et al 2011). As principais incluem psicoterapia, hipnoterapia, massagem, yoga, imaginação guiada e audição de música (Cunningham and Zayas 2002, Narendran et al

---

2005, Chang et al 2008, Kimber et al 2008, Maharana et al 2009, Field et al 2009, 2010, Gedde-Dahl et Fors 2012), esta última provavelmente a terapia não farmacológica mais acessível a mulheres com baixos recursos económicos.

A música interage com a amígdala, que faz parte do sistema límbico e é considerada, como já foi dito, o centro das emoções, o que ajuda a compreender a inter-relação dos diferentes processos. Na amígdala conjugam-se as informações provenientes de regiões do córtex temporal e as informações de áreas somatosensoriais do cérebro, nomeadamente visual e auditiva (Altenmüller 2004).

### 1.6.1 Modelo animal

Vários estudos indicam que as condições sonoras ambientais antenatais têm repercussões sobre a aprendizagem e o desenvolvimento cerebral. Em roedores, o *stress* antenatal por ruídos na mãe associou-se ao aumento da corticosterona, que se sabe passar a barreira hemato-encefálica do feto (Zarrow et al 1970), e levou a redução da neurogénese no hipocampo com problemas posteriores na aprendizagem e na memória e a atraso no crescimento. A exposição das cobaias a música, pelo contrário, associou-se nos descendentes a neurogénese aumentada e melhoria da aprendizagem em tarefas envolvendo capacidades espaciais (Kim et al 2006). Já estudos anteriores haviam mostrado que a sujeição da grávida a ruídos se associa a maior risco de morte fetal in útero, anomalias congénitas do SNC, comportamento social alterado e défices no sistema imunitário a longo prazo nos descendentes (Sobrian et al 1997, Kay et al 1998). Por outro lado, a exposição de pintos a música antes da eclosão do ovo, associou-se a aumento da expressão proteica nas sinapses dos núcleos auditivos no tronco cerebral e aumentou o tamanho e o número de neurónios na área de associação auditiva no prosencéfalo (Alladi et al 2002, Panicker et al 2002). Numerosos estudos em animais têm sugerido que a exposição a música durante a gestação pode facilitar o crescimento e o desenvolvimento do cérebro fetal (Arabin 2002).

### 1.6.2 Estudos em humanos

A audição em adultos envolve activação bilateral das estruturas corticais e auditivas, que se cruzam a meio, na oliva (Werner 1998). Os mecanismos subjacentes à acção da música envolvem interacção entre estruturas periféricas (sistema auditivo) e centrais (córtex) e o SNA (Collinge 1998, Crowe 2004), sendo o relaxamento facilitado por via do ramo parassimpático, que interage na frequência cardíaca, respiração, consumo de oxigénio e pressão sanguínea (Schneck et al 2006).

A utilização de música em ambientes clínicos tem sido usada desde há muito e tem ganho popularidade. A sua utilização em unidades de cuidados intensivos neonatais, mostrou efeitos positivos nas taxas de saturação de oxigénio, frequência cardíaca e respiratória dos recém-nascidos (Field et al 2006),

---

possivelmente promovendo atenuação dos efeitos de ruído no ambiente. Na execução de exames invasivos como colposcopia, a música foi eficaz em reduzir a ansiedade e o limiar de dor (Chan et al 2003, Galaal et al 2012), e reduziu o cortisol na saliva em colonoscopias (Uedo et al 2004). Em situações de pós-operatório, também se verificou recuperação mais rápida e menor valorização da dor (Ebnesahidi et Mohseni, 2008), ou redução da ansiedade (Johnson et al 2012), embora os resultados variassem com a personalidade individual (Bradshaw et al 2011). Em adultos jovens a audição de música associou-se a decréscimo no cortisol sérico, especialmente na ausência de avaliação crítica, indicando interação com o eixo HHSR (Vanderark e Ely 1993) e o cortisol na saliva desceu mais rapidamente num grupo de adultos sujeitos a *stress* que ouviram música a seguir, do que nos que não ouviram (Khalfa et al 2003). Em adolescentes deprimidos, a música associou-se a descida do cortisol na saliva e a atenuação da actividade electroencefalográfica no córtex frontal direito (Field et al 1998).

Vários estudos sugerem que o tipo de música utilizado é importante para os resultados. Num grupo de ginastas a música agitada associou-se a elevação dos níveis de cortisol (Brownley et al 1995). Já a música calma em cuidados pré-operatórios, foi mais eficaz que o midazolam oral a reduzir a ansiedade e no pós-operatório associou-se a significativa redução do cortisol e a estabilidade nos parâmetros cardiovasculares e respiratórios (Trappe 2012). Alguns tipos de música, especialmente estudada para induzir ressonância vibroacústica e relaxamento, têm-se mostrado muito eficazes em reduzir estados de ansiedade na grávida, aumentar o limiar de dor e reduzir a medicação analgésica com evidentes benefícios para o feto (Sidorenko 2000).

A necessidade de intervenções pré-natais é evidenciada em estudos como o de Field et al (2009) em que recém-nascidos de mães deprimidas mostraram menor resposta a vozes e atraso na desaceleração da frequência cardíaca em resposta a músicas, comparativamente aos filhos de mães sem depressão, possivelmente por menor atenção ou por processamento mais lento. Os processos que envolvem *stress* beneficiam claramente de intervenções relaxantes, como a audição de música, evidenciando inter-relação de sistemas, com acção na produção hormonal e benefício associado para a mãe e para o cérebro do feto em desenvolvimento (Krout 2007).

### 1.6.2.1 Massagem, Yoga, Psicoterapia

Foi já dito que a resolução de problemas de ansiedade ou *stress* em grávidas, deveria considerar formas de intervenção não farmacológicas como psicoterapia, massagem, ou yoga, que têm mostrado graus variáveis de eficácia (Cunningham et Zayas 2002, Narendran et al 2005, Chang et al 2008, Kimber et al 2008, Maharana et al 2009, Field et al 2009, 2010). As múltiplas modalidades que têm sido utilizadas para reduzir o *stress* e a ansiedade estão traduzidas em grande número de publicações, mas sobre intervenções no

bem-estar materno e nos resultados obstétricos há poucos trabalhos de investigação publicados. Um programa curto, diário, de relaxamento auto-induzido melhorou os resultados obstétricos de grávidas internadas com ameaça de PPT (Chuang et al 2011). Outros trabalhos envolvendo massagem têm também mostrado benefícios, embora nem todos tenham bom tamanho da amostra ou estudo bem delineado (Field et al 1997, Chang et al 2002, Yildirim et Sahin 2004, Khodakarami et al 2006, Kimber et al 2008, Chuang et al 2012). Há ainda trabalhos publicados sobre outras técnicas, como acupunctura e hipnose em grávidas durante o trabalho de parto, com bons resultados no alívio da dor (Smith et al 2006, Hantoushzadeh et al 2007). Fink e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos do relaxamento materno no comportamento fetal e na actividade uterina de grávidas, concluindo que a imaginação guiada estava mais associada a bons movimentos fetais e menor actividade uterina durante e após o procedimento que a massagem e esta, por sua vez, com melhores resultados que o grupo controlo. Estes autores não encontraram relação entre comportamento fetal e frequência cardíaca, pressão arterial ou níveis hormonais maternos, mas outros autores encontraram associações (Monk et al 2003, Loomba et al 2012), denotando alguma controvérsia nos resultados.

#### 1.6.2.2 Som e música

Som é definido como uma sensação física que estimula os ouvidos através de ondas longitudinais detectadas pelo sentido da audição humana, integrando a fisiologia do ouvido com a psicologia cerebral (Giancoli 1998). A vibração dos objectos emite som que se transmite através de ondas acústicas longitudinais, detectáveis pelo ouvido ou por instrumentos de captação. A velocidade do som é diferente em diferentes materiais e depende da elasticidade e da densidade do material (Giancoli 1998). Em líquidos (e sólidos) há muito mais modulação elástica e a velocidade de transmissão é muito rápida, aumentando com a temperatura. A música é uma forma elaborada de som ambiente e pode ser um instrumento simples e acessível para regular estados de ansiedade e harmonizar a vida diária (Fitch 2006). O ouvido humano responde por frequências entre 20 a 20.000 Hz (1 Hz= 1 ciclo por seg), que é a frequência audível.

O som apresenta quatro características bem definidas:

1. *Volume* (energia na onda de som) – é medido pela intensidade em decibéis (dB). A música relaxante deve ser ouvida entre 40dB (= rádio suave) e 60dB (= conversação normal).
2. *Intensidade*: Traduz a amplitude das ondas sonoras fortes ou fracas.
3. *Timbre* - É uma propriedade perceptual que permite distinguir dois sons com a mesma altura e a mesma intensidade, produzidos por fontes sonoras diferentes.



4. *Altura*: aguda ou grave, pode ser quantificada em frequência, mas a altura não é puramente objectiva, antes um atributo psicoacústico que traduz o número de vibrações por unidade de tempo e permite a ordenação do som em escalas (Klapuri et Davy 2006).

A música foi sugerida por Pitágoras como método de tratamento (Sidorenko 2000) e tem sido usada desde há muito para intervenções terapêuticas, considerando-se capaz de interagir com o corpo e a mente (Fitch 2006). A medicina holística ou integrativa considera-a uma modalidade terapêutica eficaz (Olson 1998), que funciona como instrumento de neutralização de emoções, eleva o limiar do *stress*, e facilita o relaxamento (Field et al 1998, Sidorenko 2000).

A música também estimula a imaginação, levando a respostas autónomas no tálamo e outras estruturas do sistema límbico (Watkins 1997) envolvidas na interconexão de sistemas cerebrais que determinam sentimentos e emoções. A sensação de prazer detectada no hemisfério direito estimula a libertação de endorfinas pela hipófise que leva à redução de ACTH na circulação (Sidorenko 2000). A interacção entre tálamo e sistema nervoso autónomo (SNA) é modificada pela música, o que se reflecte nas funções autónomas como pressão da circulação sanguínea, frequências cardíaca e respiratória (Krout 2007). Música calma, com tempos 4/4, é considerada representativa da frequência cardíaca normal, e induz efeitos físicos mediados pelo SNA (Livingston 1979). Vários autores (Kaminski et al Hall 1996, Hayes et al 2003) testaram melodias com harmonias simples e ritmos suaves (60-80 batimentos/min) e verificaram uma resposta relaxante com homeostasia emocional em adultos e crianças. A utilização de música instrumental *versus* lírica cantada tem sido objecto de controvérsia, defendendo alguns autores que textos cantados podem activar memórias e desencadear respostas emocionais, eventualmente contraproducentes ao efeito relaxante (Chang et al 2008).

### 1.6.2.3 Música e gravidez

#### A Grávida

A grávida experiencia com muita frequência estados de ansiedade, um processo psicobiológico complexo que engloba acontecimentos cognitivos, afectivos, psicológicos e comportamentais (Spielberger et Lushene 1983). Por outro lado, cerca de 10 a 20% das mulheres ocidentais apresentam depressão pós-parto, sendo a ansiedade e o *stress* na gravidez um factor de risco para a sua ocorrência (Evans et al 2001, Bennett et al 2004).

Vários autores têm investigado a redução da ansiedade na grávida através da música. Grávidas que ouviram música pré-seleccionada durante o trabalho de parto e o parto mostraram significativa redução

dos níveis de ansiedade e de dor, comparadas com os controlos (Clark et al 1981) e outras que ouviam música enquanto eram submetidas a cesariana mostraram significativa redução da ansiedade (Chang et Chen 2005). Em grávidas internadas por patologia de alto risco, a música também reduziu a percepção de *stress* (Sidorenko 2000) e ouvir música pré-seleccionada diariamente durante 30 min reduziu o *stress* e a ansiedade (Chang et al 2008). Em resumo, estes estudos sugerem que a música é uma excelente opção para promover a saúde durante a gravidez. Os efeitos da música podem ser influenciados pela experiência emocional e as preferências do ouvinte e pelas características da própria música (Bradt 1997), mas em qualquer caso é um meio não invasivo e não farmacológico de atingir estados de descontração e prazer, com uma boa relação custo-eficácia na criação de ambiente propício para o bem-estar da grávida (Chang et al 2008). É também facilmente utilizada em múltiplos ambientes e a possibilidade de escolha pessoal parece potenciar os seus efeitos relaxantes (Watkins 1997). A audição de música em situações agudas de ansiedade parece ser um excelente meio de intervenção em grávidas.

## O Feto

O feto vive num ambiente fluido e os sons chegam-lhe principalmente do interior por transmissão óssea, ou a partir do exterior através da parede abdominal materna, chegando-lhe quase simultaneamente aos dois ouvidos (Jardri et al 2008) e capacitando-o, por exemplo, para distinguir a voz da mãe de entre outras familiares logo ao nascer (Kisilevsky et al 2009). A capacidade de discriminação dos sons é função da actividade cortical do feto e necessita de axónios específicos, sendo um pré requisito para o desenvolvimento normal da fala, pois esta depende da função cognitiva de discriminação sonora (Draganova et al 2005). A mielinização cerebral completa-se apenas alguns anos após o nascimento, mas as estruturas sensoriomotoras do ouvido médio estão já desenvolvidas e funcionais no feto pelas 20 semanas (Tucci 1996) estando a função auditiva completa antes do nascimento (Graven et Brown 2008). Hepper e Shahidullad (1994) encontraram em fetos com 19 semanas respostas motoras a estímulos sonoros de tons puros com baixas frequências no espectro de audição humana (500Hz), sendo estas as primeiras a ser detectadas pelo feto. Todos os fetos com 33 semanas ou mais responderam a estímulos sonoros de alta frequência (1000 a 3000 Hz). O desenvolvimento completo da audição depende das estruturas morfológicas periféricas (ouvido interno e externo) e do bom desenvolvimento neuronal no cérebro (Draganova et al 2005). A mielinização e o estabelecimento de sinapses após o nascimento é muito importante para o desenvolvimento cognitivo (Courchesne 1990, pp. 210–241), mas sons frequentes na vida intra-uterina, como a voz da mãe, ruídos da placenta ou de órgãos internos têm um papel fundamental neste processo, e o feto parece armazená-los como memórias, o que leva alguns autores a falarem em “aprendizagem fetal” (Kisilevsky et Hains 2010).

O *stress* pode afectar este processo, pois encontrou-se elevada percentagem de défices na linguagem em fetos com restrição do crescimento (Kisilevsky et Davis 2007). A capacidade de habituação auditiva a um determinado som está presente a partir das 35 semanas de gestação e é considerada um indicador da integridade do SNC (Morokuma et al 2008). Outros sons externos além da voz da mãe são também memorizados pelo feto, levando a grande capacidade discriminativa nas semanas que antecedem o parto (Draganova et al 2005, Eswaran et al 2007). Os estudos feitos em recém-nascidos saudáveis com 30-35 semanas sobre as preferências quanto à audição de vozes revelaram a existência de capacidade discriminativa para sons da fala (Cheour-Luhtanen et al 1996) e mais de 80% dos fetos entre as 33 e as 36 semanas apresentaram mudanças nas respostas cerebrais associada à mudança de frequência do estímulo, avaliadas por magnetoencefalografia não invasiva com registo de potenciais evocados (Draganova et al 2005). No final da gravidez todos os axónios estão presentes no feto (Kostović and Jovanov-Milošević 2006), mas a mielinização é incompleta e talvez por isso o padrão auditivo encontrado acima das 33 semanas apresente activação do córtex apenas unilateral, embora confirme o elevado processamento discriminativo (Jardri et al 2008) já mencionado, sabendo-se desde há várias décadas que nessa altura o feto pode detectar sons provenientes do exterior da mãe (Querleu et al 1988). Em humanos, a exposição pré-natal a música tem mostrado benefícios para o desenvolvimento do feto, associando-se a melhoria no desenvolvimento cerebral, na aprendizagem espaço-temporal neonatal e a maior rapidez no desenvolvimento motor (Chen et al 1994). A interacção do ambiente envolvente da mãe com o seu feto é, assim, um factor a considerar em propostas de intervenção na grávida.

#### 1.6.4 Relaxamento em ambientes clínicos

Vários métodos foram utilizados para relaxamento em cenários clínicos: massagem e auto-sugestão (Alder et al 2011), banhos de imersão, relaxamento guiado por terceiros (Teixeira et al 2005) ou pelo próprio (Chuang et al 2011, Fink et al 2011), yoga (Narendran et al 2005) e música (Chang et Chen 2005). Todos os métodos mostraram ser eficazes no relaxamento, mas só a música comercial é aplicável de forma prática e rotineira em locais onde se realizam exames médicos. Mesmo formas musicais específicas de comprovada eficácia, como músicas de 60-80 bits por minuto, concebidas para grávidas ou crianças (Chang et al 2008), ou apenas batimentos regulares calmos que simulam os batimentos cardíacos (Gadberry 2011), não seriam adequados para este projecto, dado que o objectivo final será utilizar mais tarde a metodologia de intervenção em salas de espera com ocupantes diversificados e não apenas mulheres grávidas. A proposta é aplicável em salas de espera e gabinetes de procedimentos médicos ou nos locais de execução de técnicas invasivas.

Na nossa sociedade, a vida diária pode incluir muitos momentos de ansiedade elevada que são factores de *distress* para a grávida. A realização de um exame clínico invasivo introduz mais um factor ansiogénico à

---

sequência de episódios diários. A ansiedade induzida pela realização de amniocentese, por exemplo, relaciona-se com sentimentos de apreensão por medo de aborto, dor, e dos possíveis resultados do exame. A introdução da música neste trabalho tem como objectivo testar formas acessíveis e não farmacológicas de minimizar a ansiedade/*stress* em mulheres grávidas em ambientes clínicos, desviando-lhes a atenção da fonte de ansiedade.

A amniocentese pode ser usada como paradigma não experimental para avaliação dos efeitos da ansiedade aguda na grávida (Sarkar et al 2008) e, embora como episódio isolado dificilmente tenha significado clínico com efeitos adversos sobre o feto, episódios repetidos de ansiedade aguda sobreposta a outras situações de ansiedade ou *stress* podem-se revelar prejudiciais. Gutteling et al (2005) mostraram que a ansiedade da mãe às 16 semanas (aborrecimentos diários e medo acerca do curso da gravidez e do parto) se associou a maior subida do cortisol nos seus filhos aquando da vacinação aos 5 anos. Este *timing* de gestação é coincidente com o de muitas participantes na amostra do presente estudo.

Neste estudo colocou-se a hipótese de que mulheres grávidas sujeitas a um factor ansiogénico em ambiente clínico beneficiam de relaxamento. Esse benefício poder-se-á traduzir por redução da ansiedade, da frequência cardíaca, da pressão arterial, e dos níveis plasmáticos de cortisol e testosterona. Como os níveis de cortisol são mais elevados e menos responsivos ao *stress* de manhã que de tarde e desconhece-se se o relaxamento terá efeitos idênticos, a amostra foi aleatorizada pelas duas metades do dia.

## 1.7 Rácio digital 2D:4D

O rácio digital (RD) 2D:4D entre o segundo dedo (2D) ou indicador, e o quarto (4D) ou anelar, é desde há muito conhecido como um traço antropométrico sexualmente dimórfico (Ecker 1875, citado em McIntyre 2006) e é caracteristicamente mais baixo no sexo masculino que no feminino (Manning et al 1988, 2000). Existe evidência de que o 2D:4D se correlaciona negativamente com a testosterona *in útero* (Manning et al 1998) e positivamente com os estrogénios pré-natais (Manning 2012). O facto de traduzir indirectamente o grau de androgenização *in útero* suscitou grande interesse por parte dos investigadores. Acresce que o dimorfismo sexual do 2D:4D pode ser avaliado em fetos desde as 14 semanas (Malas et al 2006), mantendo-se após o crescimento da puberdade (McIntyre et al 2005), o que o valoriza. A evidência desta associação tem sido maioritariamente indirecta. Alguma evidência directa foi introduzida por trabalhos em indivíduos de ambos os sexos com hiperplasia congénita da supra-renal (HCSR). Esta situação clínica associa-se a altos níveis de androgénios *in útero* desde as 8 semanas de gestação e, como previsto, estes indivíduos apresentaram RDs significativamente mais baixos que os controlos (Brown et al 2002, Buck et al

---

2003). Também mulheres com ovários poliquísticos (Cattrall et al 2005) apresentaram um 2D:4D baixo e uma menarca mais tardia (Matchock 2008), confirmando a possível influência dos níveis de testosterona pré natal. O quociente testosterona/estradiol no LA aparenta estar negativamente correlacionado com o 2D:4D (Lutchmaya et al 2004) e o tamanho das repetições no terminal do receptor de androgénio (CAG), foi também associado ao RD (Manning et al 2003a) tendo mostrado capacidade preditiva nas mudanças mais tarde observadas na mão esquerda de rapazes entre as duas semanas e os 12 meses de idade (Knickmeyer et al 2011). As correlações encontradas corroboraram a influência pré-natal da testosterona e dos estrogénios e, recentemente, um estudo em roedores mostrou evidência directa de que ambas as hormonas determinam o 2D:4D em ratos numa janela temporal estreita do seu desenvolvimento, constatando-se que as hormonas sexuais controlam a expressão de pelo menos 19 genes associados ao desenvolvimento do esqueleto e à regulação do crescimento dos dedos (Zheng et al 2011).

O rácio 2D:4D desenvolve-se precocemente e tem mostrado robustez mesmo quando se usam diferentes protocolos de medição, que variaram entre:

1. medição directa dos dedos de fetos mortos a partir das 9 semanas (Malas et al 2006)
2. medição directa dos dedos de crianças a partir dos 2 anos de idade (Manning et al 1998)
3. fotocópias dos dedos de crianças dos 3 meses aos 17 anos (Manning et al 2004, Trivers et al 2006, McIntyre et Alexander 2011)
4. radiografia dos dedos desde 1 mês de vida até aos 18 anos (McIntyre et al 2005)
5. auto-medição directa em adultos (Caswell et Manning 2009) (em grandes amostras).

O RD parece aumentar desde a infância até à idade adulta (McIntyre et al 2005) e o dimorfismo sexual poderá ser influenciado por factores genéticos e pela interacção desses factores com as hormonas sexuais (Manning et al 2002a, 2007). Este tema tem despertado grande interesse, o qual se tem traduzido por múltiplas publicações de estudos epidemiológicos e comportamentais. Contudo, os estudos de avaliação directa da associação entre o 2D:4D e os níveis hormonais são escassos e a evidência da relação com androgénios pré-natais no ambiente materno e fetal requer validação (Lilley et al 2010).

O rácio 2D:4D parece ser um indicador antropométrico simples, fácil de medir, fiável e reprodutível em qualquer população. Pela sua associação à testosterona, a qual se sabe actuar precocemente na diferenciação cerebral e estar subjacente a diferenças de comportamento específicas, sugere a possibilidade de ser utilizado para acompanhar desde cedo indivíduos em risco de patologia ou de problemas comportamentais relacionados com a exposição a níveis elevados de androgénios.

---

É possível que o *stress* antenatal interfira no fenótipo do RD dos descendentes. Há factores ambientais que parecem associar-se a alterações epigenéticas, condicionando respostas na plasticidade do indivíduo em desenvolvimento, com tradução fenotípica ao nascer (Gluckman and Hanson 2010). No modelo animal, o *stress* materno aparentemente interfere com a variação do 2D:4D das crias, principalmente nas fêmeas (Lilley et al 2010). Por outro lado, o comprimento dos membros, um marcador biológico funcionalmente sensível ao *stress* antenatal, em fetos mortos humanos não se mostrou associado com o rácio digital (Van Dogen et al 2009). O desenvolvimento do organismo pode responder de forma plástica ao *stress*, dependendo da intensidade e altura em que ocorre a “agressão”, e os níveis de cortisol e testosterona influenciam a diferenciação de órgãos e sistemas durante o desenvolvimento *in* útero. Assim, é expectável que vários biomarcadores possam indiciar trajectórias de desenvolvimento alterado numa fase precoce (Gluckman and Hanson 2010). O baixo peso ao nascer é largamente apontado como um desses marcadores (Ronald et al 2002), mas outros são igualmente conhecidos, como a largura entre as cristas ílicas (Barker et al 2008), ou a assimetria do número de pregas palmares (Sanders et al 2002), também relacionados com os níveis de hormonas esteróides *in* útero. Neste contexto, o RD 2D:4D poderia constituir um indicador indirecto do *stress* antenatal.

Que seja do meu conhecimento, a testosterona no plasma da grávida nunca foi confrontada directamente com o rácio digital. A existência de associação entre ambos reforçaria a validação do 2D:4D (McIntyre 2006) como bioindicador da exposição do feto a androgéneos. Este trabalho investiga pela primeira vez a correlação directa entre o RD 2D:4D na mãe e no recém-nascido e, simultaneamente, os níveis de testosterona e cortisol maternos e no líquido amniótico, procurando isolar a influência genética e hormonal pré-natal sobre os rácios das influências ocorridas após o nascimento.

### 1.7.1 Testosterona e rácio digital

A testosterona (T) em humanos é, como vimos atrás (1.2.1.2), maioritariamente produzida nas gónadas e nas glândulas supra-renais, sendo uma pequena parte proveniente do tecido adiposo periférico (van Anders 2012). A produção no feto inicia-se pelas 7 semanas, e o pico inicial ocorre entre as 14 e as 18 semanas (Reyes et al 1974). Logo após o parto, alguns autores referem um primeiro pico de testosterona que, duas semanas mais tarde, baixa para os níveis normais da infância (McIntyre 2006, Forest 1990). A testosterona volta a subir cerca de dois meses após o nascimento e mantém-se elevada até aos 4 a 6 meses (Forest et al 1973, Faimen et al 1974, Winter et al 1976). O terceiro pico pós-natal inicia-se na puberdade e continua pela vida adulta. Em recém-nascidos, a proporção de testosterona biologicamente activa é muito inferior à observada em homens adultos (de Ronde et al 2005), apesar disso, o segundo pico pós-natal é crítico para o normal desenvolvimento dos genitais e da função reprodutiva (Main et al 2006). As diferenças

---

entre sexos que surgem antes da puberdade no rácio digital 2D:4D são normalmente atribuídas aos efeitos da testosterona pré-natal e neonatal, a primeira associada a efeitos biológicos que determinam as diferenças sexuais observadas ao nascer (McIntyre 2006). A diferenciação sexual continua depois do nascimento, mas as diferenças evidentes só voltam a surgir com os caracteres sexuais secundários da adolescência. Uma meta-análise (Honekopp et al 2006) não encontrou correlação entre 2D:4D e níveis de testosterona plasmática avaliada nos homens adultos, reforçando a tese do estabelecimento do rácio *in* útero.

Há poucos estudos sobre o rácio 2D:4D de recém-nascidos (Knickmeyer et al 2011) e nenhum nas primeiras horas de vida, conjugando com os rácios das mães e com informação sobre o ambiente hormonal materno e fetal. A concentração de testosterona no LA e no plasma das mães é investigada pela primeira vez neste estudo, permitindo avaliar as características do rácio ao nascer isolando os efeitos pré-natais dos pós-natais.

A fase pós-natal de desenvolvimento das células de Leydig e a secreção de testosterona nos humanos está dependente da reactivação do eixo HHSR (Mann et Fraser 1996), ao contrário do que se passa na fase intra-uterina (Prince 2001). Essa função é dependente da LH e possivelmente da ACTH e sugere um mecanismo de controlo comum para o eixo HHSR e as gónadas (Sarkar et al 2007a). Este aspecto é importante e pode ajudar a compreender os efeitos do *stress* na produção de testosterona. Em primatas, foi bloqueada a activação neonatal do eixo HHSR-G através da administração de antagonistas da *Gonadotropin Releasing Hormone*, o que impediu a maturação das células de Leydig (Prince et al 1998) e a produção de testosterona (Lunn et al 1994), reforçando a ideia de que níveis plasmáticos elevados de testosterona estão associados a aumento dos níveis de gonadotropinas (Faiman et al 1974). Níveis de glucocorticóides (GC) aumentados em resposta ao *stress* reduzem a produção de CRH no hipotálamo, levando à redução da testosterona no adulto em situações de *stress* prolongado (van Anders 2012). Não se sabe se este mecanismo se aplica ao pico de testosterona no feto no início do segundo trimestre de gestação, parecendo serem outros os mecanismos envolvidos. Gitau et al (2005) encontraram correlação positiva entre cortisol e testosterona no plasma de fetos. No LA, Sarkar et al (2007a), encontraram também correlação entre as duas hormonas, sugerindo que o *stress* pode associar-se a níveis aumentados de testosterona no feto.

### 1.7.2 *Stress* e rácio digital

Um estudo em roedores encontrou nos dois sexos associação entre níveis elevados de corticosterona na progenitora (não os níveis de testosterona) antes da gravidez e menor RD na pata direita (não na esquerda), (Lilley et al 2010). Níveis elevados de corticosterona em roedores são indicadores de *stress*, pelo

---

que o *stress* materno parece ter contribuído para alguma da variação no 2D:4D das crias. Um outro estudo encontrou também associação entre corticosterona circulante elevada e 2D:4D no rato adulto: o dobro dos níveis, associou-se a animais mais velozes e com RD maior na pata direita comparativamente aos controlos, (Rhy et al 2008). Estes últimos resultados contrariam a associação de níveis mais elevados das hormonas do *stress* a fenótipos mais masculinos, mas devem, no entanto, ser vistos com cuidado pois podem estar enviesados pela escolha genética das estirpes (ratos pré-seleccionados por serem velozes) (Lilley et al 2010). No estudo de Lilley o valor médio de testosterona, basal ou administrada, não mostrou interferência no RD das crias nem associação com o 2D:4D em nenhuma das patas nos descendentes. Estes achados indicam que níveis elevados de corticosterona podem afectar o grau de assimetria lateral do rácio digital.

Em humanos há poucos estudos que tenham avaliado a relação do RD com outras hormonas, além da testosterona. Lutchmaya et al (2004) numa amostra de 29 rapazes e raparigas encontrou associação significativa entre o RD 2D:4D e o rácio estradiol/testosterona. Noutra pequena amostra de raparigas também foi encontrada associação entre estradiol e 2D:4D (McIntyre et al 2007). Outros autores (Manning et al 2006, Manning et Fink 2008) também encontraram baixos RDs associados a concentrações elevadas de testosterona e altos RDs com concentrações elevadas de estrogénios, sugerindo que o desenvolvimento pode ser fortemente influenciado por factores pré-natais, nomeadamente pelas hormonas sexuais numa fase precoce (Van Dongen et al 2009). Uma eventual associação entre o cortisol na mãe e no LA e o 2D:4D nos recém-nascidos é avaliada no presente estudo.

### 1.7.3 Genética e 2D:4D

Os efeitos das hormonas sexuais são modulados pela expressão génica dos receptores de androgénios (RA) (McIntyre 2006, Knickmeyer et al 2011). A expressão génica dos receptores de estrogénio também está envolvida (Manning et al 2002b, Manning 2012), podendo o 2D:4D correlacionar-se com a testosterona, com os estrogénios e com os factores de risco de ambas para doença (Manning et al 2002b, 2003a, Manning 2012). Em humanos, o gene do receptor de androgénios (RA) contém uma repetição CAG (Citosina-Adenina-Guanina) de comprimento variável na população (mediana=21, mín-máx 11–31 CAG's (Ding et al 2004)). A repetição CAG codifica uma repetição da glutamina no domínio de transactivação N-terminal da proteína do receptor. Sequências curtas têm sido associadas a maior activação do receptor e consequente masculinização, (Ding et al 2004, Okten et al 2003) e são mais frequentes em populações Afro-Americanas, que se sabe terem um rácio digital menor que outras populações (McIntyre 2006). Sequências longas têm sido associadas a maior RD, a níveis baixos de testosterona ou altos de estrogénios e



---

a maior susceptibilidade para cancro da mama na mulher e enfarte de miocárdio no homem (Manning 2001d, 2002b).

A diferenciação do feto em fenótipo masculino é dependente em primeiro lugar da presença do gene SRY, localizado no cromossoma Y (Sinclar et al 1990). Em humanos, essa diferenciação leva ao desenvolvimento das gónadas entre as 7 e as 14 semanas de gestação, sendo a produção de testosterona a partir dessa altura assegurada pelo feto (Prince 2001), mas não há associação conhecida do SRY a qualquer outra diferenciação sexual secundária noutros tecidos. A testosterona, por sua vez, é responsável pelos efeitos organizacionais no processo de diferenciação masculina na genitália, cérebro e outros órgãos e sistemas (Migeon et Wisniewsk 1998, Phoenix et al 1959) e por efeitos na programação fetal (Gluckman et al 2008). Os efeitos da testosterona nos ossos, particularmente relevantes para determinar o comprimento dos dedos, são mediados em boa parte pela aromatização local em estradiol, que depois actua nos receptores de estrogénios  $\alpha$  e  $\beta$  (McIntyre et al 2005).

Nas espécies de vertebrados, incluindo os humanos, a família dos genes Homeobox (Hoxa e Hoxd) é essencial para a diferenciação tanto do sistema urogenital (incluindo testículos e ovários), como dos dedos das mãos e dos pés (Herault et al 1997, Peitchel et al 1997, Manning et al 2000a, 2003c). Nos ratos, a desregulação do Hoxd altera o comprimento relativo dos dedos e afecta a configuração genital e a diferenciação do pénis (Kondo et al 1997). A mutação, desregulação, ou translocação cromossómica ocorrida nos 39 genes HOX, associa-se nos humanos a síndromes malformativas (por exemplo, síndrome mão-pé-genital, sindactilia e malformações genitais) e processos de oncogénese (algumas leucemias e linfomas, tumores sólidos do trato genital, rins ou pele, entre outros), porque também estão envolvidos no controlo do crescimento das células (Manning et al 2003c). Patologias ou situações com incidência ligada ao sexo (idade do aparecimento do cancro da mama, contagem de espermatozóides no homem, idade de ocorrência do enfarte de miocárdio) mostraram ter correlação com o rácio 2D:4D (Manning et Leinster 2001d, Manning e Taylor 2001c, Manning e Brunded 2001b), podendo este rácio mostrar-se útil como marcador de susceptibilidade, de idade de apresentação e de prognóstico nestas diferentes situações (Manning et al 2003c). Mas outros factores genéticos podem estar envolvidos na diferenciação das gónadas em ambos os sexos: no cromossoma X, o gene WNT-4 controla a secreção de factores de crescimento no sexo feminino e, conjuntamente com o gene DAX1, interfere no desenvolvimento e impede a formação de testículos (Gobrogge et al 2008). Estas influências genéticas específicas de cada sexo (não partilhadas) podem incluir variações na produção de androgénios.

As ligações entre o desenvolvimento dos dedos e das gónadas, levou Manning e colaboradores (1998) a sugerirem que os padrões de diferenciação dos dedos, em particular o rácio 2D:4D, podem reflectir padrões de diferenciação das gónadas, e conseqüentemente da produção pré-natal de testosterona e de

estrogénio. O dimorfismo no rácio foi encontrado em humanos a partir dos 2 anos de idade em diferentes raças e culturas (Manning 2002a), havendo evidência de ser mais marcado entre diferentes populações e etnias do que entre sexos (McIntyre 2006). Um estudo levado a cabo na Austrália com caucasianos (Loehlin et al 2006), sugere que as diferenças entre a herança genética de diferentes populações, por oposição às diferenças ambientais, são a causa provável das diferenças entre os seus rácios digitais médios, contudo, a contribuição relativa de aspectos genéticos e ambientais externos e internos para o rácio digital no homem e na mulher é ainda pouco conhecida.

Outro aspecto sob investigação é a bilateralidade. Alguns estudos sugerem que o padrão de desenvolvimento da mão esquerda é influenciado essencialmente por aspectos genéticos, ao contrário da mão direita, a qual será mais influenciada pelos níveis de testosterona (Cohen-Bendahan et al 2005, Buck et al 2003), principalmente nos indivíduos masculinos. A corroborar esta hipótese, um estudo entre gémeos monozigotos e dizigotos, mostrou que a influência da hereditariedade sobre o rácio digital da mão esquerda é significativa, principalmente nos homens (Gobrogge et al 2008). Nos dois tipos de gémeos, foi encontrada correlação idêntica entre as mãos direitas dos gémeos, sugerindo que esta mão é mais influenciada pelos androgénios que a esquerda. Numa mão mais influenciada pela genética, a correlação deveria ser superior nos gémeos monozigóticos.

Os mecanismos genéticos podem eles próprios ser condicionados pelos níveis de androgénios. Como já foi referido, o estudo de Zheng et Cohn (2011) em roedores mostrou participação da testosterona e dos estrogénios na regulação da expressão de genes envolvidos na formação do esqueleto. Em gémeos dizigóticos onde haja uma rapariga e um rapaz, as raparigas apresentaram um rácio digital parcialmente masculinizado (Van Anders 2006, Voracek e Dressler 2007, Hampson et al 2008), consistente com a difusão de pequenas quantidades de androgénios do sexo masculino para o feminino durante a gestação, o mesmo se tendo já verificado em roedores (Even et al 1992, Ryén 2002). Apesar disso, a maior semelhança do rácio entre gémeos monozigotos, por comparação com dizigotos, sugere que a genética deve desempenhar um papel importante (Gobrogge et al 2008).

#### 1.7.4 Implicações clínicas do rácio digital

Em várias populações constata-se que existe tendência para as mulheres terem rácios digitais 2D:4D maiores que os homens (Phelps 1952, Manning et al 1998, Manning et al 2000b). A conhecida acção dos androgénios pré-natais na masculinização, está subjacente à hipótese de correlação negativa entre rácio digital e testosterona (Manning et al 1998, Robinson et al 2000). Os resultados já referidos (1.7) em

---

indivíduos com HCSR, uma condição associada a hiperandrogenismo por deficiência enzimática, constituem forte evidência para o papel dos androgénios, pois tanto indivíduos masculinos como femininos apresentam rácios inferiores aos controlos sem HCSR (Brown et al 2002, Okten et al 2002) e os estudos supra citados em gémeos dizigóticos também corroboram estes resultados (van Anders 2006, Voracek 2007). A relação encontrada entre o rácio 2D:4D e o número de repetições CAG no RA (Ding 2004, Manning et al 2003a) é bastante relevante, pois baixos números de repetições CAG e baixo rácio 2D:4D, os quais se associam a elevada actividade dos receptores de androgénios, estão por sua vez ambos associados a elevado número de espermatozóides no espermograma (Giguere et al 2001). O rácio 2D:4D pode ser um fenótipo indicador do comprimento das repetições CAG (Knickmeyer et al 2011) e ter capacidade preditiva em situações também associadas ao tamanho dos receptores, como o autismo e o síndrome de Asperger, ou de cancro de mama na mulher (associados a CAGs curtos) e de situações de enfarte de miocárdio precoce no homem (associado a CAGs longos) (Manning et al 2002b, 2003a).

Homens com rácio digital alto (baixa androgenização) mostraram ter maior ansiedade, aproximando-se dos resultados de ansiedade nas mulheres. A ansiedade subclínica, porém, não apresentou correlação com o 2D:4D (Evardone et al 2007). O rácio 2D:4D também aparentou estar associado ao tamanho das famílias, e os baixos rácios nos homens associaram-se a maior contagem de espermatozóides, mais testosterona e menos estrogénios (Manning 2002a).

Estudos que avaliaram a orientação sexual em mulheres verificaram que o lesbianismo está associado a RD 2D:4D significativamente menores que a heterossexualidade, sugerindo associação a níveis de androgénios mais elevados in útero (James 2001, McFadden and Shubel 2002, Tortorice 2002).

No que respeita à homossexualidade nos homens, não existe evidência de uma relação clara e os resultados são variáveis no que respeita ao RD. Em modelos animais, incluindo primatas, menores níveis de androgénios *in* útero associam-se a comportamentos menos tipicamente masculinos. Em homens heterossexuais o RD foi menor do que em homens com comportamentos menos tipicamente masculinos, mas há falta de resultados consistentes (Robinson et Manning 2000, James 2001).

Em resumo, o 2D:4D poderá ser utilizado como marcador antropométrico no rastreio de indivíduos em risco para algumas patologias e comportamentos, podendo a sua caracterização ser feita no RN.

### 1.7.5 Rácio digital no Recém-Nascido

Existe alguma controvérsia quanto ao estabelecimento *in* útero, ou após o nascimento, do dimorfismo final do comprimento dos dedos em humanos. Garn et al (1975) verificaram que o comprimento das falanges é adquirido precocemente, pelo final das 13 semanas de gestação, altura de franco desenvolvimento das

células de Leydig e do primeiro pico de produção de testosterona (Prince 2001). Alguns autores assumiram desde então que o dimorfismo sexual no 2D:4D é adquirido *in útero* e que se mantém estável pela vida fora (Garn et al 1975, Manning et al 1998, 2000, Brown et al 2002, Malas et al 2006). Posteriormente, Trivers et al (2006) num estudo longitudinal em crianças, encontraram um aumento significativo no rácio 2D:4D dos 7-13 anos para os 11-17 anos em ambos os sexos e McIntyre et al (2005) documentaram o aumento longitudinal no 2D:4D da infância para a idade adulta. Também Galis et al (2010) numa amostra de 327 fetos mortos (14 a 42 semanas) encontraram nos dois sexos rácios 2D:4D menores do que o reportado para crianças e adultos, sugerindo que o rácio pode aumentar depois do nascimento e um pouco mais em mulheres do que em homens. McIntyre et Alexander (2011), em 74 crianças dos 3-5 meses também encontraram um rácio médio mais baixo que em crianças mais velhas e adultos, embora maior do que o reportado por Galis et al (2010).

Recentemente, Knickmeyer et al (2011) relataram o seguimento de recém-nascidos, desde as duas semanas pós-parto até aos dois anos, acompanhando o RD 2D:4D ao longo do pico pós-natal da testosterona. Este estudo encontrou associação entre, por um lado, a variação do RD e, por outro, os níveis de testosterona pós-natal e a variação no comprimento do CAG do receptor de androgénio (Knickmeyer et al 2011). Assim, o RD parece não ser fixo à nascença, aumentando durante a infância e havendo evidência de que tanto o desenvolvimento pré como pós natal podem estar envolvidos na determinação do dimorfismo encontrado no adulto.

Os resultados da avaliação do 2D:4D nas primeiras horas de vida traduzem unicamente a influência do primeiro pico de testosterona, isolando assim os efeitos da androgenização pré e pós natais. Os valores hormonais de cortisol e testosterona no plasma da mãe e no LA e a caracterização dos níveis de ansiedade materna na altura da amniocentese poderão pôr em evidência associações entre estas variáveis, ajudando a compreender a influência do ambiente hormonal da mãe e do feto no 2D:4D do RN. Neste estudo pretende-se investigar as características do rácio à nascença, as suas correlações com o rácio da mãe e as influências relativas do ambiente hormonal fetal e materno para o 2D:4D.

## **2. Prioridades, Objectivos e Estrutura da Tese**

---

## 2.1 Conclusões que levaram às prioridades da tese

A ansiedade materna durante a gravidez, quer ocasional e aguda, quer persistente, parece promover a subida do cortisol e interferir nos níveis plasmáticos de testosterona. Ambas as hormonas intervêm de forma diferente no desenvolvimento da estrutura e função de várias zonas do cérebro do feto, sendo expectável que variações nas mesmas tenham repercussões após o nascimento. As consequências, já referidas na introdução, de níveis elevados de cortisol e de variações da testosterona *in útero*, as quais se reflectem posteriormente na criança e no adulto, apontam para a necessidade de investigar e desenvolver estratégias de intervenção destinadas a reduzir esses níveis ou a atenuar o seu efeito adverso. Indicadores antropométricos da exposição androgénica *in útero*, como o rácio entre os dedos indicador e anelar (2D:4D), podem ser uma mais-valia para antecipar o desenvolvimento do indivíduo, mas carecem de validação.

Em ambiente clínico, os exames invasivos são reconhecidamente indutores de *stress* agudo e a realização eminente de uma amniocentese, em particular, é considerada um stressor clínico pelos níveis de ansiedade induzidos na grávida (Ng et al 2004, Csaba et al 2006). Estudos anteriores avaliaram a associação entre estados de ansiedade induzida por amniocentese eminente e respostas do cortisol (Sarkar et al 2006), tendo as mães com mais elevado estado de ansiedade mostrado correlação positiva, embora modesta, com os níveis de cortisol no plasma. Glover et al (2009) verificaram que a correlação entre o cortisol no plasma e no líquido amniótico aumentava com o aumento do estado e do traço de ansiedade das mães.

Os efeitos do relaxamento agudo na ansiedade durante a gravidez foram avaliados por outros autores (Teixeira et al 2005), os quais relataram reduções na ansiedade e nos níveis de cortisol, embora os resultados variassem com o tipo de relaxamento, sendo mais favoráveis quando envolveram uma atitude passiva por parte da grávida. Um outro estudo recente (Fink et al 2011), também mostrou que o relaxamento passivo é mais favorável para a mãe e sugeriu que os próprios fetos podem participar no relaxamento materno, uma vez que foi encontrada associação entre este e a frequência cardíaca fetal. A audição de música, em particular, além de ser um método de fácil implementação, tem mostrado resultados consistentes na redução da ansiedade e melhoria do bem-estar na grávida (Sidorenko 2000, Chang et al 2008, Yang et al 2009, Kafali et al 2011).

De manhã, os níveis de cortisol são mais elevados e a resposta ao *stress* é reduzida ou não detectável, mas à noite foi encontrada associação entre *stress* na grávida e níveis elevados de cortisol mesmo acima das 30 semanas de gestação (Obel et al 2005), altura em que o eixo HHSR está mais refractário. Não se sabe se o relaxamento também tem impacto sobre o

cortisol, embora presumivelmente actue em sentido contrário, conduzindo à sua redução. Existe portanto carência de investigação neste domínio.

O rácio digital 2D:4D, por outro lado, tem sido proposto como um marcador indirecto dos níveis de testosterona e de estrogénio *in útero*, com potencial valor preditivo na identificação de comportamentos e patologias, permitindo implementação de estratégias terapêuticas e comportamentais preventivas.

Este estudo avalia a resposta psicológica e hormonal (cortisol e testosterona) à ansiedade da mãe, perante a realização de um exame clínico invasivo, e a respectiva resposta ao relaxamento. Pretende contribuir para compreender diferenças entre os métodos de intervenção, entre horas do dia, idade das mulheres, bem como outras fontes de variabilidade. Além disso, o acompanhamento das grávidas no parto permitiu introduzir uma componente longitudinal no estudo, traduzida no registo dos dados do parto, do recém-nascido, e da medição dos dedos de ambas as mãos da mãe e respectivo filho. Estas medições possibilitaram a posterior determinação do rácio digital 2D:4D e sua comparação com os níveis de hormonas anteriormente avaliados no plasma materno e no líquido amniótico, o que é feito pela primeira vez e pode contribuir para maior compreensão do balanço entre efeitos genéticos *versus* ambientais neste rácio.

## 2.2 Hipóteses e objectivos

O conhecimento actual relativo à programação fetal, já anteriormente sumariado na Introdução, ilustra a necessidade de investigar métodos de intervenção que visem diminuir eficazmente o *stress* sentido pela grávida e que, preferencialmente, sejam de fácil implementação, quer doméstica, quer no contexto da clínica. Por outro lado, ao nível do RN, vimos como é reconhecida a importância de dispor de indicadores expeditos do grau de exposição a androgénios durante o período antenatal. Com este pano de fundo, nesta tese foram formuladas as seguintes hipóteses:

H1. Meia-hora de relaxamento é suficiente para baixar os níveis de ansiedade e de cortisol

H2. Ouvir música é um relaxante mais eficaz do que ver revistas ou aguardar na sala de espera junto a um familiar

H3. A eficácia da intervenção destinada a relaxar não é constante ao longo do dia e varia com a idade da grávida

H4. As concentrações de cortisol e testosterona no plasma materno estão correlacionadas com as respectivas concentrações no LA

H5. O rácio digital 2D:4D nos recém-nascidos femininos é maior que nos masculinos

H6. O rácio digital do recém-nascido está correlacionado com o rácio da mãe

H7. O RD na mão direita do RN tem correlação com os níveis de testosterona no LA às 16-23 semanas

H8. Níveis de cortisol mais elevados no LA associam-se a RD mais baixo no RN

Para investigar estas hipóteses, foi concebido um estudo dividido em duas fases, cada uma requerendo metodologias distintas. Os objectivos estabelecidos para cada fase baseiam-se nas hipóteses acima enumeradas e foram os seguintes:

### **Fase 1**

1- Avaliar os níveis de cortisol e testosterona no plasma materno antes e após uma intervenção relaxante

2 - Avaliar os níveis de ansiedade, na eminência de um evento stressante, antes e após uma intervenção relaxante

3- Avaliar as diferenças entre as respostas a diferentes intervenções relaxantes na mãe: música, revista, sala de espera

4 – Avaliar a influência de variáveis como a hora do dia, idade da mulher, uso de auscultadores, idade gestacional e outras, no resultado das referidas intervenções

5- Avaliar a associação entre níveis hormonais no plasma materno e no líquido amniótico, idade gestacional, escala de ansiedade, pulso, tensão arterial e Índice de Massa Corporal (IMC)

### **Fase 2**

5- Caracterizar o rácio digital (RD) 2D:4D no Recém-Nascido (RN) em ambas as mãos

6- Investigar associações entre o RD 2D:4D do RN em ambas as mãos e:

a) Níveis de testosterona no líquido amniótico às 16-23 semanas

b) Níveis de cortisol no líquido amniótico às 16-23 semanas

c) Níveis de cortisol e testosterona no plasma materno

d) Rácio digital na mãe em ambas as mãos



### 2.3 Estrutura Geral da Tese

Apresenta-se inicialmente o estado da arte que consubstancia teoricamente os temas desenvolvidos e as hipóteses formuladas. Na *Metodologia* é apresentado o desenho experimental do estudo tendo em conta os objectivos e as variáveis utilizadas (questionário de Spielberger, pulso, tensão arterial, intervenções, colheitas de sangue e de líquido amniótico). O cálculo do tamanho da amostra e os aspectos laboratoriais estão descritos em detalhe e anexados em apêndice, apresentado no fim. A apresentação de *Resultados* está organizada em duas fases: a primeira fase, relativa à intervenção antes da amniocentese, e a segunda fase, relativa às medições efectuadas no pós-parto. A *Discussão* está organizada em subcapítulos, indo ao encontro das hipóteses principais sob investigação e englobando parcialmente os trabalhos publicados, resultantes directamente dos dados obtidos na tese. As limitações do estudo, contribuição para a ciência, conclusões e perspectivas são apresentadas em *Notas finais*, seguido das *Referências bibliográficas*. Em *Apêndice* apresentam-se também os documentos de suporte à colheita de dados.

### **3. Métodos**

---

### 3. Métodos

O planeamento da metodologia de intervenção utilizada na Fase 1 do estudo teve em conta a facilidade da sua aplicação clínica. Admite-se que possa ser de menor eficácia quando comparada com outras formas de intervenção relaxantes (yoga, massagem por especialista, visualização guiada, etc.), contudo, menos acessíveis ou de menor facilidade de utilização.

#### 3.1 Cálculo da amostra inicial

O tamanho mínimo da amostra mereceu atenção especial no início deste estudo. A metodologia para o determinar depende, em geral, das perguntas colocadas e das análises estatísticas a efectuar. Os aspectos técnicos do assunto são abordados no Anexo I. Concluiu-se que para a investigação levada a cabo nesta tese, uma amostra total com  $n=180$  deveria detectar diferenças moderadas entre médias (por exemplo, a variação média do nível de cortisol em cada grupo de intervenção por relaxamento) com 85% de potência, para variáveis de natureza tão díspar como o nível hormonal e a resposta a testes psicológicos. A mesma dimensão amostral aparenta também poder detectar, com potência superior a 80%, associações globais moderadas ou fortes entre as principais variáveis em estudo. Para diferenças pequenas e associações fracas, uma amostra com  $n=180$  pode ter potência um pouco inferior a 80% e, neste caso, o aumento da potência aparenta requerer um incremento desproporcionado do tamanho da amostra. Contudo, para além das dificuldades práticas e financeiras colocadas por um grande aumento da amostra, muitas vezes é questionável o significado clínico ou fisiológico de efeitos pequenos e de associações fracas entre variáveis. A Tabela I-2 do Anexo I, por exemplo, sugere que  $n=180$  permite detectar uma diferença de 40 nmol/L na variação de cortisol entre grupos, com potência de  $P=80\%$ . Contudo, para se conseguir detectar uma diferença de 30 nmol/L com o mesmo  $P$ , a amostra teria de ser  $n \geq 315$ . É discutível, contudo, se uma diferença média de 30 nmol/L entre grupos tem significado fisiológico, quando o nível médio do cortisol à partida era de 680,4 nmol/L (Tabela I-1, Anexo I). Em termos práticos, uma amostra mínima com um tamanho de  $n=180$  foi tomada como referência orientadora.

#### 3.2 Participantes e recrutamento

As participantes na primeira fase deste estudo foram seleccionadas entre a população de grávidas encaminhadas por médicos do próprio serviço ou por outros médicos do serviço público ou privado, que habitualmente recorre ao HDE para realizar diagnóstico pré-natal (DPN). As participantes na segunda fase foram recrutadas entre as que participaram na primeira fase e que manifestaram intenção de ter parto no Hospital Dona Estefânia (HDE).

Todas as grávidas que pretendiam fazer amniocentese no HDE eram agendadas para uma consulta prévia onde era avaliada a situação clínica e os exames da gravidez. Era dada informação sobre o procedimento, riscos e recomendações e era solicitada assinatura de consentimento informado para fazer ou não amniocentese, após esclarecimentos.

O recrutamento para este estudo foi efectuado pela própria investigadora nas consultas de Diagnóstico Pré-Natal (DPN) do HDE entre Novembro de 2009 e Janeiro de 2011. Foi dada informação sobre o estudo a 331 grávidas, mas participaram apenas 188 grávidas (Capítulo 4). Os seus dados foram recolhidos e registados em ficha individual (Anexo III) e transcritos para base de Excel®. Após a amniocentese, as grávidas que manifestavam intenção de ter o parto no HDE, eram convidadas a participar na segunda fase do estudo. Os nomes eram integrados numa lista afixada no Bloco de Partos, Enfermaria de Puérperas e Neonatologia e verificada regularmente a sua presença no internamento. Os dados referentes aos partos fora do HDE (n=60) e respectivos recém-nascidos foram obtidos por contacto telefónico com as mães.

### Critérios de Inclusão

Foram consideradas apenas gravidezes simples, com fetos estruturalmente normais (confirmado por ecografia prévia de datação e avaliação no primeiro trimestre) e com fluência na língua portuguesa.

### Critérios de Exclusão

Foram excluídas grávidas sob medicação psiquiátrica, esteróides ou outra medicação além de vitaminas, com doenças crónicas, com fobia de agulhas, fumadoras, sujeitas a técnicas de reprodução medicamente assistida, ou com indicação para amniocentese além de idade materna ou rastreio bioquímico positivo, e ainda patologia materna ou fetal posteriormente detectada.

### Consentimento informado

O consentimento informado correspondente a cada uma das fases do trabalho era assinado respectivamente no dia da amniocentese, após conversa inicial para renovar esclarecimentos (Fase 1) e antes de proceder à medição e registo dos rácios digitais das mães e respectivos recém-nascidos (RN) após o parto (Fase 2) (Anexo III).

### Comissão de ética

O projecto inicial e a adenda submetida mais tarde, correspondente à reformulação da segunda fase do estudo, foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital nas seguintes datas: 1 Junho 2006 e 15 Julho 2010 (Anexo III).

### Realização da Amniocentese

A amniocentese (AC) era realizada imediatamente após concluído o período de intervenção no grupo de estudo, de acordo com agendamento prévio feito com base em critérios clínicos (idade gestacional, motivo da amniocentese). A medição da Frequência Cardíaca Fetal (FCF) era feita por ecodoppler antes e depois da AC.

### Aleatorização por grupos de intervenção

A aleatorização das participantes foi feita alocando sequencialmente cada mulher a um grupo, usando um gerador aleatório de algarismos entre 1 e 9 (1 a 3: música, 4 a 6: revista, 7 a 9: aguardar na sala de espera), e mantendo a sequência manhã/tarde. A sequência manhã/tarde, contudo, não foi sempre respeitada, por questões de agendamento do serviço.

### Controlo de qualidade das colheitas

O controlo de qualidade de todo o procedimento foi feito por um dos co-orientadores. Foi ainda solicitado pontualmente a observadores externos que presenciassem algumas sessões e exprimissem depois o seu parecer quanto à adequação dos procedimentos. Foram feitos inicialmente pequenos ajustes de abordagem, baseados nalgumas sugestões.

Seguidamente apresentam-se os Protocolos aplicados nas duas Fases do estudo, descrevendo-se depois os detalhes das várias etapas de cada Protocolo.

## 3.3 Protocolo da Fase 1

À chegada da grávida, após assinatura do consentimento informado e colher informação sobre dados epidemiológicos, covariáveis, idade materna e gestacional, era avaliada pressão sanguínea arterial e pulso. Era em seguida dada instrução sumária sobre o preenchimento do questionário de avaliação do estado e traço de ansiedade de Spielberger (vêr descrição abaixo).

Posteriormente, uma veia periférica do braço não dominante era canalizada e colhidos 4,9 ml de sangue. (vêr Anexo II “Procedimentos laboratoriais”). As participantes eram então alocadas a um grupo durante 30 min, de acordo com aleatorização prévia que originou uma ordem escrita num cartão com o número da participante, e incluída no *dossier* individual com as folhas de inquérito e de registo de dados. Havia três grupos de intervenção: 1. Ouvir música sentada, previamente escolhida a partir de um CD de demonstração

dos diferentes tipos de música, com 3 min de duração; 2. Lêr revistas de decoração sentada; 3. Aguardar sentada na sala de espera junto de um familiar ou amigo.

Após o período de 30 min, uma segunda amostra de sangue era colhida conectando directamente um tubo colector ao catéter previamente introduzido. O pulso e a pressão arterial eram novamente medidos, e o questionário de estado e traço de ansiedade de Spielberger novamente preenchido. O catéter venoso era então retirado e a grávida passava para a sala de realização da amniocentese. A frequência cardíaca fetal era obtida por ecodoppler e registada em fotografia antes e depois do procedimento. Na amniocentese, dos habituais 12-17 ml de líquido amniótico colhidos para cariotipagem eram retirados 2-4 ml para determinação do cortisol e testosterona. As amostras de plasma resultantes da centrifugação e as do líquido amniótico eram subdivididas em alíquotas de 1 ml, catalogadas e guardadas em recipiente com gelo e depois armazenadas a -80°C até à realização dos ensaios clínicos. O Anexo II descreve os procedimentos laboratoriais subsequentes.

### 3.4 Protocolo da Fase 2

Após o parto, eram colhidos dados referentes à data e hora, idade gestacional, tipo de parto e parâmetros do recém-nascido. Um consentimento esclarecido e aprovado pela comissão de ética era obtido das mães. Com a colaboração de enfermeiras e da neonatologia, eram obtidas fotocópias de ambas as mãos dos recém-nascidos e suas mães antes da alta hospitalar, para posterior medição dos dedos e cálculo dos rácios digitais 2D:4D. Uma craveira digital com precisão até 0,01mm foi utilizada para as medições.

Descrevem-se em seguida mais pormenorizadamente as várias passagens dos Protocolos supra-mencionados.

### 3.5 Grupos de Intervenção

#### Música

Era solicitado a todas as grávidas que ficassem confortavelmente sentadas com as luzes acesas. A música era ouvida através de colunas ou de auscultadores com igual potência, numa intensidade regulada de acordo com a preferência de cada participante. A escolha da música teve em conta a sua aplicabilidade em ambientes clínicos, ou em qualquer sala de espera de serviços médicos com diversos ocupantes e não apenas em mulheres grávidas, pelo que as músicas escolhidas foram comerciais e maioritariamente conhecidas.

## Seleccção musical

Os quatro tipos de música foram recolhidos a partir de músicas comercializadas, com ritmo e melodia relaxante, quer moderna com voz (A), moderna instrumental (B), clássica instrumental (C) ou jaz com voz (D). Esta selecção final (Anexo III) resultou de uma pré-selecção avaliada por diferentes pessoas do sexo feminino e masculino, grávidas ou não, que emitiram o seu parecer. Um CD de demonstração de 3 min com 4 exemplos de cada tipo de música possível era previamente ouvido pelas participantes do grupo “música” para estas poderem escolher. Foram utilizadas colunas de 15Wats entre 45 a 65 decibéis (dB), ou auscultadores com potência de saída correspondente. A música era ouvida alternadamente através de colunas ou através de auscultadores.

## Revista

As revistas utilizadas foram três revistas genéricas de decoração (Casa dez, House traders, Casas de Portugal), com conteúdos neutros não relacionados com crianças, maternidade ou parto. A todas as grávidas foi pedido para ficarem confortavelmente sentadas e com as luzes acesas.

## Sala de Espera

As grávidas alocadas à sala de espera ficavam confortavelmente sentadas e acompanhadas por familiar ou amiga. No final dos 30 min, eram novamente encaminhadas para a sala de procedimentos para completar o estudo.

### 3.6 Questionário de Spielberger - State and Trait Anxiety Inventory - STAI-S e STAI-T

Na sua forma final (Spielberger 1983) este questionário é um manual de avaliação da ansiedade com dois questionários, o STAI-S (Estado) e o STAI-T (Traço), ambos contendo 20 itens de auto-avaliação. Os sentimentos de ansiedade são pontuados por uma escala de Likert de 4 níveis, variando de “não” a “muito” (Estado) ou “quase nunca” a “quase sempre” (Traço). Os valores finais do STAI variam de 20 a 80, com valores elevados associados a altos níveis de ansiedade. O valor 40 é habitualmente utilizado como critério *cut-off* de estar ansioso ( $\geq 40$ ) ou não estar ansioso ( $< 40$ ), porque tem apresentado boa correlação com a clínica (Ng et al 2004, Sarkar et al 2006). O STAI foi adaptado para mais de 50 línguas e países diferentes e é hoje amplamente aplicado quer na investigação, quer na prática clínica.

Em Portugal, a versão experimental do STAI foi aplicada a 1018 estudantes universitários, dos quais 826 eram do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 18 e os 30 anos. Os valores médios para o STAI-S foram 37 e 40 no sexo masculino e feminino, respectivamente, e para o STAI-T foram 39 e 42 (Daniel 2003). O processo de adaptação e validação foi liderado em Coimbra por Ponciano e colaboradores

(Ponciano et al 2005a,b), mas outros autores contribuíram trabalhando em versões experimentais (Silva et Campos 1999) e aplicando o questionário em várias populações, diferentes regiões do país (Rodrigues et al 2006, Medeiros et al 2006, Matias et al 2006) e em vários contextos (Lopes et al 2002, 2004, Medeiros et al 2004, Cardoso et al 2005, Daniel et al 2006). O resultado final é a versão utilizada neste estudo. É importante que o STAI traduza as características específicas de cada país, pelo que existe também um STAI validado para a língua portuguesa no Brasil (Biaggio et al 1977, Goresnstein et Andrade 1996).

O questionário de auto avaliação de Charles Spielberger adaptado e validado para português de Portugal, era aplicado em dois tempos:

1º. Após colheita inicial de dados epidemiológicos e avaliação dos parâmetros vitais, era explicado o objectivo do inquérito e solicitado o preenchimento com círculo ou cruz nas opções que mais se adequassem ao sentir da participante, sem pensar muito tempo sobre as escolhas: primeira página “como se sente agora, neste preciso momento”, segunda página “como se sente habitualmente no seu dia-a-dia”. Após completado o preenchimento, era verificado se todas as alíneas tinham sido contempladas. Caso alguma estivesse em branco, solicitava-se o seu preenchimento.

2º. Após avaliação dos parâmetros vitais no final do período de 30 min, era solicitado novo preenchimento do questionário, sendo os procedimentos idênticos aos descritos anteriormente.

Critérios de exclusão relacionados com o questionário:

As afirmações do STAI traço e estado pressupõem um conhecimento da língua do país em que está a ser aplicado e uma boa integração nos hábitos sócio-culturais específicos. Algumas das participantes eram oriundas de outros países, mas residiam em Portugal há vários anos estando bem integradas na sociedade e dominavam a linguagem oral e escrita. O conhecimento inadequado da língua foi motivo de exclusão na participação. O preenchimento incompleto eliminava o teste.

### Grelha de classificação

A grelha de classificação para a versão portuguesa resultou dos trabalhos de E Ponciano e colaboradores (Ponciano et al 2004, 2005; Daniel et al 2006; Daniel 2003) e está incluída no Anexo III. Era somada a pontuação obtida em cada questionário e registada na folha de colheita de dados.

## 3.7 Variáveis fisiológicas

Pulso e Pressão Arterial da grávida antes e depois da intervenção: a avaliação do pulso e da pressão arterial (PA) sistólica e diastólica era feita a todas as participantes por medição automática através de Dinamap



Procure 100, da General Electrics, com sistema de impressão de dados incorporado, o que permitiu guardar registo escrito de todas as medições.

As medições eram feitas duas vezes:

1ª. após a conversa inicial onde se davam esclarecimentos suplementares sobre o estudo e após a assinatura do consentimento informado para participação.

2ª. após terminado o período de intervenção com a duração aproximada de 30 min quer no gabinete ouvindo música ou lendo revistas, quer na sala de espera aguardando junto de acompanhante. O pulso e a PA eram registados simultaneamente pelo mesmo aparelho.

### 3.8 Índice de Massa Corporal (IMC)

A fórmula  $\text{peso}/(\text{altura})^2$ , foi utilizada para calcular o IMC a partir do peso (em Kg) e da altura (em metros) estimados no início da gravidez. O IMC na grávida não pode ser calculado através desta fórmula, pois apresenta variáveis (peso do LA e do feto) que não são contempladas. Os cálculos do IMC efectuados com o “peso actual da grávida” foram apenas utilizados para avaliar associações.

### 3.9 Frequência Cardíaca Fetal (FCF)

A relação entre frequência cardíaca e processos de cognição está bem estabelecida em crianças e adultos, mas em fetos requer mais validação (Sandman 2010, Kisilevsky et Hains 2010, DiPietro et al 2004). Foi avaliada e registada a FCF antes e depois da amniocentese. Os resultados foram comparados entre si, com a FC materna e com os valores hormonais no LA (vêr Capítulo 4).

### 3.10 Registos

#### Registo de dados após o parto

Os dados relativos ao parto (Idade Gestacional, Peso ao nascer, Índice APGAR, tipo de parto, entre outros) e às medições do rácio digital da mãe e do RN eram registados numa base de dados em Excel (microsoft®).

#### Registo dos dedos para cálculo do rácio digital 2D:4D

Foi inicialmente estimado que pelo menos 1/3 da amostra inicial (cerca de 60 grávidas) teria de participar na segunda fase para o projecto poder realizar-se. Participaram 108 (sendo duas posteriormente eliminadas). Os rácios da mãe e do RN foram registados em fotocópia para arquivo e posterior leitura. Todas as mães assinaram folha de consentimento informado.

Nota: o projecto da Fase 2 e a respectiva folha de consentimento referia a medição directa dos dedos do RN, o que na realidade não aconteceu por se ter constatado que, além do erro induzido pelos constantes movimentos da criança, a craveira digital dispunha de pontas muito afiadas, sendo perigosa a sua utilização. Esse facto foi esclarecido às mães sempre que solicitado. Não houve objecções à medição por cópia.

#### Método de registo das mãos

1. Mães: colocando ambas as palmas das mãos em simultâneo com ligeira pressão sobre o prato de uma fotocopiadora e com os dedos direitos, para que o sulco mais inferior e a ponta de ambos os dedos a avaliar (2º e 4º) ficassem bem visíveis.
2. RN: era solicitada colaboração da enfermagem para sustentar o RN em decúbito ventral e assim posicionar de forma confortável e adequadamente uma e outra mão, em tempos separados, em cima do prato.
3. Após posicionadas, era colocado tecido opaco por cima das mãos no prato da fotocopiadora, para que a luz branca ficasse contida e não afectasse os observadores.

#### Técnica da fotocópia

1. Face ventral da mão direita e
2. Face ventral da mão esquerda
3. Unir os quatro dedos (2º-5º), assentar a face ventral no ecrã, fazer ligeira pressão sobre o vidro
4. A fotocópia tem de ter o desenho dos topos dos dedos e a sua base de implantação (Figura 3.1)
5. Para medir: marcar a parte média do sulco na base do dedo mais proximal à palma da mão até ao topo do dedo (não a unha) em milímetros

#### Método para medição do rácio digital 2D:4D

A medição do dedo indicador e do anelar foi feita por dois observadores independentes, de acordo com os seguintes critérios:

1. Usando uma craveira digital com duas casas decimais, mediu-se no papel a distância entre a parte média do sulco digitopalmar mais inferior e a parte média da ponta do dedo (Figura 3.1).
2. O resultado do rácio 2D:4D foi obtido dividindo a medida do indicador (2º dedo) pela do anelar (4º dedo) de cada mão.

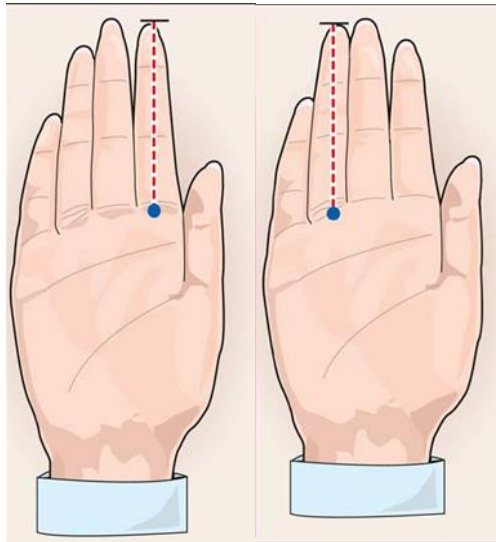


Figura 3.1 – Medição dos dedos indicador e anelar.

### 3.11 Análise estatística

As principais variáveis do estudo foram comparadas com a distribuição Normal para se identificarem desvios significativos à mesma. Inspeccionou-se visualmente os seus histogramas e estatísticas de assimetria (*skewness*) e achatamento (*kurtosis*). Foram também efectuados testes de rotina (Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) (Conover 1999) quando julgado necessário. Quando as variáveis mais desviadas da Normal estiveram envolvidas em testes com pressupostos de normalidade, trabalhou-se com a transformação logarítmica da variável, sempre que esta se revelou normalizadora. Quando isso não aconteceu ou quando julgado apropriado, optou-se por testes não-paramétricos, sem pressupostos de normalidade.

Neste estudo efectuaram-se dois tipos principais de análises estatísticas:

#### *Comparações entre médias*

A comparação entre médias foi em geral efectuada por análise de variância (ANOVA), sendo o teste t-student (t-teste), um caso particular da ANOVA, usado para comparar duas médias. O t-teste foi usado na versão para amostras independentes ou emparelhadas, conforme apropriado. Quando as comparações envolveram variáveis não normais, optou-se pelo teste Mann-Whitney em substituição do t-student. Para comparar proporções, usou-se o teste exacto de Fisher. Quando se pretendeu expurgar o possível efeito confundidor de uma variável contínua transversal a vários grupos cujas médias estavam sob comparação, utilizou-se análise de covariância (ANCOVA). A ANCOVA foi também usada para comparar rectas de regressão, nomeadamente para testar se os declives eram diferentes entre si (Zar 2007). Na Fase 2 deste

estudo, houve ainda necessidade de usar a adaptação da ANOVA ao estudo da 'repetibilidade' de observações (i.e., avaliar os erros de medição inter-observador, quando vários observadores medem a mesma coisa).

Quando é necessário comparar as médias de três ou mais grupos e os dados não se desviam significativamente da normalidade, a ANOVA é o procedimento de eleição que impede a inflação da probabilidade ( $\alpha$ ) de cometer o erro do Tipo I ( $\alpha$ , habitualmente =0,05, é a probabilidade de rejeição da hipótese nula quando esta é verdadeira). Identicamente, quando é necessário efectuar uma sequência de ANOVAs, a probabilidade  $\alpha$  amplia-se e rapidamente ultrapassa 0,05. Como medida de segurança, a sequência de ANOVAs deve ser antecedida de uma MANOVA (Multivariate Analysis of Variance). Uma MANOVA significativa, indica que pelo menos uma das ANOVAs será significativa e esta conclusão é obtida com garantia de que  $\alpha$  se mantém igual a 0,05. Este procedimento foi usado sempre que necessário.

#### *Estudo de associações entre variáveis*

A primeira abordagem ao estudo de associações entre duas variáveis foi feita pelo coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e por regressão linear simples; na regressão apresenta-se o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), o qual representa a proporção da variabilidade da variável dependente (eixo dos  $yy$ ) que é explicada pela ( $s$ ) variável (eis) independente ( $s$ ) (eixo dos  $xx$ ). Para associações entre mais de duas variáveis deu-se preferência a análise de regressão múltipla. A análise de regressão foi efectuada de forma hierárquica (*multi-level*) quando apropriado, em particular na construção de modelos explicativos com múltiplas variáveis independentes.

Usou-se rotineiramente o valor crítico  $p < 0.05$  como delimitador do que tem significado estatístico, assinalando-se como altamente significativo valores  $p < 0.001$ . Todos os métodos usados estão descritos em manuais estatísticos habituais (Sokal et Rohlf 1995, Conover 1999, Draper et Smith 1998, Zar 2007). A generalidade das análises foi efectuada em Microsoft®Excel® e em IBM®SPSS Inc® v. 19.

## **4. Resultados**

---

**Partes dos artigos Ventura et al 2013a, Ventura et al 2012, Ventura e Gomes 2010, foram usados neste capítulo**

## 4. Resultados

### Amostra – Fase 1

Entre Novembro de 2009 e Janeiro de 2011, foram contactadas e informadas do estudo 331 grávidas. Destas, 79 apresentaram critérios de exclusão, predominantemente por causas patológicas (alterações da tiroide, asma, doenças autoimunes, entre outras); 39 não puderam ser incluídas, maioritariamente devido a dificuldade de agendamento e 25 recusaram participar (Figura 4.1). Integraram o estudo 188 grávidas; quatro foram posteriormente excluídas por patologia ou por estudo incompleto. A dimensão definitiva da amostra com dados demográficos completos, dados hormonais no plasma e dados de ansiedade foi de 184 grávidas; em 167 destas foi possível fazer doseamentos hormonais no líquido amniótico (LA).

Das 184 participantes, 70 ouviram música, 57 leram revistas e outras tantas aguardaram na sala de espera. A música foi ouvida através de colunas em 36 casos e por auscultadores em 34. A sequência manhã/tarde não foi sempre respeitada no agendamento do serviço, pelo que houve mais casos de manhã do que de tarde (101 das 8 às 12h, 83 das 12 às 15h) (Figuras 4.2, 4.3).

Os dados dos partos foram obtidos a partir dos registos oficiais do HDE. Em 60 casos o parto ocorreu noutra maternidade. Os dados destas mulheres foram obtidos por contacto telefónico; em três casos foi impossível o contacto, não havendo informação. Em três outros, mantiveram-se os dados da mãe por apresentarem todos os parâmetros dentro da normalidade, mas os dados referentes ao feto/RN foram eliminados pelas seguintes razões: morte fetal in-útero às 35 semanas por pré-eclâmpsia arrastada, parto espontâneo às 24 semanas e 3 dias com morte neonatal precoce, e feto com mosaico 46xyT20, com 92% probabilidade de ser saudável, mas em que o casal optou por interromper a gravidez.

### Amostra – Fase 2

Das 184 grávidas participantes na Fase 1, 106 participaram também na Fase 2 do estudo (Figura 4.4). A maioria das ausências foi devida ao facto do parto ter ocorrido noutra maternidade. Não houve enviesamento conhecido na formação da amostra da Fase 2, no entanto, para verificar se esta era representativa da amostra usada na Fase 1, compararam-se as médias das variáveis mais relevantes (capazes de criar confundimento e influenciar os resultados da Fase 2), entre a amostra de 106 pares de mãe-filho e a amostra que lhe serviu de base (n=184) (Tabela 4.1), concluindo-se que a primeira não apresenta diferenças significativas relativamente à segunda. Disponha-se de doseamentos hormonais no LA para 100 destas 106 participantes na Fase 2.

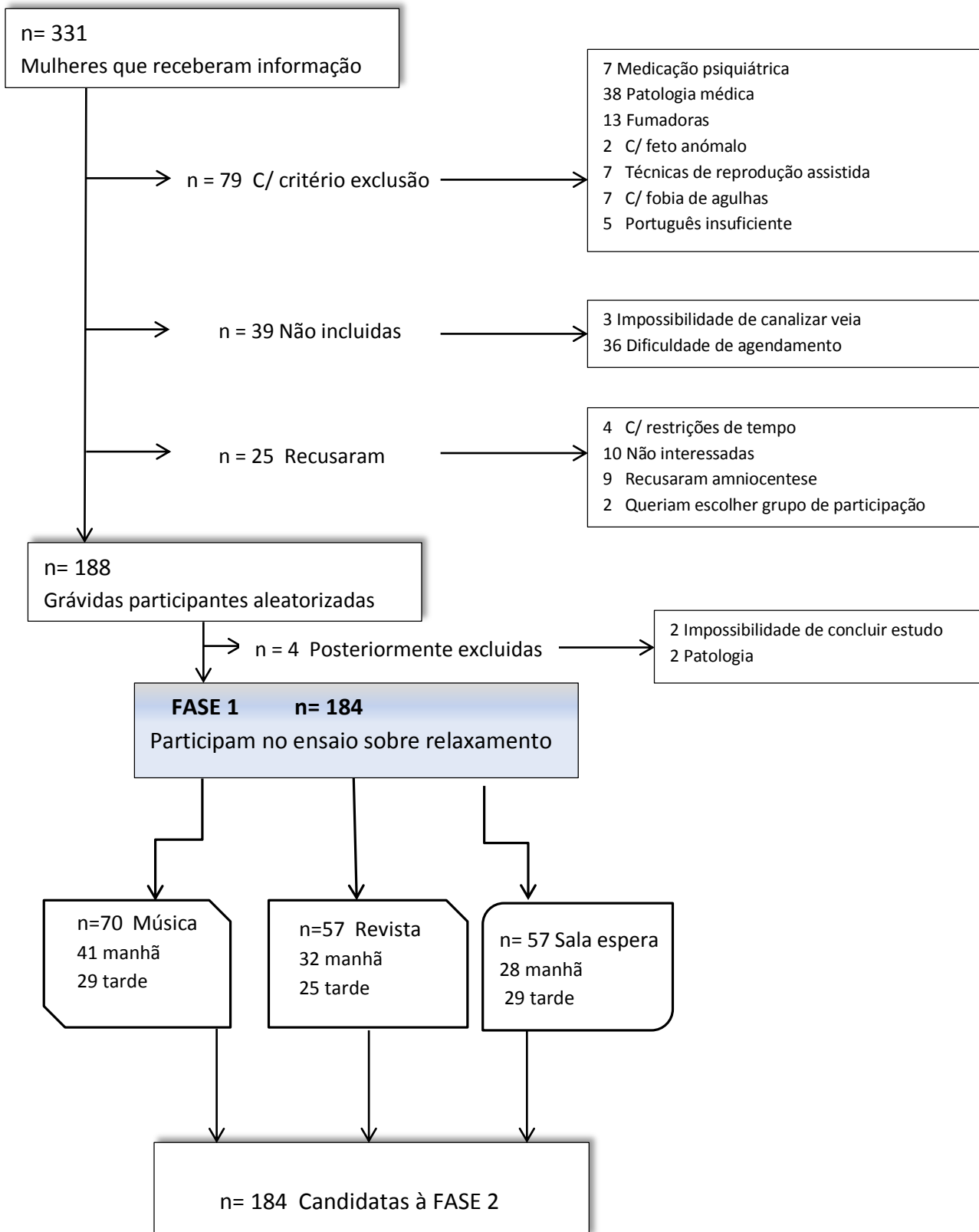


Figura 4.1 Fluxo de progresso na selecção da amostra para a Fase 1 do estudo

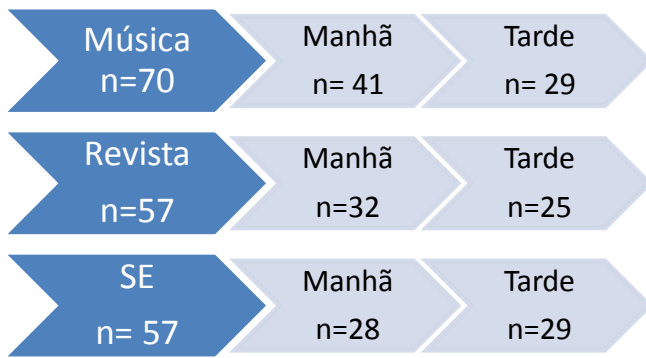


Figura 4.2 Distribuição por grupos.

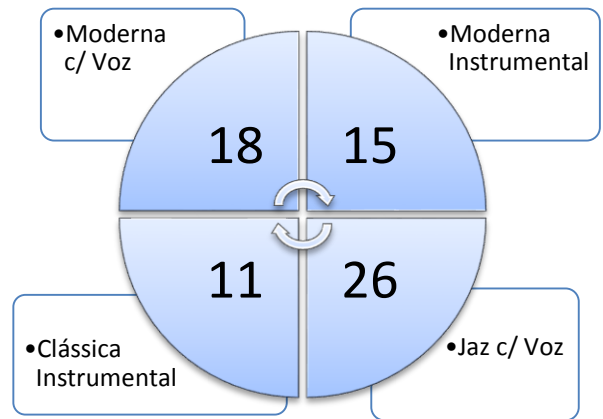


Figura 4.3 Distribuição das escolhas musicais

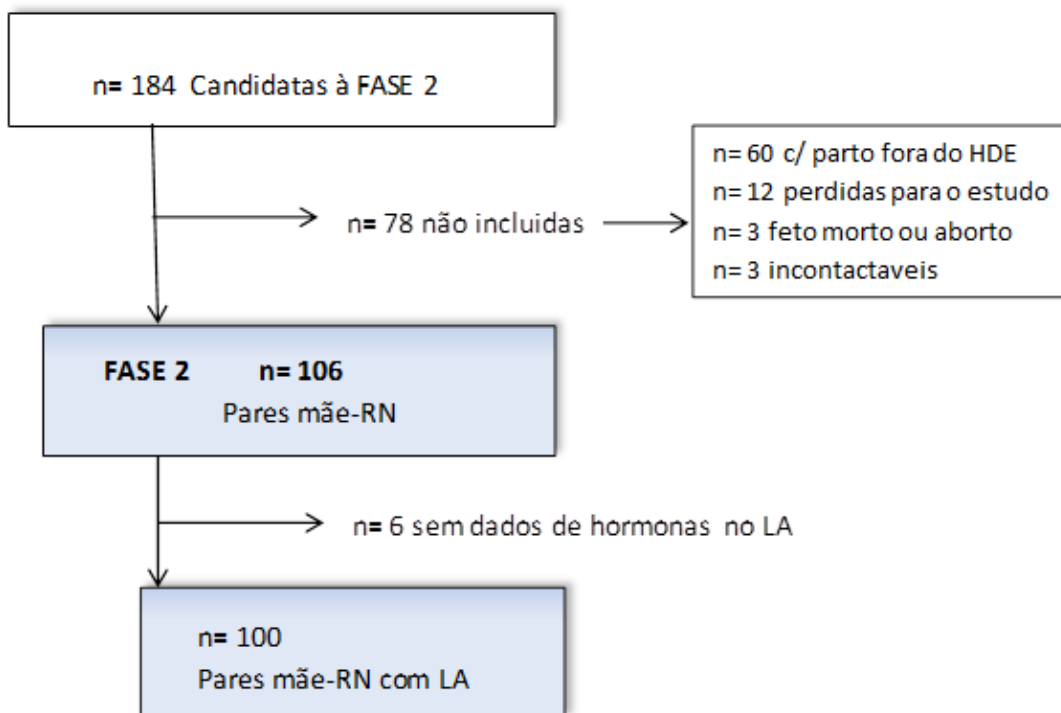


Figura 4.4 Fluxo do progresso de selecção da amostra na Fase 2 do estudo.



TABELA 4.1 **Comparação da amostra das Fases 1 e 2** quanto às médias (desvio-padrão) das variáveis indicadas. Apresenta-se o *p-value* da comparação feita entre as médias com os testes indicados. Não se detectaram diferenças significativas entre as duas amostras para nenhuma variável ( $p>0,05$ ).

Variável		Fase 1, n= 184	Fase 2, n= 106	<i>p</i>	Teste
<i>Idade das mães (anos)</i>		37,7 (2,9)	37,7 (2,8)	$p=0,999$	t-student
<i>Idade gestacional na amniocentese (semanas)</i>		17,3 (1,2)	17,2 (1,1)	$p=0,482$	t-student
<i>Semanas de gestação no parto</i>		39,3 (1,2)	39,4 (1,27)	$p=0,507$	t-student
<i>Peso no parto (g)</i>	<i>M</i>	3395 (482)	3399 (507)	$p=0,963$	t-student
	<i>F</i>	3136 (459)	3086 (495)	$p=0,541$	t-student
<i>Sexo</i>	<i>M</i>	51%	49%	$p=0,42$	Fisher
	<i>F</i>	49%	51%		
<i>STAI-estado</i>		43,4 (11,3)	43,1 (11,6)	$p=0,829$	t-student
<i>STAI-traço</i>		35,4 (8,9)	34,6 (10,2)	$p=0,486$	t-student
<i>Cortisol no plasma (nmol/L)</i>		578 (216)	604 (225)	$p=0,332$	t-student
<i>Cortisol no LA (nmol/L)</i>		18,3 (9,0)	17,8 (8,3)	$p=0,646$	t-student
<i>Testosterona no plasma (nmol/L)</i>		1,65 (0,87)	1,70 (0,80)	$p=0,499$	Mann-Whitney
<i>Testosterona no LA (nmol/L)</i>	<i>M</i>	0,83 (0,4)	0,86 (0,4)	$p=0,29$	Mann-Whitney
	<i>F</i>	0,34 (0,31)	0,34 (0,33)	$p=0,39$	Mann-Whitney

#### 4.1 Estatística descritiva - Fase 1

As Tabelas 4.2A e 4.2B apresentam estatísticas descritivas da amostra de 184 grávidas. A idade média das participantes foi de 37,7 anos (desvio-padrão  $dp=2,9$ ; min-máx: 26,8-43,9 anos) e a sua idade média de gestação foi 17,3 semanas ( $dp=1,2$ ). Em 90,3% dos casos as mulheres eram caucasianas e apenas 6,5% tinha escolaridade inferior ao 9º ano. O índice de massa corporal (IMC) das mulheres aumentou em média 1 ponto (24,2 para 25,2) desde o início da gravidez. À chegada, as grávidas tinham um pulso médio de 84,8 ppm ( $dp=10,4$ ), o qual baixou para 79,5 ( $dp=9$ ) após a intervenção de relaxamento de 30 min. A pressão arterial (PA) sistólica e diastólica também baixou entre a chegada e o fim da intervenção: a PA sistólica média passou de 108,7 para 103,0 e a diastólica de 60,0 para 57,8. O nível médio de ansiedade estado (STAI-S) e traço (STAI-T) aquando da chegada ao hospital, avaliado pelo questionário de Spielberger,

indicava, respectivamente, 43,4 (dp=11,3) e 35,4 (dp=8,9). Ambos os valores médios baixaram, respectivamente, para 37,3 e 34,0 depois da intervenção.

O valor médio de concentração de cortisol no plasma das grávidas à chegada foi 577,8 nmol/L (dp=216), não havendo diferença significativa entre os sexos dos fetos (feminino e masculino, respectivamente, 578,8 e 579,8 nmol/L; t-teste=0,03, p=0,98). Depois da intervenção, o valor médio de concentração de cortisol desceu para 541,3 nmol/L (dp=219,9). O valor médio do cortisol também variou com a hora do dia e com o STAI-S. De manhã, nas grávidas com STAI-S>40 foi 639,5 (dp=215,8, n=54), nas grávidas com STAI-S ≤40 foi 605,5 (dp=223, n=47). À tarde, em STAI-S >40 foi 545,1 (dp=226,6, n=42) e em STAI-S ≤40 foi 498,3 (dp=167, n=41). A concentração de cortisol não se correlacionou com a idade da mãe (r=0,05; p=0,55). Contudo, encontrou-se correlação positiva dos valores do cortisol com a idade gestacional quer de manhã (r=0,17 p=0,009), quer de tarde (r=0,20, p=0,07).

O valor médio de testosterona no plasma à chegada foi 1,65 nmol /L (dp=0,87), também sem diferença significativa entre os sexos dos fetos (feminino e masculino, respectivamente, 1,71 e 1,61 nmol/L; t-teste com dados logaritmizados = 0,026, p=0,98). Após a intervenção, o valor médio de testosterona no plasma desceu para 1,61 nmol/L (dp=0,87). A testosterona no plasma da mãe quando os fetos eram do sexo feminino, mostrou correlação positiva com a idade gestacional mas apenas até às 18 semanas (r=0,25, p=0,037) e correlação negativa com a idade materna (r= - 0,312, p<0,001).

A maioria das colheitas de LA para doseamento hormonal realizou-se de manhã (101 amostras até às 12h, 81 no período 12-15h, tendo-se utilizado no estudo, respectivamente, 93 e 74 amostras). A concentração média de cortisol no LA foi de 18,3 nmol/L (dp=9), mais de 30 vezes inferior à que foi encontrada no plasma da mãe. Quanto à testosterona no LA, apresentou um valor médio de 0,58 nmol/L (dp=0,43), quase três vezes inferior à concentração no plasma materno. Observou-se uma diferença significativa entre os sexos quanto à concentração média de testosterona no LA (femininos e masculinos, respectivamente, 0,32 e 0,82 nmol/L (t-teste= 9,7; p<0,001)). Cerca de 51% dos fetos eram do sexo masculino (94 M: 90 F) (Tabela 4.2B). Os partos foram eutócicos em 47,8% dos casos, por cesariana em 35,2% e distócicos em 14,3%.

A distribuição das principais variáveis analisadas foi comparada com a distribuição Normal. A maioria não apresentou desvios visualmente significativos (Figura 4.5). Algumas, contudo, são assimétricas e não passam testes estatísticos de normalidade. Uma transformação logarítmica tem um forte efeito 'normalizador' na maioria - é o caso do STAI-T, da concentração de testosterona no plasma, e da concentração de cortisol no LA. Saliente-se contudo que, ao longo do estudo, foi possível constatar que as principais conclusões a que se chegou permanecem qualitativamente as mesmas, quer quando as variáveis são transformadas quer quando não são, evidenciando robustez.

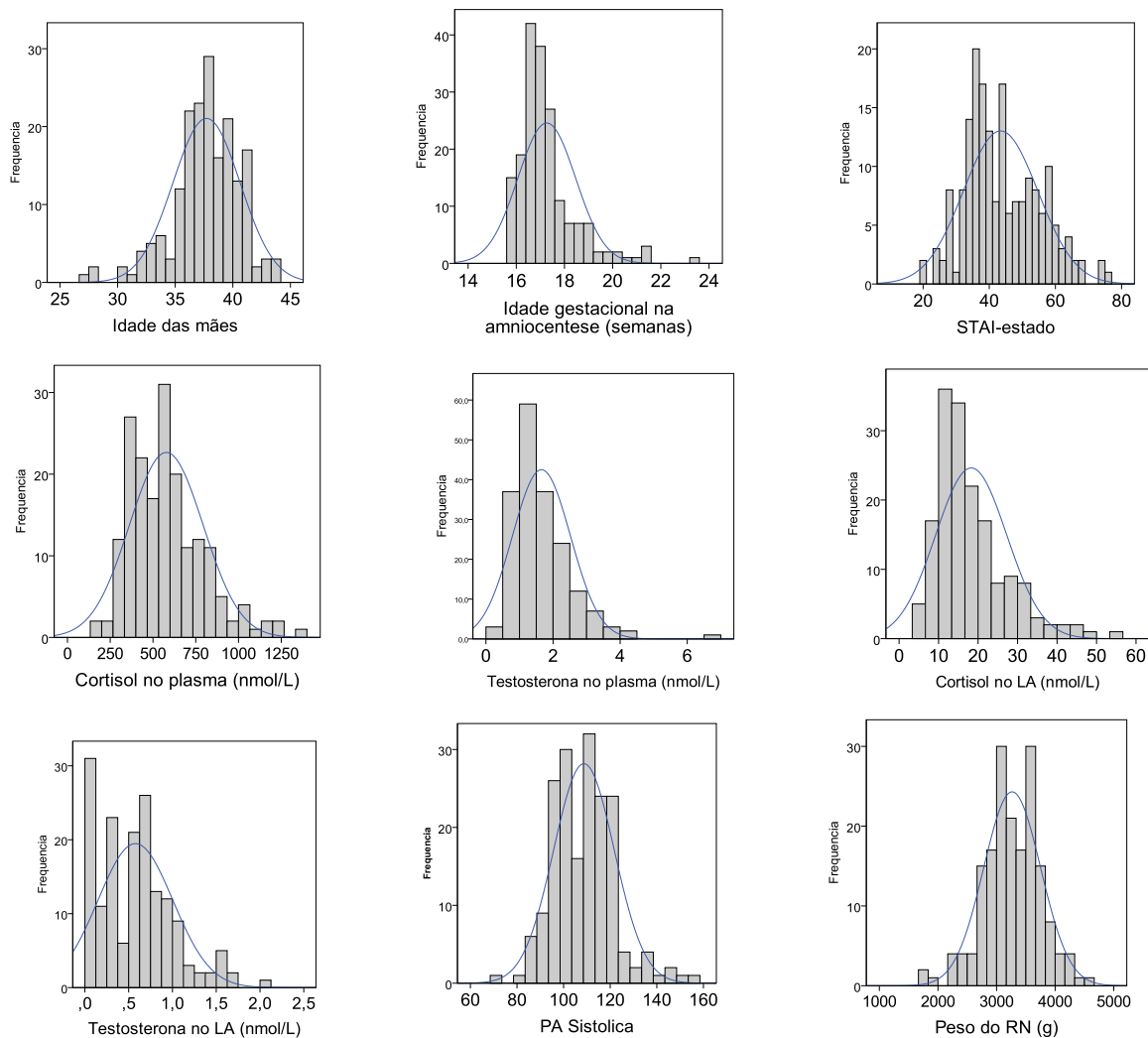
Tabela 4.2A Estatística descritiva das principais variáveis.

	<b>Média</b>	<b>Desv-Pad</b>	<b>Min-Máx</b>	<b>Mediana</b>	<b>Quartis (25-75%)</b>
Idade materna (anos)	37,7	2,9	26,8-43,9	38	36,35-39,6
Idade gestacional na amniocentese (semanas)	17,3	1,2	15,7-23,6	17	16,6-17,6
IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) pré gestação	24,2	4,0	17,6-43,7	23,1	21,7-26,2
IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) na amniocentese	25,2	4,0	18,37-41,4	24,4	22,4-27,2
Pulso inicial	84,8	10,4	61-114	84,0	77-91
Pulso final	79,5	9,0	50-102	79,0	74-86
<b>Pressão Arterial</b>					
Sistólica à chegada	108,7	13,0	71-157	109,0	99,3-117,0
Sistólica final	103,0	12,7	79-144	102,0	95-110
Diastólica à chegada	60,0	8,5	33-78	59,5	54,0-66,0
Diastólica final	57,8	8,3	43-84	57,0	52-63,8
<b>Escala de ansiedade Spielberger (STAI)</b>					
Estado antes	43,4	11,3	20-76	41	35-52
Estado depois	37,3	11,5	20-77	35	30-45
Traço antes	35,4	8,9	21-75	34	30-40
Traço depois	34,0	9,1	20-72	33	27-39
<b>Plasma materno</b>					
Cortisol inicial (nmol/L)	577,8	216,0	179,4-1333,5	540,8	408,7-694,1
Cortisol final (nmol/L)	541,3	219,9	198,5-1350,2	500,2	372,0-679,5
Testosterona inicial (nmol/L)	1,65	0,87	0,29-6,90	1,46	1,05-2,05
Testosterona final (nmol/L)	1,61	0,87	0,27-6,05	1,47	0,99-2,00
Minutos entre 1ª e 2ª colheita de sangue	33	3	25-48	32	30-35
Minutos entre 2ª colheita e amniocentese	28	18	5-125	24	17-34
<b>Líquido amniótico</b>					
Cortisol (nmol/L)	18,3	9,01	5,2-56,6	16,1	12,3-23,0
Testosterona masculinos (nmol/L)	0,82	0,39	0,00-2,06	0,75	0,63-1,0
Testosterona femininos (nmol/L)	0,32	0,3	0,00-1,43	0,27	0,08-0,52
Frequência cardíaca fetal antes	148	8,1	113-167	148	143-154
Frequência cardíaca fetal depois	148	7	123-164	149	143-152
Idade gestacional no parto (semanas)	39,3	1,2	34,9-41,7	39,4	38,5-40,3
<b>Peso à nascença (g)</b>					
masculino	3395	482	2180-4610	3440	3083-3710
feminino	3136	459	1725-4270	3135	2868-3438
Horas entre nascer e medição 2D4D	39,2	60,4	2,4-541,3	27,3	14,3-45,3
<b>Rácio 2D:4D</b>					
masculino - mão direita	0,94	0,04	0,86-1,06	0,94	0,92-0,97
mão esquerda	0,92	0,04	0,84-0,99	0,93	0,90-0,95
feminino - mão direita	0,95	0,04	0,85-1,04	0,95	0,93-0,99
mão esquerda	0,95	0,04	0,85-1,04	0,95	0,93-0,98

Tabela 4.2B Estatística descritiva das principais variáveis

	%	n
Hora da colheita de LA		
8:30-10:00h	39,6	73
10:00-12:00h	16,4	30
12:00-15:00h	44	81
Etnia das mães		
Caucasiana	90,3	167
Indiana	0,5	1
Africana	8,6	16
Paridade		
Nulíparas	38,9	72
1 filho	41,6	77
2 ou mais filhos	18,9	35
Escolaridade		
< 9º ano	6,5	12
9-12º ano	28,1	52
>12º ano	42,7	79
desconhecido	22,2	41
Tipo de parto		
eutócico	48,4	88
vaginal distócico	14,8	27
cesariana	36,3	66
desconhecido	1,6	3
Sexo		
masculino	51,1	94
feminino	48,9	90

Figura 4.5 Histogramas de uma selecção de variáveis, sobrepostos pela curva normal empírica. Topo-fundo e esquerda-direita: Idade das mães, Idade gestacional na amniocentese, STAI-S, cortisol no plasma, testosterona no plasma, cortisol no LA, testosterona no LA, PA sistólica e peso à nascença.



## 4.2 Ansiedade, níveis hormonais e outras variáveis antes da intervenção

### 4.2.1 STAI-S (ESTADO) e T (TRAÇO)

O valor médio do estado de ansiedade (STAI-S) à chegada ao HDE foi 43,4 ( $dp=11,3$ ; min-máx: 20-76), superior a 40, valor habitualmente considerado de referência para separar pessoas não ansiosas de ansiosas. A média do traço de ansiedade (STAI-T) foi 35,5, inferior ao mencionado valor de referência (Tabela 4.2A). Não foram encontradas diferenças significativas entre as mulheres que participaram na Fase 1 do estudo de manhã (8:30-12:00h) e de tarde (12:00-15:00h), no que respeita ao nível de ansiedade (estado e traço), nem aos níveis de testosterona. Contudo, detectou-se uma diferença significativa no

cortisol do plasma: o nível médio da manhã é significativamente mais alto que o da tarde (624 versus 522 nmol/L,  $p=0.001$ ) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Comparação entre os valores médios (desv-pad) das medidas de ansiedade (STAI) e dos níveis hormonais das participantes da manhã e da tarde. Apresenta-se o t-teste (graus liberdade) e assinala-se com \*\* quando significativo. Para as variáveis STAI-T, cortisol no LA e testosterona no plasma, o teste foi efectuado com transformação logarítmica.

	STAI-S	STAI-T	Cortisol plasma	Cortisol LA	Testosterona plasma	Testosterona LA
<b>Manhã</b>	43,5 (10,9)	35,1 (8,8)	624 (219)	18,8 (9,9)	1,6 (0,9)	0,59 (0,45)
<b>Tarde</b>	43,3 (11,8)	35,8 (8,9)	522 (200)	17,5 (7,7)	1,7 (0,8)	0,56 (0,40)
<b>t-teste</b>	0,15 (182)	0,53 (180)	3,26 (182)	0,60 (165)	0,05 (183)	0,41 (165)
<b>p</b>	0,88	0,6	0,001**	0,55	0,96	0,68

As duas medidas de ansiedade das grávidas, STAI-S e STAI-T estão correlacionadas entre si ( $r=0,36$ ,  $p<0,001$ ) e o STAI-S está negativamente correlacionado com a idade das mães ( $r=-0,19$ ,  $p=0,009$ ), com as mais jovens a mostrarem maior ansiedade (Figura 4.6).

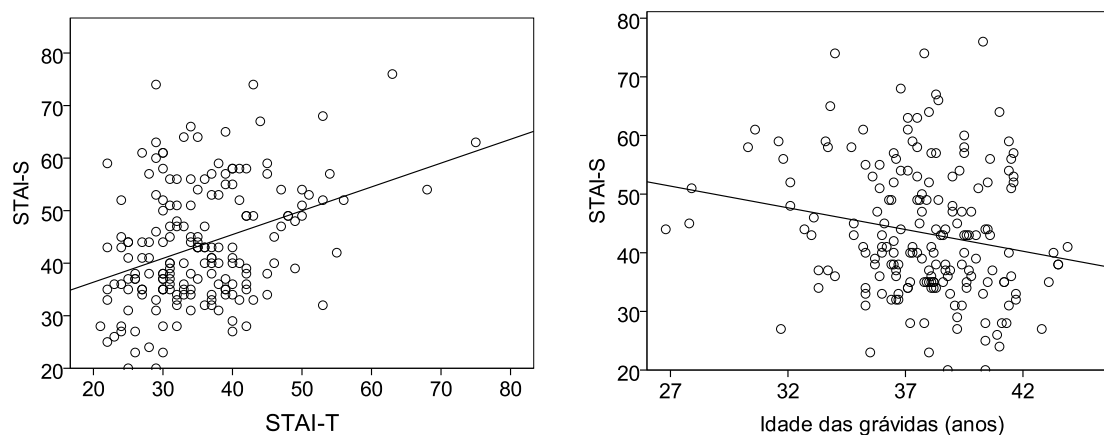


Figura 4.6 Esquerda: regressão linear entre as duas medidas de ansiedade avaliadas à chegada das grávidas ( $r^2=0,13$ ;  $b=0,45$ ;  $p<0,001$ ). Direita: regressão da idade das grávidas sobre o STAI-S ( $r^2= 0,04$ ;  $b= - 0,74$ ;  $p=0,009$ ).

A idade gestacional também mostrou correlação com a ansiedade-estado, de forma fraca mas significativa, uma vez que as grávidas de menor idade gestacional tendem a ter um STAI-S mais elevado ( $r= - 0,16$ ,

$p=0,03$ ). Em resumo, as grávidas mais jovens e com menor idade gestacional apresentaram o mais elevado estado de ansiedade (Figura 4.7).

Idade gestacional (semanas)	17,3	46,1 (9,1)	39,1 (9,9)	37,3 (8,8)
	16,7	41,1 (9,3)	47,2 (12,2)	43,8 (13,1)
		36,7	38,9	
		Idades (anos)		

Figura 4.7 STAI-S médio (desv-pad) em 9 combinações de 3 grupos de idade das grávidas e 3 grupos de idade gestacional. Os grupos foram definidos pelos percentis 33 e 66%, os quais estão indicados nos eixos. O sombreado é mais intenso quando a ansiedade média do grupo é maior. A diferença entre o nível mais alto (47,2) e o mais baixo (37,3) é significativa (t-teste,  $p=0,006$ ).

O estado de ansiedade (STAI-S) das grávidas não está correlacionado de forma directa e simples com os níveis hormonais no plasma. O coeficiente de correlação do STAI-S com o cortisol é  $r=0,103$  ( $p=0,17$ ) e com a testosterona é  $r=0,098$  ( $p=0,19$ ). O assunto será retomado mais adiante na secção relativa às hormonas.

Examinou-se de forma mais exaustiva os determinantes do estado de ansiedade (STAI-S) das grávidas à chegada ao HDE, construindo um modelo de regressão múltipla hierárquico onde o STAI-S é a variável dependente. O traço de ansiedade da grávida (STAI-T) e a sua idade foram os principais determinantes directos do estado de ansiedade (STAI-S) e os níveis de cortisol no plasma, mas não de testosterona, apresentaram também associação significativa com o STAI-S. O traço (STAI-T), idade materna e idade gestacional, explicam 17,9% da variabilidade observada no STAI-S, o que é altamente significativo ( $p<0,001$ ) (Tabela 4.4). Quando se adiciona o cortisol ao bloco anterior de variáveis, a percentagem sobe para 21,2%, um aumento de 3,3% que é significativo ( $p=0,02$ ). Finalmente, quando se adicionam outras variáveis explicativas ao modelo (testosterona plasmática, IMC, paridade, PA sistólica, PA diastólica, hora do dia (manhã/tarde)) a percentagem total de variabilidade do STAI-T explicada pelo modelo atinge os 23,3% (Tabela 4.4). Globalmente, esta percentagem é altamente significativa ( $p<0,001$ ), mas os acréscimos parciais ao bloco de variáveis anteriores (STAI-T, idade materna, idade gestacional, cortisol) não se revelaram significativos.

Tabela 4.4 Resultados da regressão múltipla hierárquica do estado de ansiedade (STAI-S) *versus* blocos de co-variáveis adicionadas ao modelo em 3 passos. Apresentam-se os coeficientes de regressão final de cada variável e os respectivos *p-values* indicam se é significativa (\*) ou altamente significativa (\*\*) para explicar o STAI-S. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) indica a percentagem de variabilidade de STAI-S que é explicada em cada novo passo de construção do modelo;  $\Delta R^2$  indica o acréscimo dessa percentagem com o novo bloco de variáveis adicionadas.

		Coef Regressão	Erro padrão	<i>p</i>	$R^2$	$\Delta R^2$
Passo 1	Constante	45,58	23,8	0,06	0,179	0,179 **
	STAI-T (traço)	0,44	0,1	<0,001**		
	Idade da grávida	-0,84	0,31	0,01*		
	Idade gestacional	-1,24	0,75	0,10		
Passo 2	Cortisol no plasma	0,01	0,01	0,02*	0,212	0,033 *
Passo 3	<i>Ln</i> Testosterona plasma	-0,02	1,84	0,99	0,233	0,022
	<i>Ln</i> IMC	8,41	5,69	0,14		
	Paridade	-1,03	1,20	0,38		
	PA sistólica	0,05	0,08	0,49		
	PA diastólica	-0,03	0,12	0,78		
	manhã/tarde	0,09	1,76	0,96		

#### 4.2.2 PULSO e PRESSÃO ARTERIAL

O pulso está significativamente correlacionado com o STAI-S ( $r=0,20$ ;  $p=0,01$ ), com a PA sistólica ( $r=0,24$ ;  $p=0,001$ ) e com a PA diastólica ( $r=0,52$ ;  $p<0,001$ ). Pulso e PA sistólica são variáveis fisiológicas eventualmente dependentes do estado de ansiedade. Quando incorporadas num modelo de regressão múltipla, o STAI-S e a PA sistólica explicam 9% da variabilidade no pulso, uma percentagem altamente significativa ( $p<0,001$ ). A adição de outras variáveis explicativas, como a PA diastólica, a idade da grávida, a idade gestacional e o IMC, não contribuem significativamente para explicar a variação do pulso.

A PA sistólica e diastólica das mulheres à chegada estão fortemente correlacionadas ( $r= 0,523$ ;  $p<0,001$ ;  $n=184$ ). Além disso, a PA sistólica tem correlação significativa com o IMC ( $r=0,20$ ;  $p=0,008$ ,  $n=184$ ) e com a idade da mãe ( $r=0,16$ ;  $p=0,03$ ;  $n=184$ ): mulheres com maior massa corporal relativa e de idade mais avançada tendem a ter PA sistólica mais elevada (Figura 4.8). A correlação da PA sistólica com o estado de ansiedade ( $r=0,1$ ,  $p=0,19$ ,  $n= 184$ ) e com o cortisol no plasma ( $r=0,08$ ,  $p=0,28$ ,  $n=184$ ) é positiva, mas não significativa. Em conjunto, estas quatro variáveis explicam uns significativos 8,1% ( $p=0,004$ ) da variabilidade da PA sistólica. A PA diastólica apresenta correlações positivas, mas não significativas com estas variáveis.



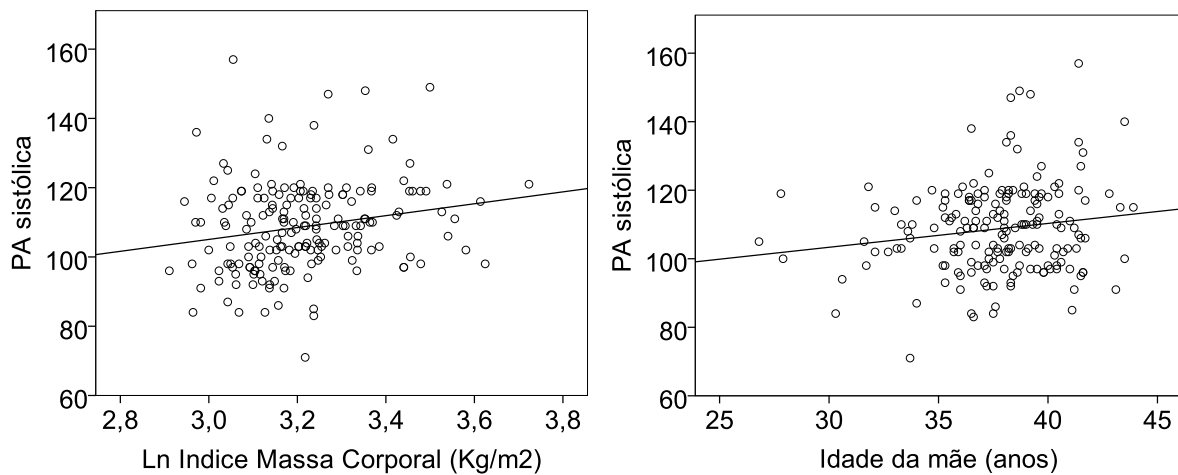


Figura 4.8. Associação entre a PA sistólica, o IMC (esquerda,  $r^2=0,04$ ;  $b=17,2$ ;  $p=0,008$ ) e a idade da mãe (direita,  $r^2=0,03$ ;  $b=0,70$ ;  $p=0,03$ ).

#### 4.2.3 CORTISOL NO PLASMA

O cortisol no plasma da mãe, medido antes do relaxamento, variou entre 179 e 1334 nmol/L, com valor médio 578 ( $dp=216$ ). O nível de cortisol tende a aumentar com a idade gestacional da grávida ( $r=0,19$ ;  $p=0,01$ ) e apresenta uma correlação global, fraca mas significativa, com o nível de testosterona no plasma ( $r=0,18$ ;  $p=0,02$ ) (Figura 4.9). Esta correlação é mais forte quando os fetos são só femininos ( $r=0,33$ ,  $p=0,002$ ) e não-significativa quando os fetos são masculinos ( $r=0,02$ ,  $p=0,89$ ). No entanto, veremos mais adiante que a *variação* destas hormonas após a intervenção está fortemente correlacionada ( $r=0,53$ ;  $p<0,001$ ) e esta correlação é independente do sexo do feto. O cortisol está também negativamente correlacionado com o índice de massa corporal (IMC) da grávida ( $r= - 0,17$ ;  $p=0,02$ ). Contudo, o nível de cortisol varia ao longo do dia de forma não linear – diminuindo ao longo da manhã e subindo depois das 12h (Figura 4.10) – um facto que poderia gerar confundimento nas correlações mencionadas.

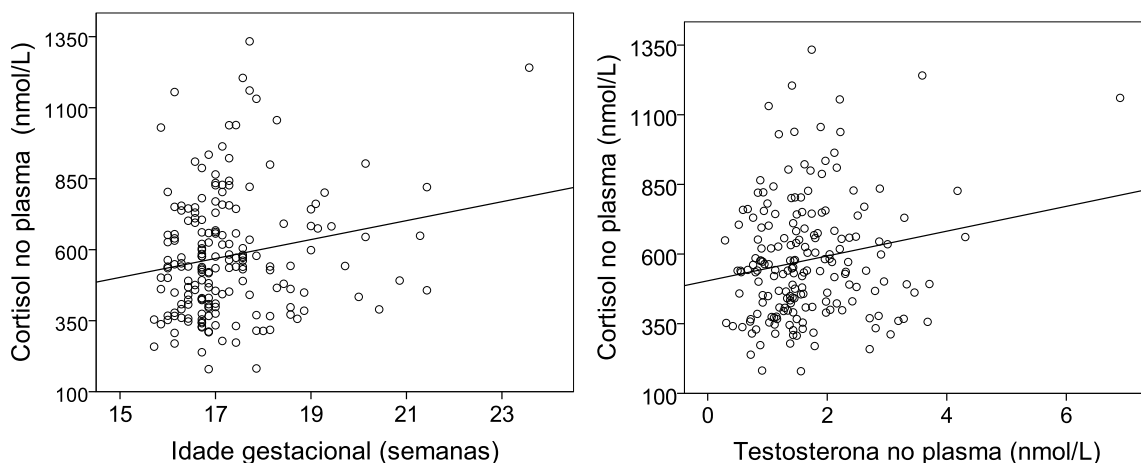


Figura 4.9 Regressões do nível de cortisol no plasma (ordenadas) *versus* idade gestacional da grávida (esquerda) e testosterona no plasma (direita). A inclinação de ambas as rectas é significativa (Idade:  $r^2=0,035$ ;  $b=33,3$ ;  $p=0,01$ ; Testosterona:  $r^2=0,032$ ;  $b=44,5$ ;  $p=0,02$ ).

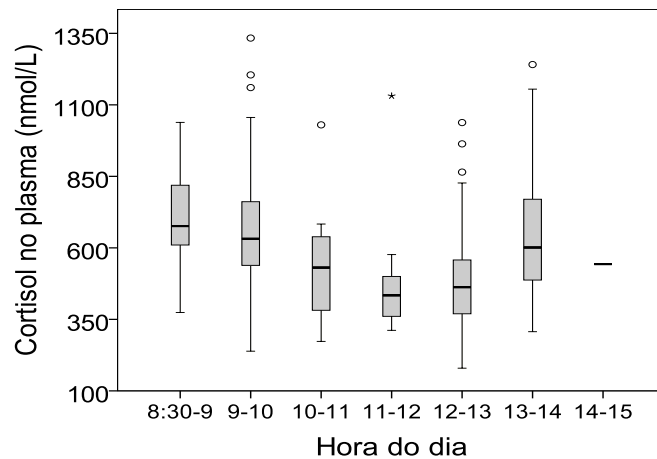


Figura 4.10 *Box-plot* com a evolução dos níveis de cortisol no plasma ao longo de 7 intervalos de tempo entre as 8:30 e as 15h. O traço horizontal dentro de cada rectângulo é a mediana e os topos dos rectângulos são quartis que delimitam a posição de 50% das observações centrais.

O eventual efeito de confundimento que este padrão circadiano poderia causar quando se avalia a associação entre o cortisol e as outras variáveis, foi eliminado, adicionando a hora a que o sangue foi colhido como variável independente num modelo de regressão múltipla em que o nível de cortisol é a variável dependente. Quando isto é feito, constata-se que, em conjunto, a idade gestacional, a testosterona no plasma, o IMC, e a hora do dia, explicam 16% da variabilidade observada no cortisol, um valor que é altamente significativo ( $p<0,001$ ). Saliente-se que as associações individuais do cortisol com a idade gestacional, a testosterona e o IMC permanecem significativas, mesmo quando se remove o efeito da hora do dia a que foi feita a colheita. Outras variáveis, como o sexo do feto, a idade da mãe e a paridade, não se apresentaram associadas ao nível de cortisol no plasma.

Examinou-se em seguida a associação entre, por um lado, os níveis de cortisol no plasma e, por outro, o estado de ansiedade. Uma vez que o cortisol tem características circadianas, dividiram-se as mulheres em dois grupos: o grupo da manhã (8:30-12:00h) e o da tarde (12:00-15:00h). No grupo da manhã, o cortisol não está associado ao STAI-S ( $r=0,04$ ,  $p=0,71$ ), mas no grupo da tarde as duas variáveis estão positivamente correlacionadas ( $r=0,22$ ,  $p=0,05$ ) (Figura 4.11). A correlação do STAI-S com o cortisol no plasma de tarde é significativa abaixo das 17 sem de gestação ( $r=0,30$ ;  $p=0,01$ ;  $n=69$ ), mas perde-se acima das 18 sem ( $r=0,20$ ;  $p=0,29$ ;  $n=28$ ).

A análise de regressão múltipla do grupo da tarde, efectuada com o nível de cortisol como variável dependente, indica que o principal predictor do cortisol é a hora do dia ( $p=0.009$ ) (recorde-se que depois das 12:00h o cortisol tende a aumentar (Figura 4.10)), seguido do estado de ansiedade STAI-S ( $p=0,03$ ), também com significado estatístico. Em conjunto, estas duas variáveis explicam 13% da variabilidade do cortisol de tarde ( $p=0,004$ ).

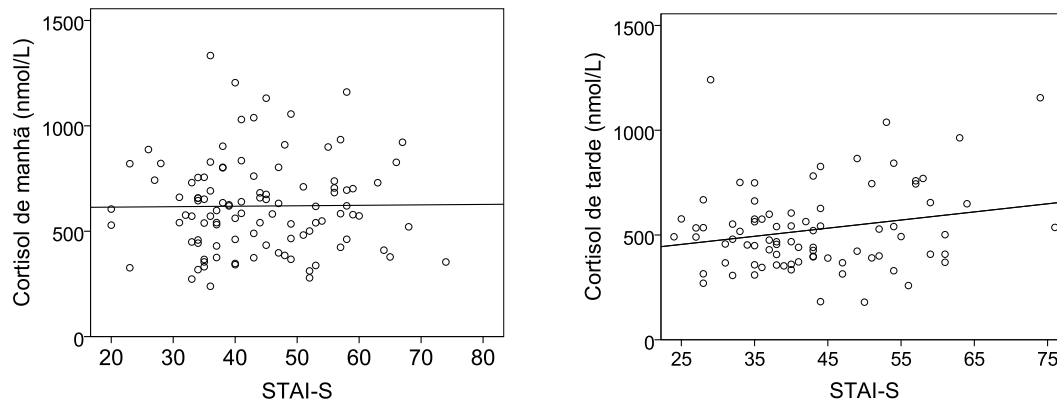


Figura 4.11 Regressão linear do cortisol contra o estado de ansiedade STAI-S. Esquerda: de manhã ( $r^2=0,001$ ;  $b=0,76$ ;  $p=0,71$ ); direita: de tarde ( $r^2=0,05$ ;  $b=3,88$ ;  $p=0,05$ ).

#### 4.2.4 TESTOSTERONA NO PLASMA

A testosterona no plasma das grávidas está negativamente correlacionada com a respectiva idade ( $r=-0,312$ ,  $p<0,001$ ): as grávidas mais velhas tendem a ter menor concentração de testosterona (Figura 4.12). Não se registou diferença significativa entre as médias da testosterona plasmática nas grávidas com feto do sexo masculino e feminino ( $t$ -teste=0,03;  $p=0,98$ ). Também não se detectou um padrão bem vincado ao longo das horas do dia (Figura 4.12), embora haja uma tendência ligeiramente descendente de manhã e uma subida após as 12h.

Quando é abrangida toda a gama de idades gestacionais deste estudo (até 23,6 semanas), a testosterona no plasma das grávidas não está correlacionada com a idade gestacional dos fetos do sexo feminino ( $r=-0,02$ ;  $p=0,88$ ,  $n=89$ ). Contudo, existe correlação positiva quando se consideram apenas idades gestacionais inferiores a 18 semanas ( $r=0,25$ ;  $p=0,037$ ,  $n=73$ ), coincidindo com a altura em que ocorre o primeiro pico de testosterona (Figura 4.13). No que respeita a fetos masculinos, a correlação entre testosterona plasmática e idade gestacional é fraca ( $r=0,2$ ;  $p=0,06$ ;  $n=93$ ) em toda a gama de idades e não-significativa para idades gestacionais abaixo de 18 semanas ( $r=-0,14$ ;  $p=0,231$ ,  $n=78$ ).

A testosterona no plasma, não está correlacionada com o STAI-S nem com o STAI-T, quer quando se analisam os dados globalmente quer quando se analisam por hora do dia (Testosterona-STAI-S manhã:  $r=0,15$   $p=0,13$ ; tarde:  $r=0,09$   $p=0,44$ . Testosterona-STAI-T manhã:  $r=0,06$   $p=0,54$ ; tarde:  $r=-0,06$   $p=0,56$ ).

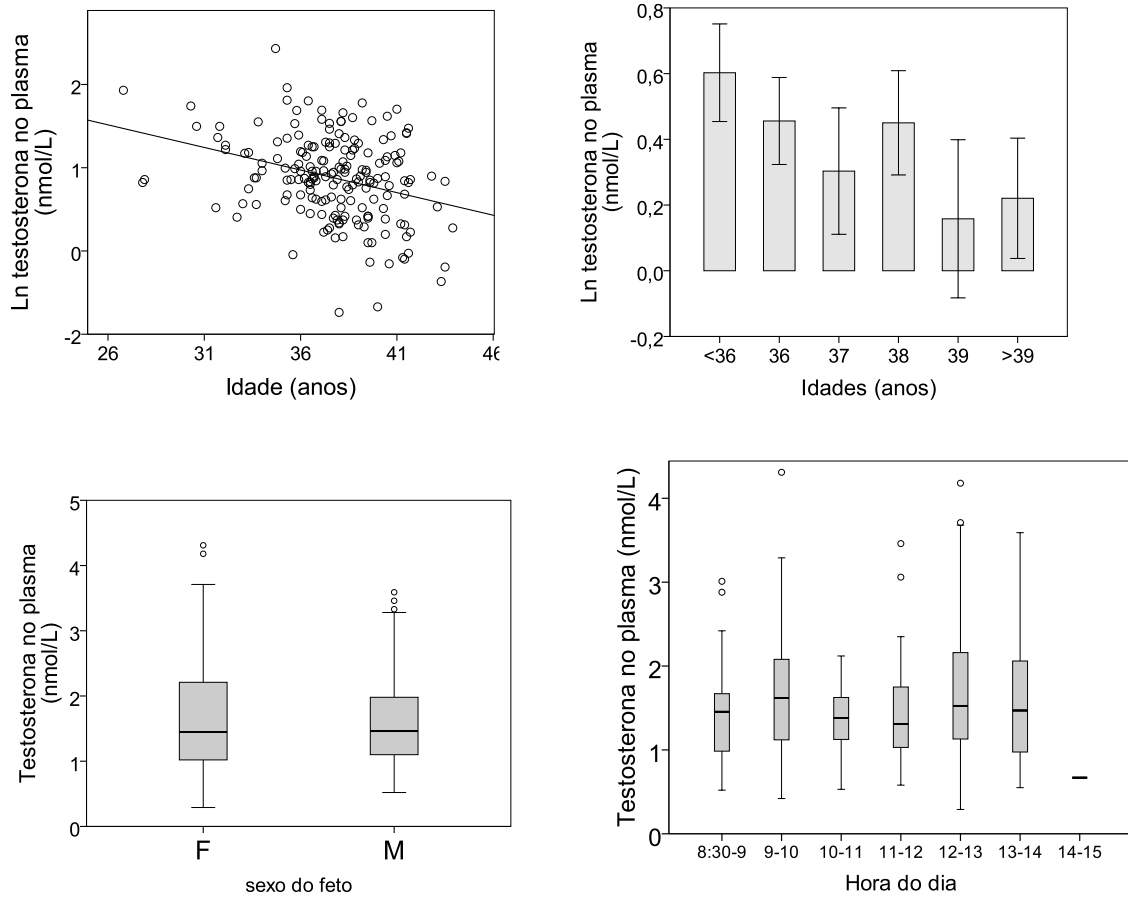


Figura 4.12 Associação entre a concentração da testosterona plasmática e outras variáveis. Topo-esquerda: associação com as idades desagrupadas da grávida ( $r^2=0,1$ ,  $b=-0,05$ ,  $p<0,001$ ); direita: por grupos de idade (linhas verticais delimitam ICs de 95% numa escala logaritmica). Fundo-esquerda: mediana e quartis da testosterona em função do sexo do feto; fundo-direita: evolução da testosterona ao longo do dia.

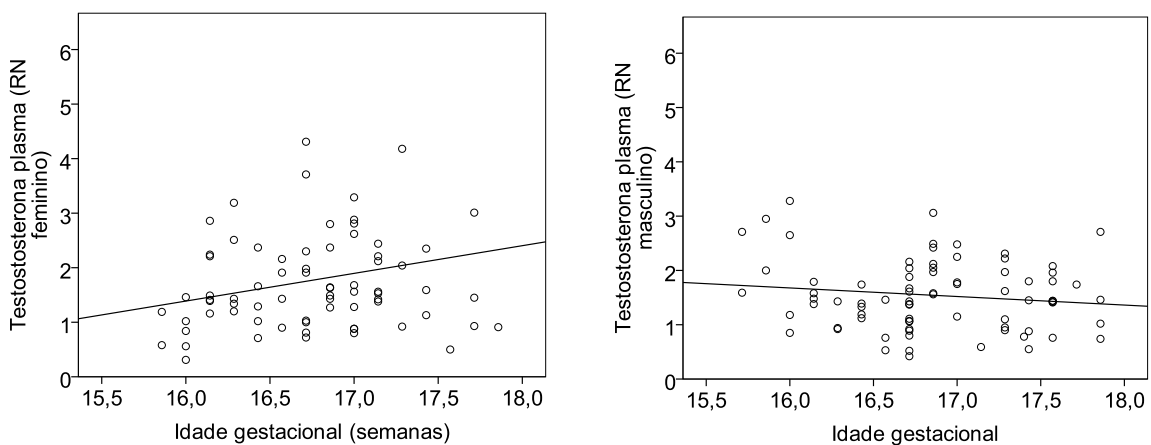


Figura 4.13 Associação entre a concentração de testosterona plasmática e a idade gestacional (<18 semanas). Esquerda: quando o RN é feminino ( $r^2=0,06$ ;  $b=0,51$ ;  $p=0,037$ ); direita: quando o RN é masculino ( $r^2=0,02$ ;  $b=-0,158$ ;  $p=0,231$ ).

#### 4.2.5 CORTISOL NO LÍQUIDO AMNIÓTICO (LA)

As concentrações de cortisol no líquido amniótico (LA) e no plasma materno estão significativamente correlacionadas, embora a do LA seja cerca de 30 vezes inferior à do plasma (Tabela 4.2A). Os valores médios de manhã e de tarde no LA foram respectivamente 18,95 e 17,06, não havendo diferenças significativas entre fetos masculinos e femininos. A correlação entre plasma e LA tende a aumentar à medida que a idade gestacional aumenta: é menor em grávidas com menos de 17 semanas ( $r=0,27$ ;  $p=0,008$ ), aumenta nas de 17 semanas ( $r=0,41$ ,  $p=0,007$ ) e é mais forte em grávidas com idade gestacional igual ou superior a 17 semanas ( $r=0,46$ ,  $p=0,012$ ) (Figura 4.14).

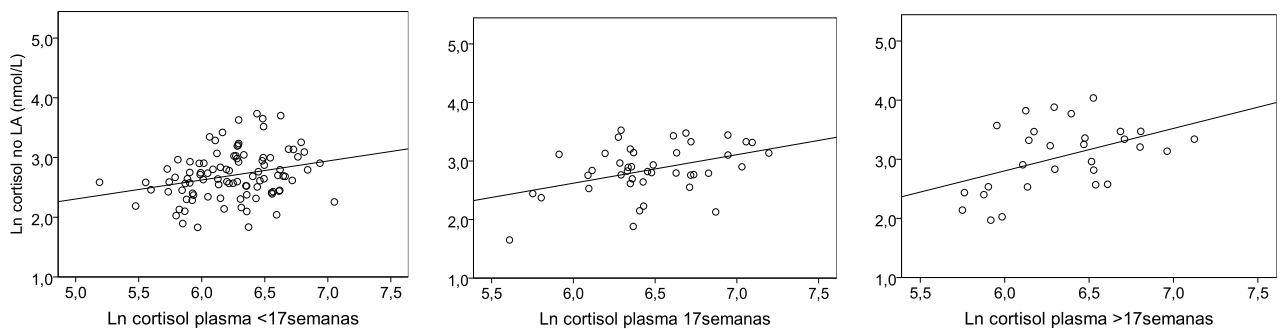


Figura 4.14 Relação entre a concentração de cortisol no LA (ordenadas) e no plasma materno (abcissas). Os gráficos diferem na gama de idades gestacionais usada. Esquerda: <17 semanas ( $r^2=0,073$ ;  $b=0,32$ ;  $p=0,008$ ); Centro: 17 semanas ( $r^2=0,168$ ;  $b=0,48$ ;  $p=0,007$ ); Direita: >17 semanas ( $r^2=0,212$ ;  $b=0,72$ ;  $p=0,012$ ).

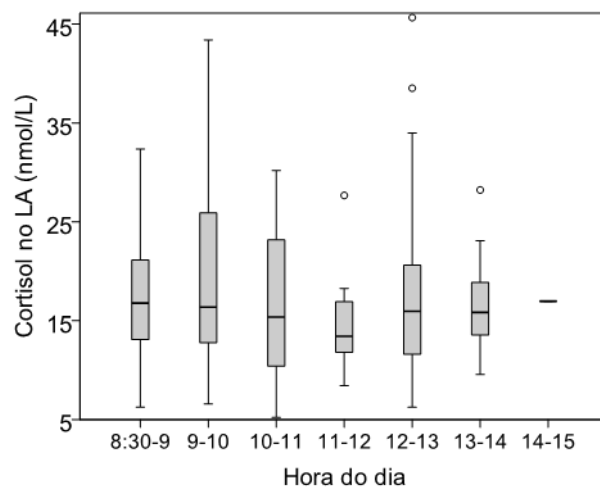


Figura 4.15 Evolução do cortisol no LA em 7 intervalos de tempo entre as 8:30 e as 15h. Foram retirados do gráfico dois *outliers* para melhor se reconhecer o padrão diurno. As medianas (m) e o tamanho da amostra (n) por intervalo são 8:30-9h:  $m=16,8$ ,  $n=15$ ; 9-10h:  $m=16,4$ ,  $n=53$ ; 10-11h:  $m=15,4$ ,  $n=14$ ; 11-12h:  $m=13,4$ ,  $n=13$ ; 12-13h:  $m=15,9$ ,  $n=56$ ; 13-14h:  $m=15,8$ ,  $n=15$ ; 14-15h:  $m=16,9$ ,  $n=1$ .

Uma vez que existe associação com o cortisol no plasma materno, é concebível que o cortisol no LA apresente um ritmo circadiano com padrão em U, semelhante ao materno (Figura 4.10). Efectivamente, o cortisol no LA também desceu ao longo da manhã, voltando a subir depois das 12h (Figura 4.15). O padrão existe, contudo é menos acentuado do que o observado no plasma materno.

Investigou-se se a associação entre o cortisol no LA e no plasma é afectada pelo grau de ansiedade da grávida. As mulheres foram divididas em dois grupos de ansiedade, não ansiosas (STAI-S  $\leq$  40) e ansiosas (STAI-S  $>$ 40), e em ambos a associação é estatisticamente significativa (Figura 4.16). A concentração de cortisol no LA tende a aumentar quando o cortisol no plasma materno aumenta. Este aumento é quantificado pelo declive (coeficiente de regressão) das rectas da Figura 4.16. Uma vez que as regressões foram efectuadas com dados logaritmizados, foram repetidas sem logaritmização dos dados e calculados os seus declives. Um aumento de 1 nmol/L de cortisol no plasma, traduz-se, em média, por um aumento de 0,016 nmol/L no LA nas menos ansiosas. Nas mais ansiosas, o aumento de 1 nmol/L de cortisol no plasma, traduz-se por um aumento médio de 0,01 nmol/L no LA.

Quando se divide a amostra por quartis de estado de ansiedade STAI-S (<35, 35-41, 41-52, >52), verifica-se existir uma correlação positiva significativa em todos (respectivamente,  $r=0,487$ ;  $0,525$ ;  $0,331$ ;  $0,314$ ), sendo o segundo (35-41) o que apresentou maior magnitude ( $r=0,525$ ;  $p<0,001$ ;  $b=0,696$ ). Aparentemente, portanto, os resultados sugerem que quando o cortisol no plasma aumenta os aumentos no LA são maiores no grupo de grávidas menos ansiosas. Porém, estes resultados devem ser aceites com reserva porque quando os declives das rectas da Figura 4.16 são comparados por análise de covariância (ANCOVA), verifica-se que a diferença entre eles não é estatisticamente significativa ( $F_{1,163}=1,61$ ,  $p=0,21$ ).

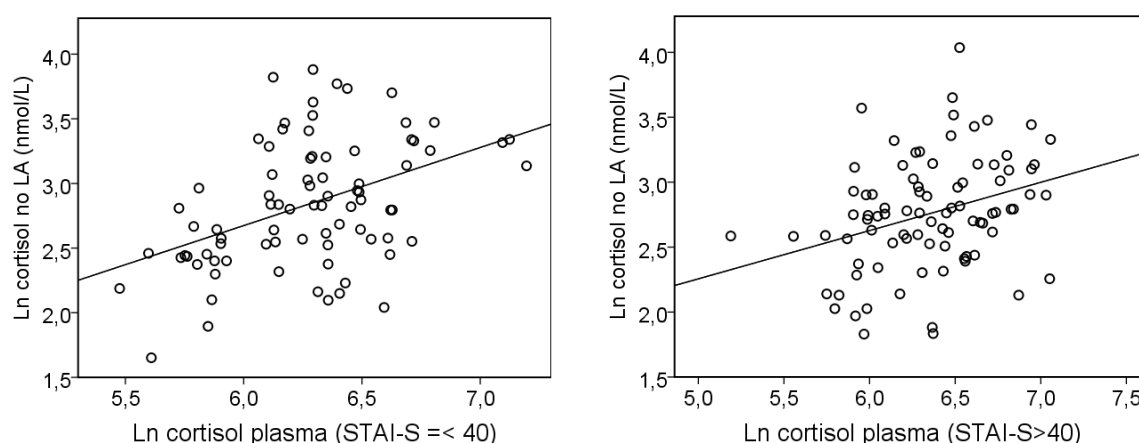


Figura 4.16 Regressão do cortisol no LA (ordenadas) vs. cortisol no plasma materno no grupos de menos ansiosas (esquerda) e mais ansiosas (direita). Coeficientes de determinação, significância, e coeficientes de regressão por grupo: menos ansiosas:  $r^2=0,19$ ,  $p<0,001$ ,  $b=0,60$ ; mais ansiosas:  $r^2=0,10$ ,  $p=0,003$ ,  $b=0,37$ .

#### 4.2.6 TESTOSTERONA NO LÍQUIDO AMNIÓTICO (LA)

A concentração de testosterona no LA representa cerca de 36% da do plasma. Os níveis de testosterona no líquido amniótico foram mais elevados nos fetos masculinos que nos femininos, com uma média (dp) de 0,82 (0,39) nos masculinos e 0,32 (0,3) nmol/L nos femininos (t-teste com dados logaritmizados: 9,7;  $p < 0,001$ ) (Figura 4.17, esquerda). Não foram detectadas associações a outras variáveis, nomeadamente, idade gestacional, idade da mãe, frequência cardíaca fetal e ansiedade da mãe (estado ou traço). O principal determinante da concentração de testosterona no LA foi o sexo do feto.

Não se encontrou uma correlação estatisticamente significativa entre a testosterona no LA e no plasma, nem globalmente nem por sexo do feto (masculino:  $r = -0,06$ ,  $p = 0,6$ ; feminino:  $r = 0,13$ ,  $p = 0,23$ ) (Figura 4.17, direita). Contudo, há um padrão suave na evolução da testosterona do LA ao longo do dia que é semelhante ao observado na testosterona do plasma (Figura 4.12): a testosterona do LA tende a descer ligeiramente ao longo da manhã e sobe após as 13h (Figura 4.18).

As concentrações de testosterona e de cortisol no LA também não estão correlacionadas entre si, nem nos fetos masculinos ( $r = 0,04$ ;  $p = 0,71$ ;  $n = 85$ ), nem nos femininos ( $r = 0,03$ ;  $p = 0,76$ ;  $n = 82$ ), nem quando os dois sexos são examinados em conjunto ( $r = -0,01$ ;  $p = 0,87$ ;  $n = 167$ ).

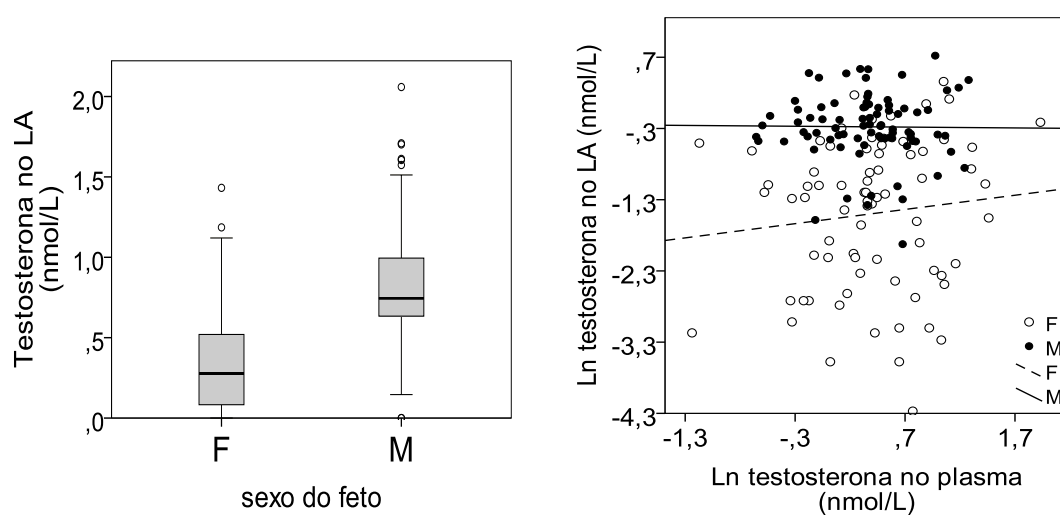


Figura 4.17 Esquerda: box-plot da testosterona no LA por sexo do feto, os rectângulos delimitam quartis e o traço a meio é a mediana. Direita: relação entre níveis de testosterona no LA e no plasma da grávida por sexo do feto. As linhas são regressões lineares com  $r^2 = 0,003$  ( $p = 0,6$ ) e  $r^2 = 0,018$  ( $p = 0,34$ ), respectivamente, para fetos masculinos e femininos.

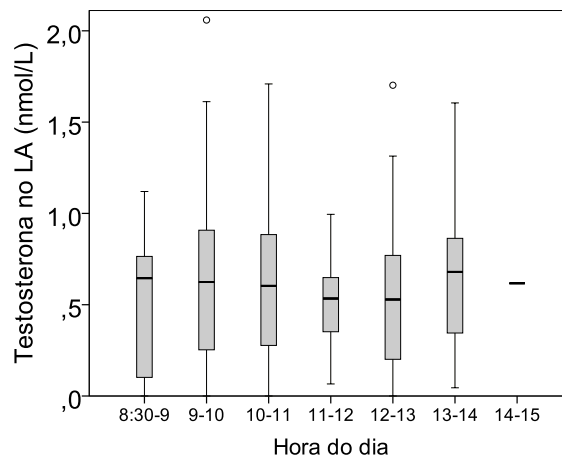


Figura 4.18 Evolução da testosterona do LA ao longo do dia. As medianas (m) por intervalo horário e o tamanho da amostra (n) são 8:30-9h: m=0,65, n=15; 9-10h: m=0,62, n=53; 10-11h: m=0,60, n=14; 11-12h: m=0,53, n=11; 12-13h: m=0,53, n=58; 13-14h: m=0,68, n=15; 14-15h: m=0,62, n=1

Uma vez que o cortisol tem uma variação circadiana e, na mãe, está associado à ansiedade, examinou-se a possível associação entre cortisol e testosterona no LA por hora do dia (manhã/tarde) e por grau de ansiedade STAI-S da mãe. As concentrações de testosterona e cortisol no LA não estão correlacionadas entre si de manhã ( $r = -0,22$ ,  $p=0,13$ ) nem de tarde ( $r=-0,03$ ,  $p=0,86$ ) (análises com dados logaritmizados). Também não foram encontradas associações significativas por grupos de maior ou menor ansiedade STAI-S.

#### 4.2.7 FREQUÊNCIA CARDÍACA DO FETO

A frequência cardíaca fetal (FCF) média foi 148 ppm e não se alterou após a intervenção de 30 min. A FCF tende a diminuir com o aumento da idade gestacional ( $r = -0,19$ ,  $p = 0,02$ ) (Figura 4.19). Esta associação foi detectada com os dados da primeira medição da FCF (antes da intervenção) e acentuou-se após a intervenção ( $r = -0,22$ ,  $p=0,004$ ). Não foram encontradas outras associações significativas, nomeadamente, a FCF não está correlacionada com o pulso da mãe, nem com a sua ansiedade, nem com os níveis hormonais medidos no LA. Também não se detectaram padrões de variação com a hora do dia.



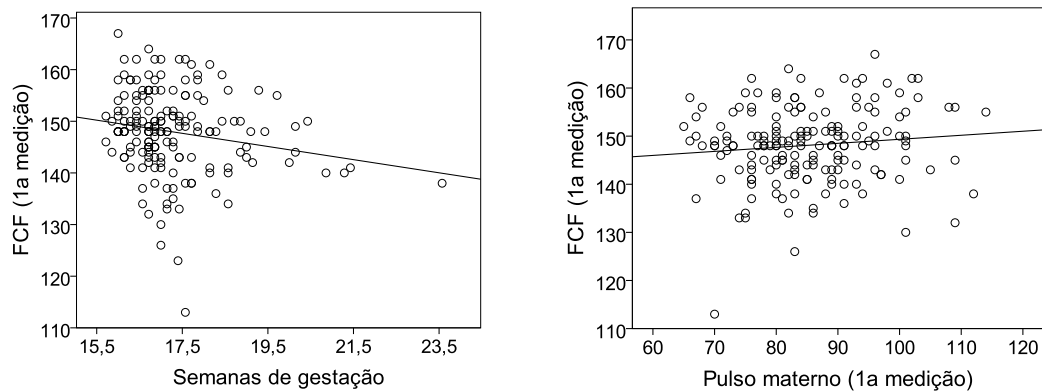


Figura 4.19 Relação da FCF com as semanas de gestação (esquerda) e o pulso materno (direita). A inclinação da recta da esquerda é significativa ( $r^2=0,035$ ;  $b=- 1,27$ ;  $p=0,02$ ), a da direita não é ( $r^2=0,012$ ;  $b= 0,08$ ;  $p=0,15$ ).

#### 4.2.8 IDADE GESTACIONAL NO PARTO

A idade gestacional média na altura do parto foi 39.3 semanas, sem diferenças significativas entre os sexos (t-teste=0,99;  $p=0,32$ ). (Tabela 4.1). Não se detectou evidência de associação entre o estado ou o traço de ansiedade das mães, avaliado aquando da amniocentese, e a idade gestacional no parto (Figura 4.20).

Encontrou-se associação negativa entre a idade gestacional no parto e a concentração de cortisol no plasma das grávidas do grupo da manhã ( $r=-0,25$ ;  $p=0,01$ ,  $n=99$ ): as mulheres com cortisol mais elevado tiveram tendencialmente partos mais cedo (Figura 4.21). O mesmo não se observou no grupo da tarde. O cortisol no LA também mostrou correlação negativa com a idade gestacional, mas sem significado estatístico, nem de manhã ( $r=-0,12$ ,  $p=0,27$ ,  $n=91$ ) nem de tarde ( $r=-0,12$ ;  $p=0,3$ ;  $n=73$ ) (Figura 4.21).

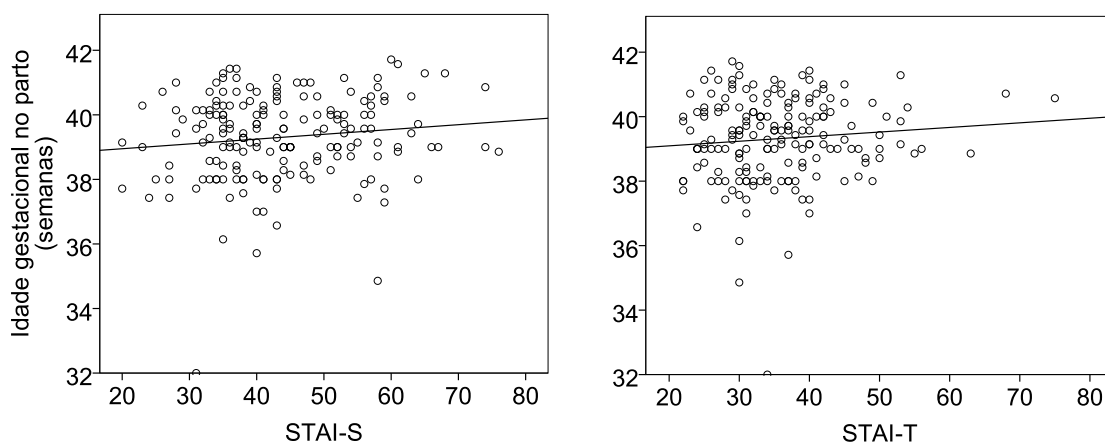


Figura 4.20 Idade gestacional no parto (ordenadas) versus STAI-S (esquerda) e STAI-T (direita). Nenhuma das rectas tem inclinação estatisticamente diferente de zero (Esquerda:  $r^2=0,02$ ;  $b=0,02$ ;  $p=0,09$ . Direita:  $r^2=0,01$ ;  $b=0,01$ ;  $p=0,21$ ).

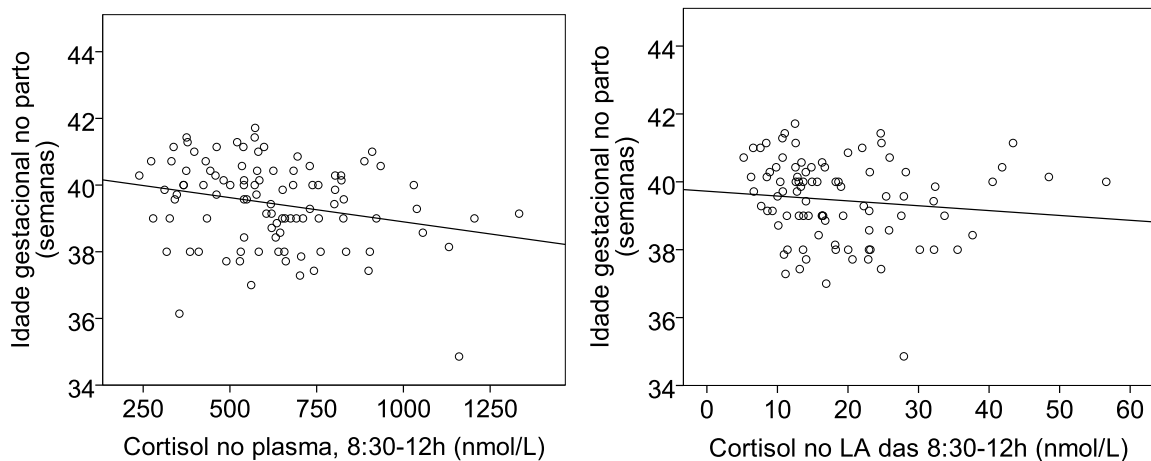


Figura 4.21. Associação entre a idade gestacional no parto (ordenadas) e o cortisol medido nas mães avaliadas de manhã. Esquerda: no plasma ( $r^2=0,064$ ;  $b=-0,001$ ;  $p=0,01$ ); direita: no LA ( $r^2=0,013$ ;  $b=-0,014$ ;  $p=0,27$ ).

Investigou-se a existência de diferenças entre os três principais tipos de parto. As idades gestacionais médias dos partos eutócicos, por cesariana e outros distócicos são, respectivamente, 39,4 ( $dp=1,3$ ), 39,3 ( $dp=1,3$ ) e 39,2 ( $dp=1,5$ ) semanas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre estas médias (ANOVA,  $F_{2,177}=0,21$ ;  $p=0,81$ ).

#### 4.2.9 PESO DO RN AO NASCER

Houve 51% de recém-nascidos (RN) masculinos e 49% femininos (94 e 90 respectivamente). Os rapazes pesaram em média significativamente mais que as raparigas, respectivamente 3395 e 3136 g ( $t\text{-test}=3,7$ ;  $p<0,001$ ) (Figura 4.22). Em ambos os sexos o peso do RN está negativamente correlacionado com a idade da mãe, mas as correlações são fracas e não significativas (masculinos  $r=-0,02$ ,  $p=0,9$ ; femininos  $r=-0,08$ ,  $p=0,4$ ).

Houve correlação negativa entre o cortisol das mães recebidas de manhã e o peso ao nascer dos respectivos RN masculinos e femininos, embora sem significado estatístico (respectivamente  $r=-0,18$ ,  $p=0,19$ ,  $n=51$ ;  $r=-0,10$ ,  $p=0,52$ ,  $n=43$ ). À tarde não se encontrou associação. O cortisol no LA de manhã também mostrou correlação negativa com o peso ao nascer, mas igualmente sem significado estatístico ( $r=-0,19$ ,  $p=0,19$  e  $r=0,10$ ,  $p=0,52$ , em masculinos e femininos respectivamente).

O peso dos RN ao nascer mostrou uma correlação, embora fraca, com a concentração de testosterona no plasma materno, mas de sinal contrário nos dois sexos. Nos RN masculinos o peso tendencialmente

aumentou com o aumento de testosterona ( $r=0,19$ ,  $p=0,08$ ) enquanto nos femininos diminuiu ( $r=-0,22$ ,  $p=0,04$ ) (Figura 4.22). O peso dos RN femininos também se mostrou significativamente correlacionado com a PA sistólica da mãe, sendo em média menor nas mães com PA mais elevada ( $r=-0,24$ ,  $p=0,02$ ).

A testosterona no LA não mostrou correlação com o peso ao nascer (masculinos  $r=0,02$ ,  $p=0,85$ ,  $n=82$ ; femininos  $r=0,02$ ,  $p=0,88$ ,  $n=81$ ).

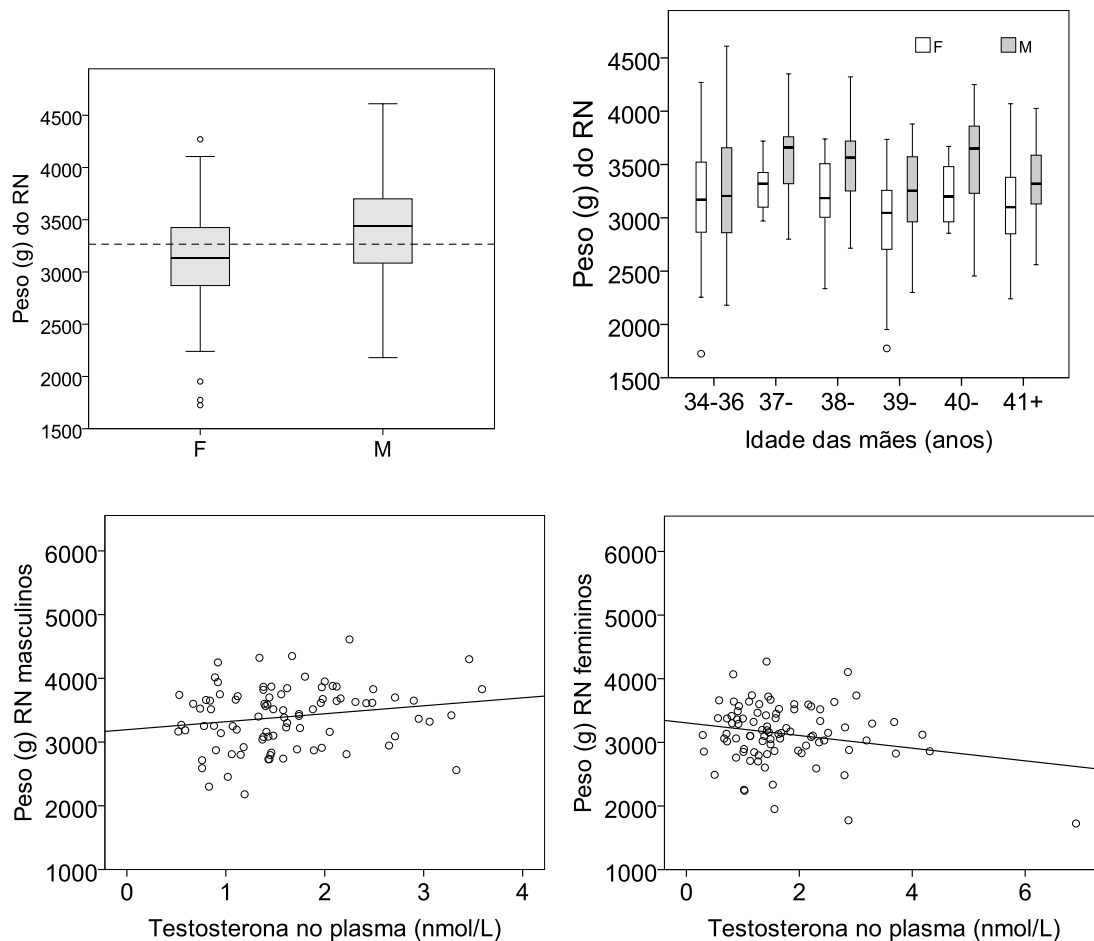


Figura 4.22 Topo-esquerda: peso dos RN femininos (F) e masculinos (M), a linha tracejada indica o peso médio de todos os RN e os retângulos indicam a posição da mediana e quartis de cada sexo. Topo-direita: peso dos RN por grupo etário da mãe e por sexo. Fundo: relação do peso do RN com a testosterona no plasma materno em RN masculinos (esquerda,  $r^2=0,034$ ;  $b=124,9$ ;  $p=0,08$ ) e femininos (direita,  $r^2=0,05$ ;  $b=-99,4$ ;  $p=0,04$ ).

### 4.3 Variações de escala de ansiedade, de parâmetros vitais e de níveis hormonais por grupos de intervenção

#### 4.3.1 VARIAÇÕES NA GRÁVIDA

Os níveis médios de ansiedade diminuíram em todos os grupos (música, revista, sala de espera) após a intervenção de 30 minutos. Os níveis de cortisol e testosterona no plasma diminuíram nos grupos de música e revista, aumentando ligeiramente na sala de espera (Tabelas 4.5 e 4.6). Os valores médios das variáveis pulso e PA da mãe também diminuíram com os 30 min de intervenção.

Investigou-se se a variação média dos níveis de ansiedade, concentração hormonal (Tabela 4.5) e variáveis fisiológicas (Tabela 4.6) era diferente entre os três grupos de intervenção. A hipótese nula de partida era que não existiam diferenças entre os grupos. Por outras palavras, ouvir música, ler revista ou esperar na sala não influenciaria de forma diferente a variação da ansiedade, das hormonas, ou de qualquer outra variável. Para evitar inflacionar a probabilidade  $\alpha$  de cometer um erro do Tipo I ( $\alpha$  = probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando esta é verdadeira), inflação essa que ocorreria se se efectuassem ANOVA's sucessivas para cada uma das oito variáveis das Tabelas 4.5-4.6, efectuou-se primeiro uma MANOVA (Multivariate Analysis of Variance). A rejeição da hipótese nula na MANOVA, se ocorrer, é feita garantidamente com  $\alpha = 0,05$  e confere maior legitimidade para prosseguir a investigação individualizada das variáveis por meio de ANOVA. A rejeição pela MANOVA indica que os grupos de intervenção actuam de forma diferente sobre *pelo menos* uma das variáveis das Tabela 4.5-4.6.

Tabela 4.5 Variação média ( $\Delta$ ) e desvio-padrão (dp) dos indicadores de ansiedade STAI e das concentrações de hormonas no plasma, por grupo de intervenção; variações negativas indicam diminuições.

Grupo	n	STAI-S (Estado)		STAI-T (Traço)		Cortisol (nmol/L)		Testosterona (nmol/L)	
		$\Delta$ Média	dp	$\Delta$ Média	dp	$\Delta$ Média	dp	$\Delta$ Média	dp
Música	70	-8,2	8,4	-1,5	3,4	-60,6	126	-0,08	0,37
Revista	57	-5,7	6,2	-0,8	4	-51,2	112	-0,11	0,25
Sala Espera	57	-4,1	5,3	-1,8	3,7	7,9	144	0,06	0,34
Total	184	-6,1	7,1	-1,4	3,7	-36,5	131	-0,05	0,33

Tabela 4.6 Variação média ( $\Delta$ ) e desvio-padrão (dp) do pulso da mãe, pressão arterial e frequência cardíaca fetal; variações negativas indicam diminuições. Os tamanhos das amostras indicados diferem no caso da FCF onde foram  $n=65, 54, 51$  respectivamente, música, revista, sala de espera.

Grupo	n	Pulso mãe		PA sistólica		PA diastólica		Freq Cardíaca Fetal	
		$\Delta$ Média	dp	$\Delta$ Média	dp	$\Delta$ Média	dp	$\Delta$ Média	dp
Música	70	-5,6	6,7	-6,3	9,4	-1,8	7	-0,78	7,7
Revista	57	-4,5	7,1	-9,8	12,1	-4,3	7,6	1,81	7,6
Sala Espera	57	-6,0	6,0	-0,93	9,1	-0,58	7,9	-0,45	6,0
Total	184	-5,4	6,6	-5,7	10,8	-2,2	7,6	0,2	7,3

Todos os testes habitualmente usados em MANOVA ( $T^2$ -Hotteling, traço de Pillai,  $\lambda$ -Roy) foram altamente significativos ( $p<0,001$ ), indicando que existiram diferenças significativas entre os grupos de intervenção no que respeita à resposta das grávidas à intervenção. Este resultado confere maior confiança para prosseguir para uma investigação univariada, variável a variável, através de ANOVA. A Tabela 4.7 apresenta os resultados.

As ANOVAs testam, para cada variável, se a resposta das mulheres diferem entre os grupos de intervenção de forma estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ). Na Tabela 4.7, a última coluna (Sig.) apresenta os *p-values* para cada variável. Verifica-se que a intervenção de 30 minutos diferiu significativamente entre grupos nas variáveis STAI-S, cortisol, testosterona e PA (sistólica e diastólica). Não se registou um efeito significativamente diferente entre grupos no STAI-T, no pulso da grávida e na FCF.

A ANOVA, contudo, é um teste global à diferença entre grupos. O facto de uma variável ter  $p<0,05$ , indica ser afectada de forma diferente pelos grupos, mas não indica *que grupo difere de que grupo*. Por exemplo, o cortisol é significativo (Tabela 4.7) porque a sua descida diferiu entre grupos, mas a descida do cortisol é diferente entre o grupo da música e o da sala de espera? Ou entre o da revista e da sala de espera? Estas perguntas devem agora ser endereçadas às variáveis (e apenas estas) em que a ANOVA rejeitou globalmente a inexistência de diferenças entre os grupos.

A comparação entre pares de grupos nas variáveis STAI-S, cortisol, testosterona e PA, foi feita com dois testes *post-hoc* (Tabela 4.8) que controlam a inflação do erro do Tipo I já mencionado. O teste Bonferroni é o mais conservador (só assinala significativa uma diferença forte entre grupos) e o Games-Howell o menos conservador. Na Tabela 4.8, cada grupo de participantes é comparado com os outros dois grupos. Primeiro, a variação do estado de ansiedade (STAI-S) no grupo da música é comparada com a variação no grupo da revista, revelando uma diferença não-significativa ( $p=0,152$ ), depois é comparada com o grupo da sala de

espera, revelando uma diferença significativa ( $p=0,003$ ). O procedimento é repetido a seguir com o teste Games-Howell e os resultados são semelhantes. O mesmo procedimento é feito para todas as variáveis identificadas como significativas pela ANOVA (Tabela 4.8).

Tabela 4.7 ANOVAs do efeito dos grupos de intervenção sobre cada variável (na 1ª coluna). Apresentam-se as variâncias médias (*Mean Square, MS*) atribuídas aos grupos (*MS-Between Groups*) e às diferenças não sistemáticas entre indivíduos (*MS-Within Groups*). A estatística de teste, *F*, é o quociente *MS-Between/MS-Within*. Se o efeito dos grupos é significativamente maior que as diferenças não-sistemáticas, o *F* é significativo e, na última coluna,  $p < 0,05$  ( $p$  é designado *Sig* neste output do SPSS®).

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
variação_do_STAI_S	Between Groups	538,283	2	269,141	5,653	,004
	Within Groups	8618,043	181	47,613		
	Total	9156,326	183			
variação_do_STAI_T	Between Groups	,023	2	,012	1,023	,362
	Within Groups	2,046	179	,011		
	Total	2,070	181			
variação_do_Cortisol	Between Groups	,488	2	,244	5,636	,004
	Within Groups	7,829	181	,043		
	Total	8,317	183			
variação_da_Testosteron	Between Groups	1,000	2	,500	4,642	,011
	Within Groups	19,502	181	,108		
	Total	20,502	183			
variação_do_Pulso	Between Groups	72,218	2	36,109	,825	,440
	Within Groups	7920,109	181	43,758		
	Total	7992,326	183			
variação_da_PA_sistolica	Between Groups	2274,255	2	1137,127	10,872	,000
	Within Groups	18931,479	181	104,594		
	Total	21205,734	183			
variação_da_PA_diastolic	Between Groups	422,052	2	211,026	3,790	,024
	Within Groups	10078,904	181	55,685		
	Total	10500,957	183			
variação_da_FCF	Between Groups	224,852	2	112,426	2,175	,117
	Within Groups	8631,760	167	51,687		
	Total	8856,612	169			

Seguidamente resumem-se os resultados das análises por variável e aprofunda-se a investigação de algumas variáveis.

Tabela 4.8 Comparação *post-hoc* entre pares de grupos de intervenção por variável. Para cada par, indica-se a diferença média da variação dos grupos, o erro-padrão da diferença e o nível de significância (*p*) da diferença. Diferenças significativas,  $p < 0,05$  e  $< 0,01$ , assinalam-se com \* e \*\*, respectivamente.

Variável dependente	Teste			Diferença média	Erro-pad	<i>p</i>
Variação do STAI-S	Bonferroni	Música	Revista	-2,4	1,23	0,152
			Sala-espera	-4,1	1,23	0,003**
		Revista	Música	2,4	1,23	0,152
			Sala-espera	-1,7	1,29	0,597
		Sala-espera	Música	4,1	1,23	0,003**
			Revista	1,7	1,29	0,597
	Games-Howell	Música	Revista	-2,4	1,3	0,153
			Sala-espera	-4,1	1,23	0,003**
		Revista	Música	2,4	1,3	0,153
			Sala-espera	-1,7	1,08	0,274
		Sala-espera	Música	4,1	1,23	0,003**
			Revista	1,7	1,08	0,274
Variação do cortisol (Ln)	Bonferroni	Música	Revista	-0,02	0,04	1,000
			Sala-espera	-0,12	0,04	0,004**
		Revista	Música	0,02	0,04	1,000
			Sala-espera	-0,1	0,04	0,042*
		Sala-espera	Música	0,12	0,04	0,004**
			Revista	0,1	0,04	0,042*
	Games-Howell	Música	Revista	-0,02	0,04	0,782
			Sala-espera	-0,12	0,04	0,008**
		Revista	Música	0,02	0,04	0,782
			Sala-espera	-0,1	0,04	0,048*
		Sala-espera	Música	0,12	0,04	0,008**
			Revista	0,1	0,04	0,048*
Variação da testosterona	Bonferroni	Música	Revista	0,03	0,06	1,000
			Sala-espera	-0,14	0,06	0,051
		Revista	Música	-0,03	0,06	1,000
			Sala-espera	-0,18	0,06	0,014*
		Sala-espera	Música	0,14	0,06	0,051
			Revista	0,18	0,06	0,014*
	Games-Howell	Música	Revista	0,03	0,06	0,806
			Sala-espera	-0,14	0,06	0,072
		Revista	Música	-0,03	0,06	0,806
			Sala-espera	-0,18	0,06	0,007**
		Sala-espera	Música	0,14	0,06	0,072
			Revista	0,18	0,06	0,007**
Variação da PA sistólica	Bonferroni	Música	Revista	3,5	1,82	0,169
			Sala-espera	-5,4	1,82	0,011*
		Revista	Música	-3,5	1,82	0,169
			Sala-espera	-8,9	1,92	<0,001**
		Sala-espera	Música	5,4	1,82	0,011*
			Revista	8,9	1,92	<0,001**
	Games-Howell	Música	Revista	3,5	1,96	0,178
			Sala-espera	-5,4	1,65	0,004**
		Revista	Música	-3,5	1,96	0,178
			Sala-espera	-8,9	2,00	<0,001**
		Sala-espera	Música	5,4	1,65	0,004**
			Revista	8,9	2,00	<0,001**
Variação da PA diastólica	Bonferroni	Música	Revista	2,6	1,33	0,168
			Sala-espera	-1,2	1,33	1,000
		Revista	Música	-2,6	1,33	0,168
			Sala-espera	-3,8	1,40	0,024*
		Sala-espera	Música	1,2	1,33	1,000
			Revista	3,8	1,40	0,024*
	Games-Howell	Música	Revista	2,6	1,3	0,126
			Sala-espera	-1,2	1,34	0,648
		Revista	Música	-2,6	1,30	0,126
			Sala-espera	-3,8	1,45	0,029*
		Sala-espera	Música	1,2	1,34	0,648
			Revista	3,8	1,45	0,029*

### Variação do estado de ansiedade (STAI-S)

O estado de ansiedade médio das mulheres desceu em todos os grupos de intervenção, tendo-se verificado a maior descida no grupo da música (-8,2) e a menor no da sala de espera (-4,1). A diferença entre estes dois grupos foi altamente significativa ( $p=0,003$ ). A descida no grupo da revista foi intermédia (-5,7) e não foi estatisticamente diferente dos outros grupos. Investigou-se também se o estado inicial de ansiedade da mulher estava associado à descida subsequente à intervenção. De facto, o coeficiente de correlação parcial entre o STAI-S inicial e a sua subsequente descida (controlando para hora do dia, idade, idade gestacional e STAI-T) é altamente significativo ( $r=-0,31$ ,  $p<0,001$ ), indicando que as mulheres inicialmente mais ansiosas tiveram descidas de ansiedade mais pronunciadas. Não obstante, as diferenças entre grupos de intervenção não se alteram quando se remove o efeito do estado inicial de ansiedade, o que foi demonstrado por uma ANCOVA em que o STAI-S inicial das mulheres era a co-variável cujo efeito se pretendia remover. A ANCOVA foi altamente significativa ( $F_{2,180}=11,5$ ,  $p<0,001$ ) no que respeita ao efeitos das intervenções sobre a variação do STAI-S, tal como a ANOVA já o fora.

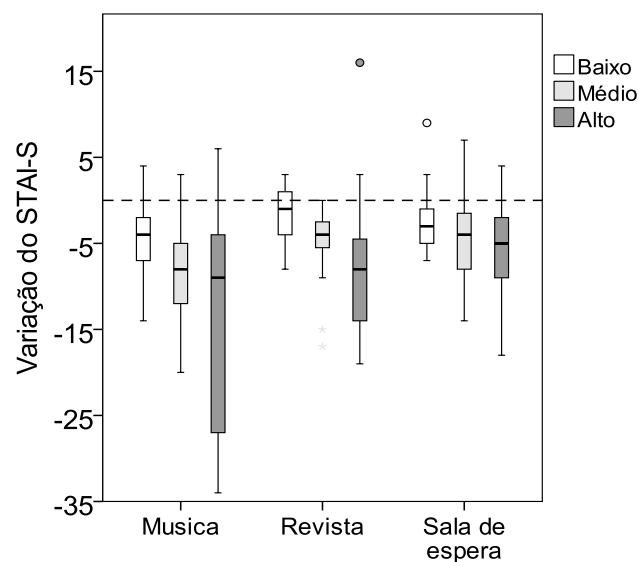


Figura 4.23 Variações do STAI-S após a intervenção, por tipo de intervenção (música, revista, sala) e pelos três níveis iniciais de ansiedade: baixo (<37), médio (37-46), alto ( $\geq 47$ ). Valores abaixo da linha tracejada indicam descidas do estado de ansiedade com a intervenção.

Para ilustrar o efeito do estado inicial de ansiedade e, simultaneamente, do tipo de intervenção de 30 min, tricotomizou-se a ansiedade das mulheres em baixa ( $STAI-S < 37$ ), média ( $37 \leq STAI-S < 47$ ) e alta ( $STAI-S \geq 47$ ) (os valores 37 e 47 correspondem, respectivamente, aos percentis 33 e 66% do STAI-S) e fez-se gráfico da descida do STAI-S por grupo de ansiedade e de intervenção. A Figura 4.23 mostra que as maiores descidas foram na intervenção com música, seguida da revista e da sala de espera. Observa-se também que a descida de ansiedade é maior nas mulheres inicialmente mais ansiosas, intermédia nas mediamente



ansiosas e menor nas menos ansiosas. Este gradiente mantém-se dentro dos três grupos de intervenção. Uma análise de regressão múltipla em que o STAI-S é a variável dependente, indica que 18,2% ( $p < 0,001$ ) da variação do STAI-S é explicada pelo estado inicial de ansiedade e pelo tipo de intervenção a que a mulher foi submetida (aproximadamente 9% cada um). Um conjunto adicional de variáveis, incluindo o STAI-T, hora do dia, idade gestacional, idade materna e IMC, adiciona apenas 1,3% de variância explicada, o que não é estatisticamente significativo ( $p = 0,72$ ).

#### *Variação do traço de ansiedade (STAI-T)*

A média inicial do STAI-T (35,4) e a média pós-intervenção (34,0) não são significativamente diferentes ( $t$ -teste=1,14,  $p = 0,26$ ). A variação do STAI-T no seguimento da intervenção, está negativamente correlacionada com o traço inicial, (correlação parcial:  $r = -0,18$ ,  $p = 0,02$ , controlando para idade, idade gestacional, STAI-S, hora do dia) ou seja, mulheres à partida com traço de ansiedade mais alto, tendem a descer mais o traço após a intervenção e isso não se deve a confundimento causado pelas variáveis controladas. Passou-se algo semelhante com o estado (STAI-S), embora com o traço a correlação seja fraca. Em média, o traço de ansiedade desceu -1,4 em todos os grupos, tendo sido maior na sala de espera (-1,8) e na música (-1,5) (Tabela 4.5). A ANOVA revelou não haver diferenças estatisticamente significativas entre as descidas das três intervenções.

#### *Variação do pulso*

O pulso da mãe (ppm) desceu em todos os grupos de intervenção, em média, entre 4 a 6 pulsações, mas a ANOVA revelou que as diferenças entre as intervenções não são significativas. A variação do pulso está fortemente correlacionada com o valor inicial do pulso ( $r = -0,516$ ,  $p < 0,001$ ): mulheres com o pulso mais alto são as que descem mais o pulso no decorrer da intervenção. A variação do pulso está também significativamente correlacionada com a variação da PA diastólica ( $r = 0,13$ ,  $p = 0,04$ ), mas não com a variação da sistólica ( $r = 0,11$ ,  $p = 0,13$ ). Os valores absolutos iniciais do pulso avaliados à chegada (por oposição a variações), recorde-se, mostraram significativa correlação com a PA sistólica e diastólica (Secção 4.2.2).

#### *Variação da pressão arterial sistólica*

Em média, a PA sistólica desceu em todos os grupos de intervenção. A maior descida foi na revista (-9,8) e a menor na sala de espera (-0,9). A ANOVA revelou que, globalmente, houve diferenças entre os grupos ( $p < 0,001$ ) e os critérios *post-hoc* indicam diferenças muito significativas entre a revista e a sala de espera ( $p < 0,001$ ) e entre a música e a sala de espera ( $p = 0,01$  no critério Bonferroni) (Tabela 4.8). A variação da PA

sistólica está também significativamente correlacionada com a variação da PA diastólica ( $r=0,44$ ,  $p<0,001$ ) (Figura 4.24) e com o valor inicial da PA sistólica. As mulheres que, antes da intervenção, tinham PA mais alta, foram também as que apresentaram maiores descidas ( $r=-0,44$ ,  $p<0,001$ ). Globalmente, o grupo de intervenção, a variação da PA diastólica e o valor inicial da PA sistólica, explicaram 40% da variação da PA sistólica ( $p<0,001$ ).

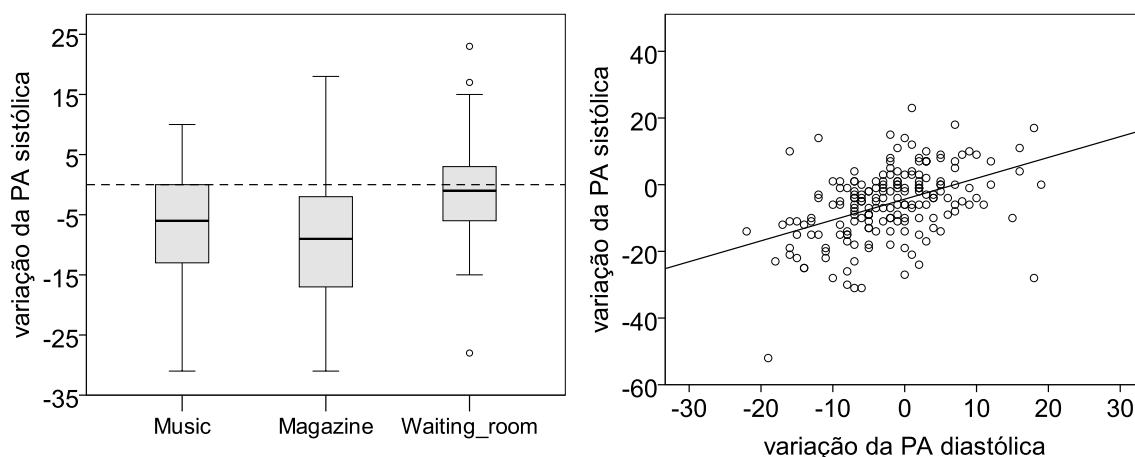


Figura 4.24 Esquerda: variação da PA sistólica por grupo de intervenção. Valores abaixo da linha tracejada indicam descidas da PA. Direita: variação da PA sistólica (ordenadas) em função da variação da PA diastólica (abscissas),  $y = -4,34 + 0,625 X$ ,  $r^2 = 0,19$  ( $p < 0,001$ ).

#### *Variação da pressão arterial diastólica*

Em média, a PA diastólica desceu em todos os grupos de intervenção. Tal como na PA sistólica, a maior descida foi na revista (-4,3) e a menor na sala de espera (-0,6). A ANOVA revelou que, globalmente houve diferenças entre os grupos quanto à descida da PA diastólica ( $p=0,02$ ), muito em particular devido à diferença entre a descida na revista e na sala de espera ( $p=0,02$ ). Como se viu, a variação da PA diastólica está correlacionada com a variação da PA sistólica (Figura 4.24). Está também negativamente correlacionada com o valor inicial da PA diastólica ( $r=-0,48$ ,  $p<0,001$ ): mulheres inicialmente com diastólica mais elevada tendem a descê-la mais no decorrer da intervenção.

#### *Variação do cortisol no plasma*

O nível médio de cortisol no plasma (nmol/L) desceu nos grupos de intervenção com música (-60,6) e revista (-51,2) (Figura 4.25), tendo subido na sala de espera (7,9). As diferenças entre os dois primeiros e a sala de espera são significativas, respectivamente  $p=0,004$  e  $p=0,042$ . Além dos grupos de intervenção,

houve outras variáveis que estiveram correlacionadas com a descida do cortisol. Em primeiro lugar, a testosterona ( $r=0,53$ ,  $p<0,001$ ): grandes descidas de cortisol associaram-se a grandes descidas de testosterona – o assunto será retomado adiante a propósito da variação da testosterona. Em segundo lugar, o nível inicial de cortisol ( $r=-0,27$ ;  $p<0,001$ ): um nível inicial mais elevado de cortisol associa-se a maiores descidas de cortisol (Figura 4.25-direita). Em terceiro lugar, a hora do dia ( $r=0,24$ ,  $p=0,001$ ): nas primeiras horas da manhã ocorreram maiores descidas de cortisol. A Figura 4.25-esquerda ilustra como, dentro de cada grupo de intervenção, as maiores descidas ocorrem de manhã. Num modelo de regressão múltipla onde a variação do cortisol é a variável dependente, a variação de testosterona, o cortisol inicial, a hora do dia e o tipo de intervenção, explicam 35,1% da variação do cortisol, um valor altamente significativo ( $p<0,001$ ). Se a variação de testosterona for removida deste modelo, uma vez que se pode questionar se desempenha um papel causativo sobre a descida do cortisol, ainda assim as outras três variáveis explicam 13,4% da variação do cortisol, o que é ainda altamente significativo ( $p<0,001$ ).

A comparação entre grupos quanto à descida do cortisol, pode ser feita tendo em atenção o valor inicial de cortisol através da comparação entre as médias de percentagens de variação ((valor final – valor inicial) $\times 100$ /valor inicial) por oposição a comparação entre as médias das variações absolutas de cortisol. Como se pode ver na tabela seguinte, o cortisol desceu 9,6% no grupo da música, desceu 7,5% no da revista e subiu 3,1% na sala de espera.

	Manhã	Tarde	TOTAL
Música	-12,1%	-6,2%	-9,6%
Revista	-9,6%	-4,6%	-7,5%
Sala-espera	1,1%	5,3%	3,1%
TOTAL	-7,6%	-1,8%	-5,0%

As descidas percentuais médias foram de -7,6% de manhã e -1,8% de tarde. A intervenção por música conduziu a descidas maiores que as outras intervenções, quer de manhã (-12,1%) quer de tarde (-6,2%).

As conclusões relativas a diferenças entre grupos de intervenção não se alteram quando se utiliza um modelo estatístico para remover o efeito da concentração inicial de cortisol e da hora do dia. Para o demonstrar, efectuou-se uma ANCOVA (análise de covariância) em que o nível inicial de cortisol e a hora do dia são as co-variáveis cujo efeito se pretende remover. A ANCOVA é significativa ( $F_{2,179}=4,1$ ,  $p=0,02$ ) no que respeita ao efeito das intervenções sobre a variação do cortisol, tal como a ANOVA já o fora.

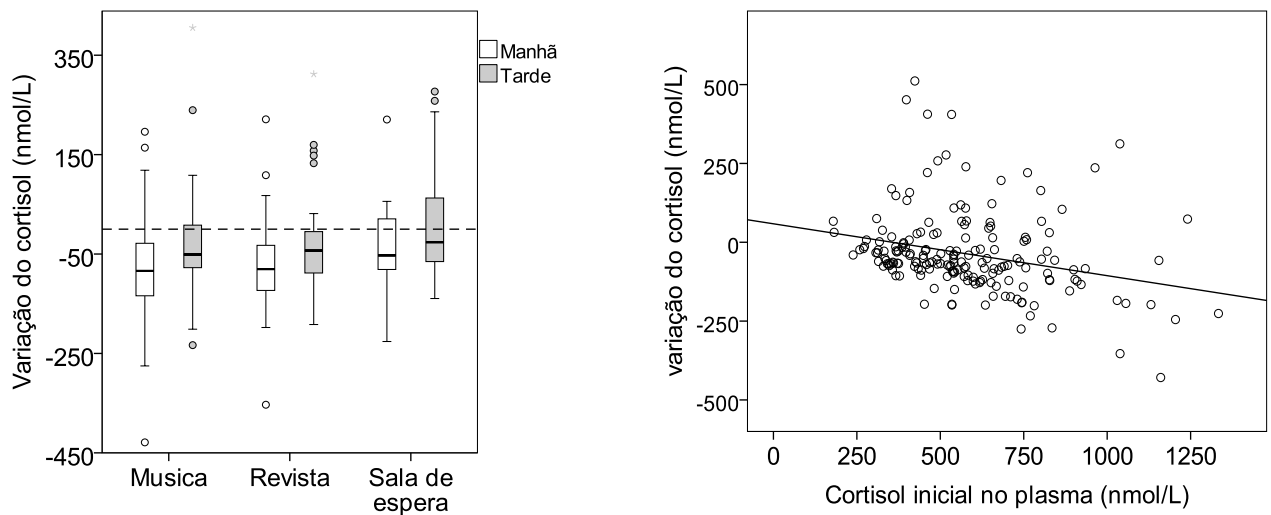


Figura 4.25 Esquerda - Variação do cortisol após a intervenção, por grupo de intervenção, de manhã (8:30-12h) e de tarde (12-15h), valores abaixo da linha horizontal tracejada indicam descidas do cortisol com a intervenção. Direita – variação do cortisol em função do seu valor inicial ( $r^2=0,07$ ,  $b=-0,16$ ,  $p<0,001$ ).

#### *Variação da testosterona no plasma*

O nível médio de testosterona no plasma (nmol/L) desceu nos grupos de intervenção com revista (-0,11) e com música (-0,08), tendo subido na sala de espera (0,06). A diferença entre a revista e a sala de espera foi significativa ( $p=0,014$  no critério Bonferroni). Os principais determinantes da variação de testosterona, além dos grupos de intervenção, foi, de forma muito significativa, a variação do cortisol ( $r=0,53$ ,  $p<0,001$ ). O nível inicial da própria testosterona ( $r=-1,8$ ,  $p=0,014$ ) (Figura 4.26) também contribuiu para explicar a sua descida. Num modelo de regressão múltipla, estas três variáveis explicam 30,6% ( $p<0,001$ ) da variação na testosterona. Adicionar ao modelo a idade da mulher, a idade gestacional e a hora do dia, acrescenta mais 1% de capacidade explicativa, o que não é estatisticamente significativo ( $p=0,48$ ).

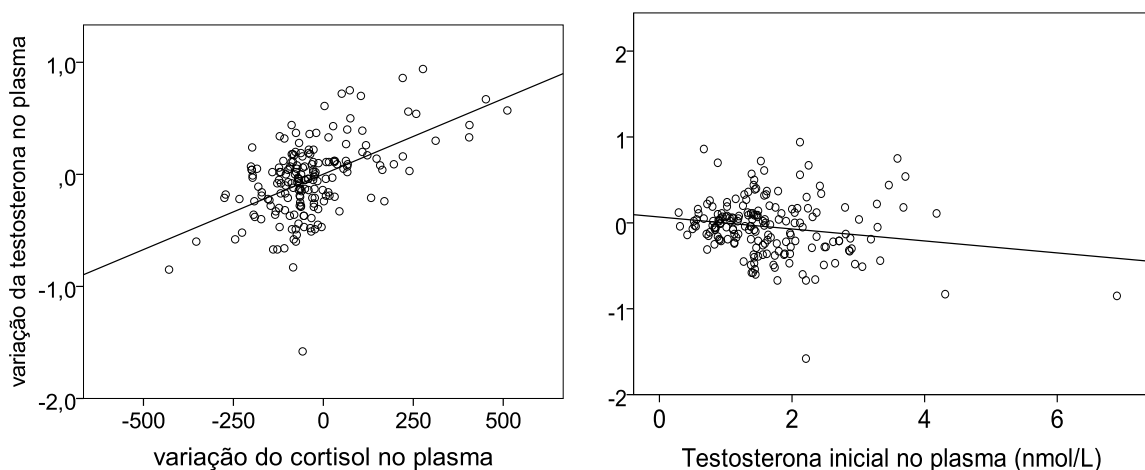


Figura 4.26 Esquerda: regressão da variação da testosterona contra a variação do cortisol, ambos no plasma em nmol/L, após a intervenção. A recta  $Y=0,002+0,001X$  tem  $r^2=0,276$  e declive altamente significativo ( $p<0,001$ ). Direita: variação da testosterona contra o nível inicial de testosterona no sangue,  $y=0,068-0,07 X$ ,  $r^2=0,03$  ( $p=0,014$ ).

#### *Variação do cortisol e testosterona no plasma com e sem auscultadores*

Dentro do grupo das 70 mulheres que ouviram música, comparou-se o grupo que ouviu com auscultadores ( $n=34$ ) com o grupo que ouviu música no ambiente ( $n=36$ ) quanto à variação de cortisol e testosterona no plasma, STAI-S, STAI-T, pulso, PA sistólica e diastólica, e FCF. Para evitar a inevitável inflação do erro de Tipo I que seria causada pela repetição sistemática de testes t-student a todas estas variáveis, efectuou-se em primeiro lugar uma ANOVA multivariada (MANOVA). Esta análise identifica a existência de diferenças significativas entre os dois grupos (auscultadores e ambiente) caso estas existam entre *pele menos* uma das variáveis, sem inflacionar o erro do Tipo I. Contudo, todos os critérios da MANOVA (traço de Pillai,  $H^2$ -Hotelling,  $\lambda$  de Roy), foram não significativos ( $p=0,297$ ), indicando não ter havido diferença nos resultados entre a audição por auscultadores e no ambiente.

#### 4.3.2 VARIAÇÕES NO FETO

##### *Variação da frequência cardíaca fetal*

A FCF foi avaliada antes e depois da amniocentese. Em média, pouco se alterou, em qualquer dos grupos de intervenção. Nas grávidas que ouviram música desceu (-0,8) e nas que leram revistas subiu (1,81). A ANOVA indicou não haver diferenças significativas entre os três grupos de intervenção e, globalmente, também não existe diferença estatisticamente significativa entre a média da FCF antes e depois da intervenção, respectivamente, 147,96 ( $dp= 8,1$ ) e 148,20 ( $dp= 7,0$ ). Os fetos com menor idade gestacional apresentam FCF mais elevada e foram os que desceram mais a FCF ( $r= -0,59$ ,  $p<0,001$ ) após a amniocentese (Figura 4.27). Não se registaram correlações entre a variação da FCF e a variação de outras variáveis da mãe, como a PA, o pulso e as hormonas no plasma.

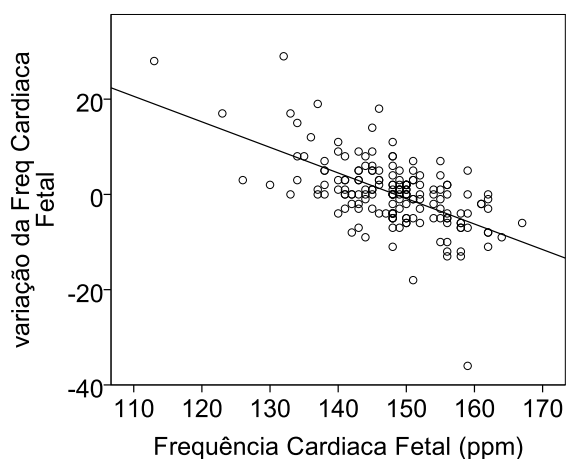


Figura 4.27 - Variação da FCF em função da FCF inicial ( $r^2=0,35$ ,  $b=0,536$ ,  $p<0,001$ )

#### *Concentração de cortisol e testosterona no líquido amniótico (LA)*

As concentrações médias de cortisol no LA foram comparadas entre os três grupos de intervenção (Tabela 4.9), não se tendo registado diferenças significativas entre elas (ANOVA,  $F_{2, 164}=1,21$ ,  $p=0,30$ ), nem de manhã nem de tarde, nem por sexo do feto.

Tabela 4.9 Média e desvio-padrão das concentrações de cortisol no LA por grupo de intervenção.

		Musica	Revista	Sala-espera	Total
Cortisol no LA (nmol/L)					
Total	<i>média</i>	19,6	17,8	17,1	18,3
	<i>dp</i>	9,6	9,1	7,9	9,0
Só manhã	<i>média</i>	21,6	17,7	16,3	18,8
	<i>dp</i>	11,1	9,9	6,7	9,8
Só tarde	<i>média</i>	16,9	17,8	18,0	17,5
	<i>dp</i>	6,3	8,0	9,3	7,8
Só masculinos	<i>média</i>	20,3	17,2	14,8	17,6
	<i>dp</i>	10,6	8,9	5,0	8,9
Só femininos	<i>média</i>	19	18,6	18,1	18,6
	<i>dp</i>	8,9	9,6	8,1	8,7

As concentrações médias de testosterona no LA também não diferiram significativamente entre grupos de intervenção dentro do mesmo sexo (ANOVA two-way,  $F_{2, 160}=1,08$ ,  $p=0,34$ ).

Tabela 4.10 Média e desvio-padrão das concentrações de testosterona no LA (nmol/L) por grupo de intervenção e sexo.

		Musica	Revista	Sala-espera	Total
Testosterona no LA					
Só masculinos	<i>média</i>	0,94	0,78	0,72	0,82
	<i>dp</i>	0,41	0,35	0,37	0,39
Só femininos	<i>média</i>	0,28	0,41	0,32	0,33
	<i>dp</i>	0,26	0,39	0,28	0,31
Só manhã	<i>média</i>	0,60	0,61	0,54	0,59
	<i>dp</i>	0,49	0,42	0,43	0,45
Só tarde	<i>média</i>	0,57	0,67	0,47	0,57
	<i>dp</i>	0,47	0,4	0,31	0,40

## 4.4 Rácio digital 2D:4D no Recém-Nascido e correlações

### 4.4.1 RÁCIO DIGITAL

Os rácios 2D:4D foram medidos em cada RN e em cada mãe por dois observadores. O tempo médio decorrido entre o parto e a medição foi de 38,9 h (dp= 60,2; min-máx: 2,4-541,3). As observações do rácio 2D:4D feitas pelos dois observadores foram analisadas por “repeated measures” ANOVA (e.g. Zar 2007), com o objectivo de testar se as diferenças de leitura entre os observadores são negligíveis, comparativamente às diferenças reais entre os indivíduos. Este tipo de ANOVA compara a média das diferenças existentes entre os RN com o chamado erro de medição, ou seja, a diferença média de medição entre os observadores no mesmo indivíduo. O quociente entre estas médias é altamente significativo nas duas mãos (mão direita:  $F= 95,6$ ,  $p<0,001$ ; mão esquerda:  $F=93,4$ ,  $p<0,001$ ), indicando que o erro de medição dos observadores não é apreciável quando comparado com as diferenças que existem entre os RN. O correspondente coeficiente de correlação intra-classe para as medições dos observadores é  $r_1 = 0,89$  e  $0,90$  (em ambos  $p< 0,001$ ), respectivamente, para as mãos direita e esquerda. Estes resultados comprovam que as medições do rácio 2D:4D são coincidentes entre os observadores e não existem enviesamentos direccionais (por exemplo, um observador tender a medir sempre mais alto que o outro).

Doravante os cálculos efectuam-se com a média dos rácios 2D:4D dos dois observadores disponível para cada mão.

Os RN masculinos apresentaram rácios médios 2D:4D mais baixos que os RN femininos (Tabela 4.11) e as diferenças foram significativas entre as mãos esquerdas (masculinos: 0,927; femininos: 0,950; t-teste=2,95;  $p=0,004$ ), mas não significativas entre as mãos direitas (masculinos: 0,945; femininos: 0,954;  $t=1,03$ ,  $p=0,305$ ). Constatou-se que existe grande sobreposição das medidas de 2D:4D entre os dois sexos, a qual se traduz num coeficiente de correlação entre sexo e 2D:4D de apenas  $r=0,10$  ( $p=0,31$ ) para a mão direita e  $r=0,28$  ( $p=0,004$ ) para a esquerda (Figura 4.28).

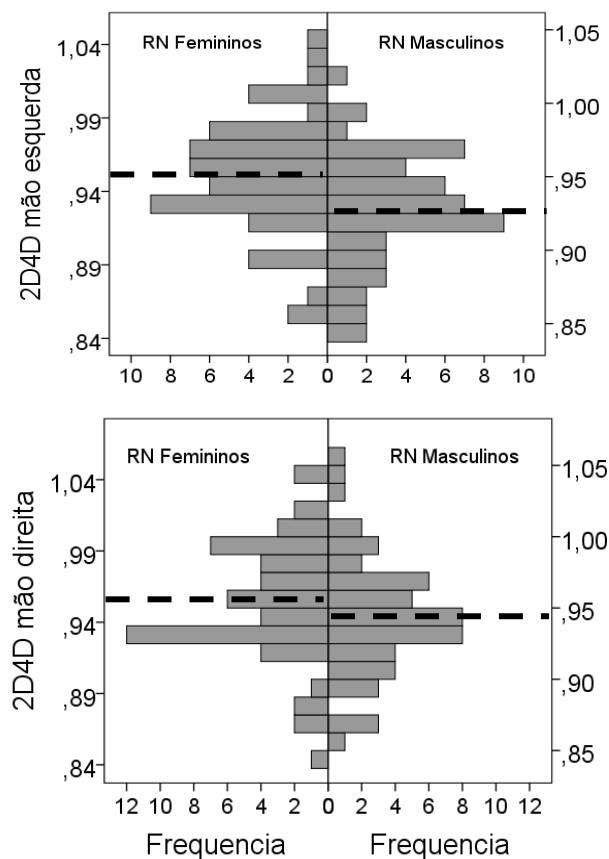


Figura 4.28 Histograma das distribuições do rácio 2D:4D na mão esquerda (topo) e direita (fundo) de 54 RN femininos e 52 masculinos. As linhas ponteadas posicionam as médias do 2D:4D em cada sexo.



Tabela 4.11 Média (desvio padrão) dos rácios 2D:4D nos recém-nascidos e suas mães.

		2D:4D médio (dp)		Comparação entre sexos por mão	
		Mão direita	Mão esquerda	Mão direita	Mão esquerda
Recém-Nascido	Masculino (n= 52)	0,945 (0,043)	0,927 (0,039)	t=1,03 p=0,305	t=2,95 p=0,004
	Feminino (n= 54)	0,954 (0,042)	0,950 (0,042)		
				Comparação entre mãe e RN	
		Mão direita	Mão esquerda	Mão direita	Mão esquerda
Mãe	Total (n = 106)	0,982 (0,031)	0,968 (0,034)		
	com RN masculino	0,977 (0,032)	0,959 (0,035)	t=4,47; p<0,001	t=4,73; p<0,001
	com RN feminino	0,986 (0,030)	0,977 (0,032)	t=5,80; p<0,001	t=3,89; p<0,001

O rácio digital (RD) médio 2D:4D também foi calculado para as mães. Verificou-se que as que tiveram filhos masculinos tinham RDs mais baixos do que as que tiveram filhas e, mais uma vez, as diferenças foram significativas entre as mãos esquerdas (com RN masc: 0,959; com RN fem: 0,977;  $t=2,77$ ,  $p=0,007$ ) mas não entre as direitas (com RN masc: 0,977; com RN fem: 0,986;  $t=1,49$ ,  $p=0,14$ ), um padrão semelhante ao encontrado nos RNs (Tabela 4.11).

O rácio médio nos RN foi significativamente mais baixo que o das suas mães nos dois sexos, uma diferença que tem muito baixa probabilidade de ocorrer por mero acaso (t-student para amostras emparelhadas,  $p<0,001$ ) (Tabela 4.11). Por exemplo, a diferença média 2D:4D entre mãe e filho masculino na mão direita foi 0,032 ( $=0,977-0,945$ ) e esta diferença foi significativa (t-teste = 4,47,  $p<0,001$ ).

Investigou-se em seguida até que ponto a variabilidade observada nos rácios 2D:4D de cada mão do RN pode ser explicada pelo sexo e pelos rácios da própria mãe. Para isso construiu-se um modelo de regressão múltipla para cada mão, no qual o 2D:4D do RN foi a variável dependente e as variáveis independentes foram os 2D:4D da mãe (mãos esquerda e direita) e sexo do RN.

Ambas as mãos da mãe contribuíram significativamente para explicar a variabilidade do 2D:4D na mão direita dos seus filhos ( $R^2=10\%$ ;  $p=0,006$ ) e adicionar o sexo ao modelo não apresenta uma contribuição significativa, com o coeficiente de determinação  $R^2$  a aumentar apenas para 10,1% ( $p=0,78$ ), confirmando a ausência de associação entre sexo e mão direita do RN. Quanto à mão esquerda, o RD da mãe explica 9,2% ( $p=0,008$ ) da variabilidade do 2D:4D e a adição do sexo ao modelo mostra-se relevante pois o  $R^2$  aumenta para 17% ( $p=0,003$ ). Confirma-se portanto que a mão esquerda do RN está associada ao sexo, mesmo quando se controla para o efeito do RD da mãe.

O rácio 2D:4D da **mão direita das mães** apresentou correlação positiva estatisticamente significativa com o 2D:4D de ambas as mãos dos RN femininos (mão direita  $r=0,35$ ,  $p=0,01$ ; mão esquerda  $r=0,30$ ,  $p=0,03$ ). Relativamente aos 2D:4D dos RN masculinos, as correlações foram também positivas mas sem significado estatístico (Tabela 4.12). O rácio 2D:4D da **mão esquerda das mães** correlacionou-se significativamente apenas com a mão direita dos RN femininos ( $r=0,28$ ,  $p=0,04$ ).

Tabela 4.12 Coeficiente de correlação entre RNs e suas mães em relação ao 2D:4D, por mão e por sexo. As correlações significativas ( $p<0,05$ ) estão assinaladas\*.

		RN masculinos				RN femininos			
		direita	$p$	esquerda	$p$	direita	$p$	esquerda	$p$
Mãe	direita	0,227	0,11	0,206	0,14	0,35*	0,01	0,30*	0,03
	esquerda	0,223	0,11	-0,03	0,86	0,28*	0,04	0,06	0,65

Houve correlação significativa entre as mãos direita e esquerda dos RN femininos ( $r=0,54$ ;  $p<0,001$ ) e das mães ( $r=0,6$ ;  $p<0,001$ ) quanto ao rácio 2D:4D, mas não nos RN masculinos ( $r=0,13$ ;  $p=0,37$ ) (Tabela 4.13).

Tabela 4.13 Coeficientes de correlação entre as duas mãos de RNs e das mães quanto ao rácio 2D:4D.

		Mão esquerda		
		RN mascul	RN femin	mãe
Mão direita	RN mascul	0,13 $p=0,37$		
	RN femini		0,54 $p<0,001$	
	mãe			0,61 $p<0,001$

Em média, os RN masculinos apresentaram dedos mais longos que os RN femininos (Tabela 4.14). Por exemplo, na mão direita, o 2D médio foi 24,71 e 25,38 mm, respectivamente, em meninas e meninos. O 4D médio foi 25,94 e 26,9mm, respectivamente, em meninas e meninos.

Table 4.14 Comprimentos médios (mm) dos dedos 2D e 4D, por mão e por sexo. Em RN masculinos apresentam-se os comprimentos observados e os comprimentos esperados caso o peso médio à nascença nos RN masculinos fosse igual ao dos RN femininos.

		Mão direita			Mão esquerda			
		Masculino	Masculino		Masculino	Masculino		
		Feminino	(observado)	(esperado)	Feminino	(observado)	(esperado)	
2D	24,71	25,38	25,02		2D	24,30	24,89	24,53
4D	25,94	26,90	26,34		4D	25,62	26,87	26,49

A interpretação destes resultados requer precaução porque os RN masculinos têm um peso médio superior aos RN femininos e o peso está positivamente correlacionado com o comprimento dos dedos. Poderão os dedos dos RN masculinos ser maiores apenas porque todo o corpo é maior? Para investigar o assunto, usou-se análise de regressão linear para determinar o comprimento que os dedos dos RN masculinos teriam caso estes tivessem o mesmo peso médio à nascença que os RN femininos. O processo tem duas etapas. Primeiro, determina-se a equação que relaciona o comprimento de cada dedo com o peso corporal. Segundo, substitui-se nessa equação o peso corporal pretendido e calcula-se o comprimento esperado do dedo para o referido peso. A Tabela 4.14 apresenta os comprimentos esperados dos dedos 2D e 4D dos RN masculinos, constatando-se que os comprimentos médios do 2D e do 4D mantêm-se mais compridos que os dos RN femininos. Em resumo, os rapazes têm dedos mais compridos que as raparigas, mesmo descontando o efeito do seu maior tamanho corporal.

#### 4.4.2 RÁCIO 2D:4D E HORMONAS NO LA

O rácio 2D:4D da mão esquerda dos **RN femininos** está significativamente correlacionado com a testosterona no líquido amniótico ( $r = -0,30$ ,  $p = 0,03$ ): valores de testosterona mais elevados no LA correspondem a rácios mais baixos (Tabela 4.15, Figura 4.29). A associação observada na mão esquerda mantém-se significativa, mesmo quando se controla o efeito das idades gestacionais (na altura da colheita de LA e no parto), o peso do RN e a idade da mãe. Qualitativamente, observa-se a mesma associação entre o rácio 2D:4D da mão direita dos RN femininos e a testosterona no LA, embora nesta mão não seja estatisticamente significativa ( $r = -0,22$ ;  $p = 0,09$ ), contudo, quando se controla o efeito do 2D:4D da mãe a associação é significativa (coef. correlação parcial  $r = -0,34$ ;  $p = 0,02$ ).

Nos **RN masculinos**, não se encontrou associação estatisticamente significativa entre testosterona no LA e o rácio 2D:4D, embora a associação seja positiva na mão direita ( $r = 0,14$ ,  $p = 0,35$ ).

Tabela 4.15 Coeficientes de correlação ( $r$ ) entre a testosterona no LA e no plasma materno e o rácio 2D:4D nos RN, por mão e por sexo. Apresentam-se também os  $p$ -values destas correlações.

		Mão direita		Mão esquerda	
		mascul	femini	mascul	femini
Testost no LA	$r$	0,14	-0,24	0,004	-0,3
	$n$	49	51	46	51
	$p$	0,35	0,09	0,98	0.03*
Testost no plasma	$r$	-0,2	-0.24	-0,11	-0,1
	$n$	52	54	52	54
	$p$	0,15	0,09	0,44	0,49

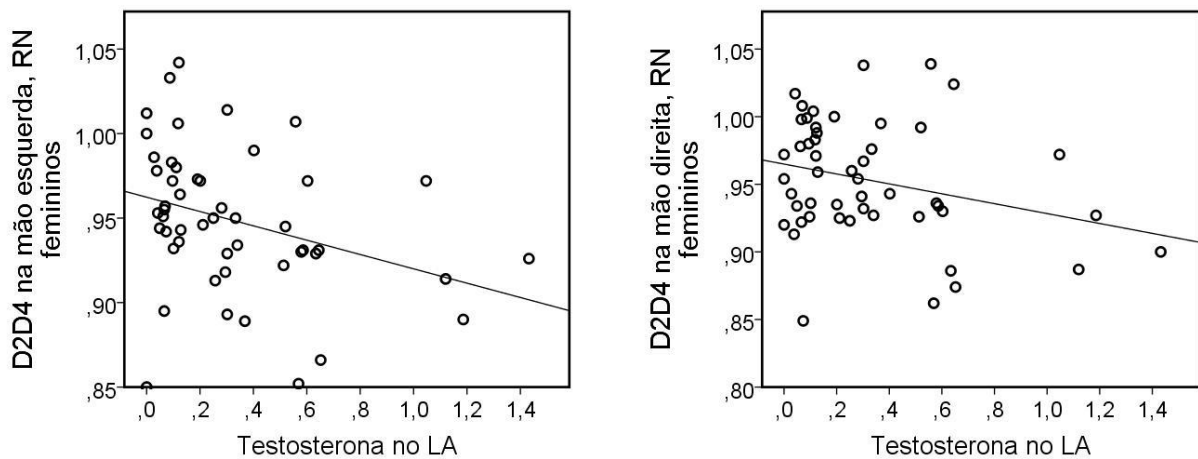


Figura 4.29 Associação negativa entre a testosterona no LA (nmol/L) e o rácio 2D:4D na mão esquerda ( $r^2 = 0,10$ ;  $b = -0,042$ ;  $p = 0,03$ ) e na mão direita ( $r^2 = 0,05$ ;  $b = -0,037$ ;  $p = 0,09$ ) dos RN femininos.

A testosterona no plasma materno está negativamente correlacionada com os quatro rácios 2D:4D dos recém-nascidos, ou seja, quando a testosterona no plasma das mães é mais elevada, o rácio 2D:4D no RN tende a ser mais baixo. Isto observa-se em ambos os sexos e em ambas as mãos, embora nenhuma destas associações seja estatisticamente significativa (Tabela 4.15). A não-significância estatística pode-se dever a insuficiente tamanho da amostra quando os dados são analisados por sexo. Quando os dois sexos são reunidos ( $n = 106$ ), a associação entre testosterona no plasma e o rácio 2D:4D torna-se significativa na mão direita (direita:  $r = -0,2$ ,  $p = 0,04$ ; esquerda:  $r = -0,04$ ,  $p = 0,72$ ).

Resultados homólogos foram encontrados em relação ao peso dos RNs ao nascer e testosterona no plasma das mães, mas não no LA (Sec. 4.2.9, Peso do RN ao nascer), ou seja, o peso dos RNs mostrou correlação, embora fraca, com a testosterona no plasma, de sinal contrário nos dois sexos: correlação positiva nos masculinos e negativa nos femininos.

A testosterona no plasma das mães também se correlaciona significativamente com o rácio 2D:4D das próprias mães em ambas as mãos (direita:  $r = -0,36$ ,  $p = 0,011$ ; esquerda:  $r = -0,37$ ,  $p = 0,008$ ) quando o feto é masculino, mas não quando o feto é feminino (direita:  $r = 0,16$ ,  $p = 0,26$ ; esquerda:  $r = 0,06$ ,  $p = 0,65$ ).

Examinou-se em seguida a proporção de variabilidade no rácio dos RNs (por sexo e mão) explicada pelos rácios das mães e pela testosterona, utilizando um modelo de regressão hierárquica onde o 2D:4D do RN é a variável dependente e as variáveis independentes são o rácio 2D:4D da mãe (duas variáveis: esquerda e direita), a testosterona no LA e a testosterona no plasma materno.

Tabela 4.16. Resultados de regressões hierárquicas em 3 passos, onde o 2D4D dos RN é a variável dependente, por sexo e por mão. As variáveis independentes foram, no 1º passo apenas os 2D:4D da mãe (as duas mãos), no 2º passo adicionou-se a testosterona do LA (LA-T), no passo 3 adicionou-se a testosterona do plasma (plasma T).  $R^2$  é a proporção de variação do 2D4D do RN que é explicada a cada passo do modelo;  $p$  é a significância do incremento  $\Delta R^2$  de variação explicada a cada passo, assinalando-se \* se  $p < 0.05$  e \*\* se  $p < 0.01$ .

RN masculinos	$R^2$	$\Delta R^2$	$p$	RN femininos	$R^2$	$\Delta R^2$	$p$
<i>RN mão direita</i>				<i>RN mão direita</i>			
mãe 2D4D	0.063	0.063	0.23	mãe 2D4D	0.153	0.153	0.02*
mãe 2D4D + LA-T	0.074	0.011	0.46	mãe 2D4D + LA-T	0.249	0.096	0.02*
mãe 2D4D + LA-T + plasma T	0.084	0.009	0.51	mãe 2D4D + LA-T + plasma T	0.305	0.056	0.06
<i>RN mão esquerda</i>				<i>RN mão esquerda</i>			
mãe 2D4D	0.011	0.011	0.77	mãe 2D4D	0.135	0.135	0.03*
mãe 2D4D + LA-T	0.012	0.001	0.85	mãe 2D4D + LA-T	0.253	0.118	0.01**
mãe 2D4D + LA-T + plasma T	0.012	0.000	0.99	mãe 2D4D + LA-T + plasma T	0.261	0.008	0.48

O modelo com o 2D:4D da mãe e a testosterona no LA explica uma proporção significativa da variabilidade do rácio 2D:4D dos RNs femininos ( $R^2=24,9\%$  e  $25,3\%$ , respectivamente mãos direita e esquerda).

A Tabela 4.16 indica que, nos RNs femininos, o rácio materno por si só é muito significativo, explicando  $15,3\%$  e  $13,5\%$  da variação, respectivamente, na mão direita e esquerda, mas a adição da testosterona no LA ao modelo, melhora-o significativamente, com uma percentagem adicional de  $9,6\%$  e  $11,8\%$ , respectivamente, para as mãos direita e esquerda, sempre com um coeficiente de regressão negativo. A adição da testosterona no plasma não melhora significativamente o modelo. Globalmente, os rácios da mãe e a testosterona, explicam uns significativos  $30,5\%$  e  $26,1\%$  da variabilidade dos 2D4D dos RN femininos (Tabela 4.16).

Quanto aos RNs masculinos, o modelo não explica a variabilidade observada no rácio 2D:4D de nenhuma das mãos. A variação explicada pelo modelo no seu todo foi de  $8,4\%$  e  $1,2\%$ , respectivamente para a mão direita e esquerda do RN (Tabela 4.16), e nenhum é significativo.

Em relação ao cortisol, não foi encontrada qualquer associação significativa entre a concentração no LA e/ou no plasma com os rácios 2D:4D, quer por sexo, quer por mão, quer globalmente, quer por hora do dia (manhã-tarde). O nível de ansiedade, estado ou traço, também não mostrou associação consistente com o 2D:4D no RN, ou na mãe (Tabela 4.17).

Tabela 4.17 Coeficientes de correlação e respectivos p-values entre os rácios 2D:4D dos RNs (em colunas), os scores de ansiedade (STAI S e STAI T) e as concentrações de cortisol no plasma e LA das respectivas mães.

		Mão esquerda		Mão direita	
		mascul	femini	mascul	femini
STAI-S	<i>r</i>	-0,06	-0,09	0,28*	-0,04
	<i>p</i>	0,68	0,51	0,05	0,8
STAI-T	<i>r</i>	0,13	0,06	-0,20	-0,07
	<i>p</i>	0,38	0,70	0,89	0,62
Cortisol plasma	<i>r</i>	0,12	0,13	-0,19	0,04
	<i>p</i>	0,41	0,37	0,20	0,80
Cortisol LA	<i>r</i>	0,05	0,14	0,01	0,04
	<i>p</i>	0,73	0,34	0,97	0,79

## **5. Discussão**

---

**Partes dos artigos Ventura et al 2013a, Ventura et al 2012, Ventura e Gomes 2010, foram usados neste capítulo**

## 5. Discussão

Este estudo centra-se no efeito de uma intervenção relaxante de curta duração (30 min) em grávidas colocadas na eminência de um episódio clínico invasivo e reconhecidamente ansiogénico – a amniocentese. O planeamento experimental foi concebido para investigar os principais objectivos estabelecidos à partida para o estudo, mas permitiu também reunir dados conducentes à investigação de temas subjacentes, nomeadamente as associações entre variáveis biológicas e psicológicas da grávida e do próprio feto. Além disso, a avaliação das grávidas no parto, permitiu alongar longitudinalmente o estudo, associando as características das grávidas estudadas às características do recém-nascido (RN), nomeadamente o rácio digital 2D:4D, um potencial indicador antropométrico da exposição aos níveis de testosterona *in útero*, permitindo estudar possíveis influências ambientais da mãe e do feto.

Esta discussão inicia-se por uma curta comparação entre a amostra usada neste estudo e a população-base de parturientes do HDE, importante para avaliar a representatividade dos resultados. A discussão prossegue para o tema central da tese – o efeito psicológico e hormonal da intervenção relaxante sobre os três grupos de grávidas intervencionadas, sendo feita uma discussão crítica sobre as associações estabelecidas entre variáveis biológicas e psicológicas ao longo do capítulo de resultados. Na parte final, são discutidas as características antropométricas do rácio digital do recém-nascido e da mãe e suas correlações com o ambiente hormonal.

### 5.1 Amostra do estudo *versus* População Base de grávidas do HDE

Recrutaram-se 188 mulheres grávidas com idade média de 37,7 anos (min-máx: 27-44 anos) e idade gestacional média de 17,3 semanas (min-máx: 15,7-23,6) que iam fazer amniocentese. As participantes foram distribuídas aleatoriamente por três grupos de intervenção, com o objectivo de avaliar e comparar o impacto de intervenções relaxantes não farmacológicas, visando respostas psicológicas e hormonais a um stressor ansiogénico durante a gravidez. Das 188 grávidas, quatro foram posteriormente excluídas por patologia ou estudo incompleto. A idade média neste estudo foi superior à idade média da população base (PB) de parturientes do HDE, a qual foi de 30,4 anos de acordo com o estudo de Ventura e Gomes (2010) para o período 2005-2008 (Tabela 5.1). A diferença (37,7 para 30,4 anos) é estatisticamente significativa (t-teste,  $p < 0,001$ ) e era expectável que assim fosse porque, em larga medida, a realização de amniocentese foi justificada pela idade avançada da grávida.



A percentagem de nulíparas foi de 79% na PB e apenas 39% neste estudo, o que sugere ser a partir dos 30 anos de idade que a maioria das mulheres decide ter filhos. Quanto ao tipo de parto, houve 36,3% de cesarianas *versus* 31,9% respectivamente neste estudo e na PB (Tabela 5.1). A percentagem mais elevada de cesarianas é em parte explicada pela elevada percentagem (41,7%) nas participantes cujo parto ocorreu fora do HDE, maioritariamente em hospitais privados, onde a maioria dos nascimentos foi via abdominal. Possivelmente a idade média mais avançada também poderia associar-se a maior risco na gravidez e no parto, contribuindo para a diferença. A nacionalidade foi portuguesa em 93,5% das participantes deste estudo, enquanto na PB havia apenas 78,1% portuguesas. Esta diferença é explicada, por um lado, pela idade média (IM) das emigrantes (havia 21,9% de estrangeiras na PB), que são habitualmente mais jovens e foram excluídas do estudo as que não dominavam o português. Por outro lado, várias culturas e religiões não aceitam a interrupção de gravidez, nem a realização de diagnóstico pré-natal, pelo que as portuguesas estão mais representadas na presente amostra.

Tabela 5.1. Comparação entre a amostra (n=184) usada neste estudo e a população base (PB) do HDE descrita em Ventura e Gomes (2010) (n=8293, entre 2005 e 2008). Indicam-se médias (dp) e percentagens de variáveis descritivas.

	mães				Recém-nascidos (RN)			
	Idade média (anos)	Nacionalidade portuguesa	Nulíparas	Cesarianas	Idade gestacional (semanas)	Sexo (M:F)	Peso médio (g) Mascul	Femini
Amostra deste estudo	37,7 (2,9)	93,5%	39%	36,3%	39,3 (1,2)	0,51:0,49	3395	3136
População do HDE (PB)	30,4 (5,5)	78,1%	79%	31,9%	38,8 (1,79)	0,52:0,48	3286	3156

As percentagens de RN masculinos e femininos neste estudo e na PB são muito parecidas (Tabela 5.1) e a sua diferença sem significado estatístico. O peso médio à nascença em partos simples foi na PB 3286g para os rapazes, em média mais 130g do que as raparigas. Na presente amostra o peso médio nos rapazes foi 3395g e nas raparigas menos 259g. Contudo, a diferença entre os pesos médios nas duas amostras, quando comparados por sexo, não é significativa (rapazes: t-teste=1,53, p=0,13; raparigas: t-teste=0,28, p=0,78).

A diferença da idade gestacional média em partos simples - 38,8 semanas na PB *versus* 39,3 semanas neste estudo - mostrou também ser estatisticamente significativa (p<0,001). Na presente amostra apenas 3,3% dos RN nasceram prematuros (inclui RN excluídos), em parte

devido aos critérios de exclusão usados na composição inicial, e pelas diferenças populacionais evidenciadas na incidência de parto pré-termo na PB, que era mais elevada em grávidas indianas e de países africanos de língua oficial portuguesa (respectivamente 8,3% e 8,8%), ausentes nesta amostra.

Tudo indica portanto que este estudo é representativo da população de grávidas portuguesas que utiliza o HDE, com mais de 30 anos de idade, em idade gestacional das 16 às 23 semanas, bem como dos seus recém-nascidos quando o parto é simples e não existe patologia materna ou fetal posteriormente detectada.

## **5.2 Efeito psicológico, hormonal e fisiológico da intervenção**

As intervenções complementares e alternativas, como a massagem ou o yoga, são as escolhas mais comuns para as grávidas que pretendem contrariar a ansiedade e simultaneamente evitar os efeitos acessórios da administração de fármacos. Neste trabalho comparou-se o impacto de intervenções relaxantes de curta duração (30 min) sobre a ansiedade, os níveis de cortisol e de testosterona, e sobre parâmetros vitais de mulheres grávidas na eminência de realizarem amniocentese. A experiência decorreu num ambiente fácil de implementar em cenários clínicos ou em uso doméstico.

### *5.2.1 Ansiedade*

O valor médio do estado de ansiedade (STAI-S) avaliado pelo inventário de Spielberger à chegada foi 43,4 (dp=11), evidenciando uma situação ansiogénica (Tabela 4.1). Contudo, o traço médio de ansiedade (STAI-T) à chegada foi de 35,4 (dp=8,9), mostrando que as mulheres não eram inerentemente ansiosas, mas confirmando que a eminência de amniocentese é percebida como um acontecimento ansiogénico pela grávida (Ng et al 2004, Sarkar et al 2006). Sarkar et al (2006) também encontraram este tipo de resultados mas de forma ainda mais acentuada, pois as grávidas que aguardavam amniocentese apresentaram um STAI-S médio de 49,8 (dp=14), comparativamente a um grupo controlo às 20 semanas que aguardava ecografia com STAI-S de 36,1 (dp=10,2), evidenciando ser a amniocentese indutora de ansiedade/*stress* agudo. A diferença entre o valor de Sarkar et al (2006) e o deste estudo pode dever-se a características populacionais e/ou ao enquadramento hospitalar do exame. Este estudo teve

lugar numa pequena maternidade, onde a relação com as grávidas era muito personalizada, limitando possivelmente níveis mais extremos de ansiedade.

Após a intervenção de meia hora, o valor médio do STAI-S baixou de 43,4 para 37,3 ( $dp= 11,5$ ) (Tabela 4.2A) e esta descida foi estatisticamente significativa ( $p=0,004$ ).

Os resultados deste estudo corroboram a hipótese de que um período de relaxamento de apenas 30 min pode ter efeitos positivos na saúde psicológica da mulher sujeita a situações ansiogénicas. Os resultados do estado de ansiedade diminuíram em todos os grupos (música, revista, sala de espera) após a intervenção. A descida média do STAI-S (Tabela 4.5) foi de -6,1 pontos, sendo a música (-8,2) mais eficaz que a revista (-5,7) ou a sala de espera (-4,1) a reduzir a auto percepção de ansiedade. As diferenças entre os grupos foram significativas ( $p=0,004$ ), indicando que o tipo de intervenção usada não é indiferente. Os ganhos foram significativamente maiores quando a pausa ocorreu com audição de música, por oposição a estar simplesmente sentada na sala ( $p=0,003$ , Tabela 4.8). Os ganhos foram também particularmente bons nas mulheres mais ansiosas, sendo estas as que mais beneficiaram da intervenção (Figura 4.23). Neste estudo observou-se uma tendência para serem as parturientes mais jovens e de menor idade gestacional a mostrarem mais ansiedade, mas também mais benefício com o relaxamento (Figs 4.6, 4.7).

A média inicial do STAI-T (35,4) desceu após a intervenção (34,0) mas, ao contrário do STAI-S, a diferença foi pequena e não mostrou significado estatístico. Na verdade, o “traço” pretende avaliar uma característica estável do indivíduo e não devia variar muito com um curto relaxamento, enquanto o “estado” avalia o momento e é mutável com as circunstâncias. Neste sentido, os resultados obtidos conferem credibilidade aos inquéritos usados.

### 5.2.2 Hormonas

Além de uma melhoria no bem-estar psicológico avaliado pelo índice de ansiedade, as intervenções relaxantes promoveram também uma descida média no cortisol e na testosterona plasmática. Em média, o cortisol desceu 36,5 nmol/L, tendo a maior descida ocorrido mais uma vez no grupo que ouviu música (-60 nmol/L). A análise estatística mostrou que as diferenças entre grupos não são atribuíveis ao acaso ( $p<0,004$ , Tabela 4.7) e, quer a música, quer a leitura de revistas, foram muito mais eficazes do que esperar sentado na sala (Tabela 4.8).

A maior descida no **cortisol** do plasma teve sempre lugar de manhã, em todos os grupos de intervenção (Figura 4.25 esquerda). Foi maior nas mulheres que ouviram música, não havendo diferenças significativas entre a forma de audição, ou o tipo de música escolhida. À tarde, a mudança média do cortisol foi menor, não se encontrando diferenças significativas entre os grupos, mesmo controlando para a hora do dia. É possível que 30 min de relaxamento possam ser insuficientes para reduzir o cortisol à tarde e/ou que o nível de cortisol à tarde seja já muito baixo para permitir descidas relevantes com o relaxamento.

Globalmente, as três variáveis mais importantes para a variação do cortisol nos 30 min de intervenção foram, por esta ordem, o nível inicial de cortisol, o grupo de intervenção, e a hora do dia. A primeira e a terceira variável eram expectáveis, tendo em conta por um lado, que um nível de cortisol mais alto deve ter maior potencial para descida, por outro o ritmo circadiano do cortisol, mas este estudo mostra de forma única o efeito da segunda variável – a diferente eficácia entre grupos de intervenção relativamente ao cortisol.

A associação entre *stress*, ansiedade e secreção hormonal (corticosterona/cortisol) está bem estabelecida no modelo animal (Weinstock 2001, Matthews 2002, Amiel-Tison et al 2004). Essa associação mostrou ter profundas influências no desenvolvimento e subsequente função do eixo HHSR, com conseqüente aumento da susceptibilidade a problemas metabólicos e neuro-comportamentais que, por sua vez, podem ser transmitidos a mais de uma geração descendente por mecanismos epigenéticos (Matthews and Phillips 2012). Apesar de ser mais difícil levar a cabo estudos em humanos, nas últimas décadas tem sido encontrada evidência que acompanha os resultados em animais (Van den Bergh et al 2005). Ainda assim, a associação entre o cortisol e os efeitos do *stress* psicológico em humanos requer mais compreensão. Petraglia et al (2001) e Obel et al (2005) estiveram entre os primeiros a estudar a associação entre auto-avaliação de *stress* psicológico crónico e cortisol durante a gravidez. Sarkar et al (2006) foram os primeiros a investigar a resposta do cortisol à ansiedade induzida pela realização eminente de amniocentese, mas usaram apenas amostras de manhã e não avaliaram intervenções relaxantes. Teixeira et al (2005) e Field et al (2009) examinaram o impacto de intervenções de relaxamento, mas não tão rápidas e pouco dispendiosas como as aqui utilizadas. Neste estudo apresentamos evidência de que apenas 30 minutos são suficientes para baixar os níveis de cortisol, pelo que relaxar, principalmente através da música, tem um efeito imediato e mensurável.

Também o nível médio de **testosterona** no plasma desceu nos grupos de intervenção com revista (-0,11 nmol/L) e com música (-0,08 nmol/L), tendo subido na sala de espera (0,06 nmol/L). A diferença entre a revista e a sala de espera foi significativa ( $p < 0,014$ ) e além dos grupos de intervenção, os principais determinantes da variação de testosterona foram a variação de cortisol ( $r = 0,46$ ,  $p < 0,001$ ) e o nível inicial da própria testosterona ( $r = -1,8$ ,  $p = 0,014$ ) (Figura 4.26). A este propósito, um resultado inesperado foi a correlação encontrada entre a *variação* do cortisol e a *variação* da testosterona, ambas subsequentes à intervenção. O assunto será retomado na secção 5.3.

Não foram efectuadas medições hormonais no LA *antes* da intervenção, todas as amniocenteses foram feitas *após* os 30 min. As concentrações médias foram comparadas entre grupos de intervenção (Tabelas 4.9-4.10), não se tendo registado diferenças significativas entre elas, nem para o cortisol nem para a testosterona. Note-se, contudo, que o tempo decorrido entre o fim da intervenção e a amniocentese foi em média de 28 min ( $dp = 18$  min) tendo-se situado, em 50% dos casos, entre 17 e 34 min. Uma intervenção de 30 min, seguida de um intervalo tão curto, dificilmente teria tradução mensurável nas hormonas do LA, por isso a ausência de diferenças entre os níveis hormonais dos grupos de intervenção, foi considerada pouco relevante. Além disso, as concentrações hormonais no LA são muito baixas e diferenças entre os grupos possivelmente só seriam detectadas em amostras muito maiores.

### 5.2.3 Intervenção com música

Ouvir música pode aumentar o relaxamento por providenciar distração de um anterior foco de atenção, como uma situação de *stress* ou dor física (Davis et al 1999, Evans 2002, Kwekkeboom 2003). A distração pode combinar-se com o efeito fisiológico da audição de música (para uma revisão ver Schneck and Berger 2006, Krout 2007) sendo benéfico para o ouvinte por potenciar o processo de relaxamento. Os resultados indicam que música relaxante, em particular, é eficaz a reduzir o nível de ansiedade e de cortisol no plasma. As mulheres mais ansiosas parecem ser as que mais beneficiam. Outros investigadores encontraram resultados semelhantes no que respeita ao bem-estar psicológico associado à música, mas não estudaram a relação com o cortisol e a testosterona (Browning 2000, Sidorenko 2000, Chang et Chen 2005, Chang et al 2008).

Para aplicações práticas, é importante considerar o tipo de música utilizado (Elliot et al 2011). A música percebida como relaxante por uma pessoa pode não o ser por outra. É sabido que a idade, a cultura e o *status* socioeconómico afectam a forma como as pessoas respondem à música (Dunn 2004, Krout 2007). Neste estudo as participantes escolheram o que

consideraram ser o tipo de música mais relaxante para elas, seguindo as indicações de estudos prévios sobre a eficácia da música seleccionada pelo paciente em períodos peri-operatórios (Kulkarni et al 2002, Clark et al 2006, Mitchell and MacDonald 2006) ou por grávidas de risco em repouso no leito hospitalar (Yang et al 2009). Em geral, a música escolhida pelo próprio tende a ser a mais eficaz a reduzir a ansiedade e a ter mais benefícios para o próprio (Siedliecki and Good 2006, Pelletier 2004, Krout 2007). A duração do período de relaxamento também é importante. Foi escolhido um período de 30 min principalmente porque seria fácil de implementar como parte dos procedimentos de rotina num cenário clínico. Uma exposição demasiado prolongada, num ambiente não familiar, também poderia ter efeitos contraproducentes na ansiedade da mulher. No entanto, para uso doméstico, a duração da intervenção, bem como a selecção musical, podem possivelmente ser deixadas à escolha da mulher, dentro de limites razoáveis. O uso de auscultadores, eventualmente vantajosos como forma de isolar ruídos externos, não mostrou diferenças significativas na redução da ansiedade ou dos valores hormonais, comparativamente à audição de música ambiente através de colunas e o mesmo foi encontrado por outros autores noutra contexto, onde também não se evidenciaram vantagens (Tsivian et al 2012).

Antes de prosseguir com uma discussão sectorial mais detalhada das variáveis psicológicas e hormonais, uma palavra ainda sobre o impacto da intervenção sobre o pulso, a PA da mãe, e a frequência cardíaca do feto.

#### *5.2.4 Pulso, Pressão Arterial e Frequência Cardíaca Fetal*

Pulso e pressão arterial (PA) são parâmetros fisiológicos influenciáveis pelo estado de ansiedade, pois a sua variação traduz sensibilidade vascular à adrenalina e noradrenalina, que actuam nos receptores  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2 adrenérgicos presentes nas paredes dos vasos e músculo cardíaco (Tsigos et al 2002). Essa variação depende da interacção do sistema nervoso simpático e parassimpático, os dois ramos do sistema nervoso autónomo que medeiam a resposta rápida ao *stress* nos órgãos periféricos principalmente em situações agudas (Charmandari et al 2005).

O **pulso** da mãe à chegada foi em média 84,8 ppm (min-máx: 61-114) e mostrou correlação significativa com o estado (não com o traço) de ansiedade ( $p=0,01$ ) e com a PA sistólica ( $p=0,001$ ). Após os 30 min de intervenção baixou em todos os grupos, para uma média geral de 79,5, descida esta que foi significativa ( $p<0,001$ ). A descida registada nos três grupos de intervenção não mostrou diferenças significativas entre si ( $p=0,44$ , Tabela 4.7). STAI-S e a PA

sistólica explicam uns significativos 9% da variabilidade no pulso ( $p < 0,001$ ). Já a descida do pulso teve correlação significativa com a descida da PA diastólica ( $p = 0,04$ ), mas não com a descida da sistólica ( $p = 0,13$ ), ao contrário do pulso inicial, o que sugere mecanismos subjacentes um pouco diferentes.

A **pressão arterial** corresponde à pressão exercida pelo sangue circulante nas paredes dos vasos e depende de múltiplos factores, sendo os mais relevantes o *output* ou força de bombeamento cardíaco e a resistência vascular periférica. Em cada batimento cardíaco, a PA varia entre um mínimo, a diastólica, que corresponde ao período de relaxamento em que o coração recebe o sangue proveniente dos outros órgãos, e um máximo ou pressão sistólica, que corresponde à contracção cardíaca que ejecta sangue no sistema arterial. A descida do pulso e da pressão diastólica neste estudo correlacionaram-se significativamente, o que não surpreende pois ambos estão dependentes principalmente da actividade e *output* cardíaco, e respondem à variação da actividade simpática e parassimpática no miocárdio (Davis et al 2012). A variação da sistólica é influenciada também pela resistência vascular sistémica, e aqui apresentou um padrão mais lábil, com maiores oscilações entre os valores mínimos e máximos, que a pressão diastólica e o pulso (Tabela 4.6).

Tanto a PA sistólica como a diastólica desceram em todos os grupos de intervenção. Em média, a maior descida foi na revista (-9,8 e -4,3, respectivamente na PA sistólica e diastólica), seguida da música. As descidas nestas duas intervenções foram significativamente maiores que as descidas na sala de espera (Tabelas 4.6 e 4.8). O grupo da sala de espera, por sua vez, não desceu significativamente a PA, mas foi o que desceu mais o pulso (Tabela 4.6). Os mecanismos envolvidos na descida do pulso e da PA são complexos, alguns ainda mal conhecidos e, neste estudo, parecem diferir um pouco nos três grupos de intervenção. A música tem um papel estimulante nalgumas funções (Bernardi et al 2006), possivelmente via ramo simpático do SNA e pela interacção entre córtex pré-frontal e sistema límbico (Krout 2007). A revista teve mais eficácia em baixar estes parâmetros vitais e também na descida da testosterona, o que poderá dever-se a este aspecto. A presença do marido ou outro acompanhante durante o período de espera parece activar o ramo parassimpático do SNA com conseqüente redução do pulso, já que os outros dois grupos requeriam isolamento social. A ocitocina, que está associada a relações continuadas e estáveis e, portanto, à estabilidade emocional e equilíbrio homeostático, poderá ter também algum papel neste processo (Lund et al 2002, Moberg 2000), mas não foi avaliada no presente estudo.

As grávidas com mais elevada frequência cardíaca, traduzida no pulso, mais elevada PA inicial e mais elevado STAI-S, foram as que apresentaram também as maiores descidas. Estes dados apontam um padrão de maior amplitude nas respostas ao *stress* pelas participantes mais ansiosas: quem tem maiores subidas, tem maiores descidas e *vice-versa*, um padrão que vai ao encontro do que já se conhece bem no modelo animal para as respostas hormonais, principalmente dos glucocorticóides (Weinstock 2005).

A variação da **frequência cardíaca fetal** (FCF) em resposta a estímulos vibroacústicos e à voz da mãe é considerada sinal de cognição fetal, pois evidencia atenção e orientação (Kisilevsky et Hains 2010, Sandman et al 1997). Alguns estudos realizados em fetos humanos mostraram que a partir do segundo trimestre estes conseguem detectar estimulação proveniente do meio extra-uterino e pelo fim do terceiro trimestre, conseguem discriminar e aprender associações (Sandman 2010), sendo por isso considerada a variação da FCF um indicador cognitivo. Neste estudo, a FCF média foi 148 bpm antes da amniocentese e não se alterou após o exame. Procurou-se detectar associação aos grupos de intervenção, nomeadamente quando a música foi ouvida no ambiente através de colunas por oposição a auscultadores, mas a variação da FCF não diferiu estatisticamente entre os grupos de intervenção e não mostrou associações com outras variáveis além da idade gestacional, não sendo indicativa, nesta fase, de reacção fetal relativamente à mãe. Na verdade, apenas gravidezes acima das 24 semanas evidenciaram esses achados mostrando relação com a maturação progressiva do SNC e periférico. Nomeadamente, foi encontrada correlação entre a FCF a partir das 24 semanas e o seu padrão pós-parto até aos dois anos (DiPietro et al 2000). No entanto, o presente estudo cingiu-se ao intervalo das 15,7-23,6 semanas e a frequência cardíaca não foi avaliada no recém-nascido.

### **5.3 Associações entre variáveis psicológicas, hormonais e fisiológicas**

Foram detectadas associações entre as variáveis psicológicas, hormonais e fisiológicas que não é provável terem ocorrido por mera contingência da amostra. A maioria destas associações corrobora resultados semelhantes descritos na literatura, mas algumas foram inesperadas e carecem de investigação que confirme a sua repetibilidade. Houve também um pequeno número de associações relatadas por outros autores e aqui não confirmadas. Todos estes aspectos são discutidos em seguida. A subdivisão em tópicos encerra alguma arbitrariedade, dada a transversalidade fisiologia-endocrinologia-psicologia da maioria dos assuntos.



### 5.3.1 Ansiedade e hormonas

O valor médio do estado de ansiedade (STAI-S) avaliado pelo inventário de Spielberger à chegada foi 43 (dp=11; min-máx: 20-76), evidenciando uma situação ansiogénica, já acima mencionada. Não houve diferenças significativas entre o grupo da manhã e da tarde (43,5 *versus* 43,3;  $p=0,88$ ) (Tabela 4.3). Neste estudo as duas medidas de ansiedade das grávidas, STAI-S e STAI-T estão correlacionadas entre si de forma muito significativa ( $r=0,36$ ,  $p<0,001$ ; Fig. 4.6), o que confere fiabilidade aos inquéritos: as mulheres habitualmente ansiosas tenderam a ser as que atingiram níveis de ansiedade mais elevados ante a eminência da amniocentese.

O **STAI-S** mostrou-se negativamente correlacionado com a idade da grávida ( $r= -0,19$ ,  $p=0,009$ ), sendo as mulheres mais jovens as mais ansiosas (Figura 4.6). Isto pode ser atribuído a múltiplos factores: as mulheres mais jovens realizaram amniocentese geralmente por alterações no rastreio bioquímico, mas também teriam menor experiência em ambiente hospitalar, maior insegurança e maiores expectativas. A paridade (Tabela 4.4) também se mostrou negativamente correlacionada com o STAI-S, o que corrobora esta hipótese. A idade gestacional mostrou igualmente correlação com o estado de ansiedade, de forma fraca mas significativa, uma vez que as grávidas de menor idade gestacional tenderam a ter um STAI-S mais elevado ( $r= -0,16$ ,  $p=0,03$ ) (Figura 4.7). Outros autores (Glynn et al 2004) também constataram que os acontecimentos na vida são percebidos como de maior *stress* no primeiro trimestre de gravidez do que mais tarde, e nessa altura a resposta do eixo HHSR também se mostra mais atenuada. Sarkar et al (2006) não encontraram associação da percepção de ansiedade com a idade gestacional, mas este estudo mostra que, em média, as mulheres mais jovens e com menor idade gestacional foram as mais ansiosas. Uma possível explicação pode ser os níveis elevados de cortisol encontrados nas idades gestacionais mais avançadas (Figura 4.9) promoverem uma reorientação para níveis mais baixos do sistema adrenocorticotrópico, levando a uma resposta atenuada do eixo HHSR (Glynn et al 2001, 2004) e a uma percepção de ansiedade também mais atenuada. Ou pode corresponder a uma maior tranquilização em relação à gravidez à medida que esta vai decorrendo sem problemas de maior.

O **cortisol** materno e o STAI-S estão correlacionados de forma significativa à tarde ( $p = 0,05$ ), mas não de manhã ( $p = 0,71$ ) (Figura 4.11). O STAI-S foi o preditor mais importante dos níveis de cortisol à tarde e a análise de regressão mostrou que uma unidade adicional da escala de ansiedade-estado à tarde corresponde, em média, a mais 3,88 nmol/L no cortisol do plasma. O valor médio do cortisol de manhã nas mais ansiosas (STAI-S >40) foi 639,5 (dp=216, n=54) e

nas menos ansiosas 605,5 (dp=223, n=47). O valor médio do cortisol à tarde nas mais ansiosas foi 545,1 (dp=227, n=42) e nas menos ansiosas 498,3 (dp=167, n=41). Como vemos, a diferença entre as mais e menos ansiosas de manhã é  $\approx 35$ nmol/L e à tarde  $\approx 47$ nmol/L, ou seja, à tarde há maior amplitude no nível de cortisol no plasma entre as mais e as menos ansiosas. Este resultado corrobora a correlação encontrada à noite por Obel et al (2005) entre cortisol na saliva em mulheres grávidas e acontecimentos stressantes. Aparentemente a resposta do cortisol à tarde e à noite é mais sensível a acontecimentos indutores de *stress*, possivelmente porque os valores basais de manhã são muito elevados e apenas acontecimentos dramáticos serão capazes de os elevar mais. A aparente ausência de resposta do cortisol ao *stress* de manhã foi também reportada para mulheres não grávidas por Powell et al (2002). O relaxamento, pelo contrário, mostrou maior resposta do cortisol de manhã (Secção 5.3.2).

Na tarde, verificou-se ainda maior significância da correlação entre STAI-S e cortisol materno abaixo das 17 sem de gestação ( $r=0,30$  em  $\leq 17$ sem,  $p=0,01$ ,  $n=69$ ;  $r=0,20$   $>17$  sem,  $p=0,29$ ,  $n=28$ ), o que também foi encontrado por Sarkar et al (2006). Estes autores encontraram uma correlação linear modesta entre o estado de ansiedade e o cortisol no plasma apenas até às 17 semanas, o que possivelmente está relacionado com o hipercortisolismo fisiológico progressivo da grávida. Esta correlação fraca terá um questionável significado clínico, mas que ainda assim não deve ser ignorado num contexto de múltiplos desafios ansiogénicos como é muitas vezes a vida em sociedade. Em ambos os estudos não se encontrou correlação entre o traço de ansiedade e os níveis de cortisol (Tabela 5.3).

### 5.3.2 Cortisol no plasma e no LA

A evolução do **cortisol no plasma** materno entre as 8:30 e as 15h (Figura 4.10), enquadrou-se no interessante ritmo circadiano do cortisol há muito reconhecido na literatura (Weitzman et al 1971, Veldhuis et al 1989, Dickmeis 2009), com valores elevados no início da manhã que baixam progressivamente até às 12h, sobem ligeiramente à tarde e voltam a descer até valores mínimos durante a noite (Weitzman et al 1971). Na amostra deste estudo o cortisol foi significativamente mais elevado de manhã do que à tarde ( $p=0,001$ ) e seguiu o padrão descrito até às 15h, a última hora desta amostra.

O cortisol no plasma, medido antes do relaxamento, teve um valor médio de 578 nmol/L e apresentou tendência para aumentar com o aumento do tempo de gestação (Figura 4.9), não interferindo a hora do dia nesta correlação. O coeficiente de regressão linear mostrou que, em média, 1 semana de gestação adicional correspondeu a mais 33,3 nmol/L de cortisol no

plasma. A correlação positiva entre cortisol plasmático e tempo de gestação é bem conhecida e está em concordância com resultados de autores anteriores (Sarkar et al 2006).

Neste estudo encontrou-se evidência de que existe ligação entre o cortisol no plasma materno e o **cortisol no LA**: o cortisol no LA tende a aumentar quando o cortisol no plasma materno aumenta e *vice-versa*. Estão positiva e significativamente correlacionados em todas as gamas de idade gestacional disponíveis (Figura 4.14). Além disso, a evolução diurna do cortisol no LA apresenta um padrão semelhante ao padrão observado no plasma da mãe, embora menos pronunciado (Figura 4.15), com descida ao longo da manhã e retoma depois das 12h. Como o padrão circadiano do cortisol plasmático só se estabelece após o nascimento (secção 1.2.1.1), esta tendência no LA deve traduzir influência dos níveis maternos.

O presente estudo corrobora ainda resultados de outros autores que têm relatado a existência de uma correlação positiva entre o cortisol no plasma materno e no LA, indicativo da existência de transporte através da placenta (Gitau et al 2001, Glover et al 2009). A regulação da composição do LA em humanos não é ainda bem conhecida, especialmente na fase inicial e intermédia da gestação, uma vez que a maior parte da literatura tem-se focado nas gravidezes de termo (Ohana et al 1996). Existe, no entanto, evidência de que a exposição do LA a glucocorticoides de origem materna está limitada pela actividade da enzima placentária 11 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase (11 $\beta$  HSD-2) tipo 2, a qual actua como uma barreira funcional à passagem do cortisol (Osinki 1960, Sarkar et al 2007b). A correlação entre cortisol plasmático e no LA aparenta ser independente do nível do estado de ansiedade porque neste estudo se mantém significativa em mulheres ansiosas e não ansiosas (Figura 4.16). Glover et al (2009) encontraram a mesma associação nas ansiosas, mas não nas não-ansiosas. Para explicar esta diferença, os autores sugerem existir uma acção mediadora do estado emocional da mãe sobre a função enzimática placentar. Na verdade, um estudo recente em placentas de grávidas a aguardar amniocentese mostrou associação entre ansiedade materna e redução em 30% na expressão da 11 $\beta$ HSD tipo 2, levando o feto a maior exposição a glucocorticoides (O'Donnell et al 2012) e corroborando os achados de Glover et al. É possível que no presente estudo uma amostra maior, ou com participantes com índices de ansiedade mais elevados, tivesse detectado essa diferente associação.

### 5.3.3 Testosterona no plasma e no LA

Os resultados mostraram que a **testosterona no plasma** tende a diminuir com o aumento da idade da mulher ( $r=-0,31$ ,  $p<0,001$ ) e que existe uma tendência para valores ligeiramente mais

baixos ao fim da manhã (11-12h) (Figura 4.12). Aceita-se normalmente que os níveis de androgénios, testosterona incluída, reduzem-se substancialmente nas mulheres com a aproximação da menopausa, por volta dos 50 anos e nos anos subsequentes (Meston 1997, Reckelhoff et al 2005). Embora as grávidas deste estudo estivessem entre os 26 e 43 anos de idade, já foi possível capturar o decréscimo da testosterona no plasma (mas não no LA), independentemente do sexo do feto. Na verdade, não se encontrou diferença entre grávidas com fetos masculinos e femininos no que respeita à concentração de testosterona no plasma. Estes resultados eram esperados, são conhecidos em roedores e em humanos, e foram já descritos por outros autores (Viau 2002, Sanders et al 2002, Sarkar et al 2007a).

A testosterona no plasma das grávidas com fetos femininos mostrou-se significativa e positivamente correlacionada com a idade gestacional até às 18 semanas, coincidindo com pico pré-natal de testosterona. Quando é abrangida toda a gama de idades gestacionais, o efeito perde-se. Nas grávidas com fetos masculinos a correlação entre testosterona plasmática e idade gestacional foi fraca em todas as idades gestacionais e não-significativa abaixo de 18 semanas (Figura 4.13). É possível que estes resultados traduzam o envolvimento dos receptores de androgénio e da acção da aromatase placentar, enzima que promove a metabolização da testosterona em estradiol (Sperof and Fritz 2007). É possível especular que esta enzima apresente diferenças na expressão e actividade em gravidezes de fetos femininos e masculinos, à semelhança do que parece acontecer com a 11- $\beta$ HSD tipo2. Na verdade, a testosterona no plasma das grávidas mostrou associação com o peso ao nascer de sinal inverso em fetos masculinos e femininos (ver adiante Secção 5.3.6).

No feto, a testosterona tem acção determinante na organização das estruturas cerebrais e do sistema cardiovascular, e a sua acção contribui para as diferenças entre géneros e para o dimorfismo sexual de indicadores antropométricos como o rácio digital. Estes efeitos ocorrem em períodos críticos do desenvolvimento em que os tecidos podem ser modificados por influências do ambiente e estão mais sensíveis aos androgénios (Vermeersch et al 2008). Após o nascimento, estas variações (adquiridas in útero) na organização das estruturas têm mostrado relação com aspectos comportamentais e com risco variável para doença cardiovascular (Sanders et al 2002, Barker et al 2002), o que revela a importância do ambiente hormonal em que o feto se desenvolve. Após o nascimento, as hormonas esteróides têm essencialmente um efeito activador sobre os receptores de androgénios e estrogénios, que se sobrepõe ao efeito organizacional da fase pré-natal.

Neste estudo, a concentração de **testosterona no LA** foi, em média, 36% da concentração do plasma materno e foi significativamente mais alta em fetos masculinos (0,82 nmol/L) do que em femininos (0,32 nmol/L) (Figura 4.17). Estes resultados são muito parecidos com os de Sarkar et al (2007a), que referem 36-40% para a concentração no LA, relativamente à materna, e concentrações de 0,85 *versus* 0,28 nmol/L no LA, respectivamente, masculino e feminino (Tabela 5.3). Não se encontrou evidência de que a concentração de testosterona no LA esteja associada à concentração no plasma materno - as correlações entre ambos foram  $r=0,01$  e  $0,18$  em fetos masculinos e femininos, e não têm significado estatístico. Provavelmente, a principal fonte de testosterona no LA é o próprio feto. Outros investigadores (Sarkar et al 2007a) também não encontraram correlação quando o feto é feminino, mas encontraram uma correlação positiva significativa quando o feto é masculino ( $r=0,24$ ,  $p<0,001$ ), reconhecendo contudo que o mecanismo subjacente ao seu achado é desconhecido. Apesar de não encontrarmos correlação entre o nível de testosterona no plasma da mãe e no LA, encontramos correlações do primeiro com aspectos morfológicos do feto ao nascer que serão discutidas adiante (Secção 5.3.6).

#### 5.3.4 Cortisol versus testosterona

A concentração de cortisol no **plasma** das mulheres à chegada apresentou uma correlação significativa, embora fraca, com a concentração de testosterona no plasma ( $r=0,18$ ,  $p=0,02$ ) (Figura 4.9). Esta correlação é mais forte nas mães com fetos femininos ( $r=0,33$ ,  $p=0,002$ ) e não-significativa nas mães com fetos masculinos ( $r=0,02$ ,  $p=0,89$ ). Quando se separa a amostra por hora do dia, verificamos que de manhã a correlação é muito significativa nas primeiras horas ( $r=0,43$ ,  $p=0,003$ ), mas mantém ausência de associação nas grávidas com fetos masculinos.

Este resultado é curioso e contrasta com o estudo de Sarkar et al (2008) que não encontraram associação entre cortisol e testosterona no plasma das mães. Gitau et al (2005), pelo contrário, encontraram correlação positiva entre cortisol e testosterona, mas no plasma dos fetos, nos dois sexos. Estes autores consideram, por isso, que no feto a resposta ao *stress* envolve aumento do cortisol e da testosterona. Ora, no feto, a testosterona é produzida parcialmente na supra-renal (SR), enquanto no adulto é principalmente nas gónadas, mas na mulher também há produção na SR e na pele (Turner and Wass 2009). Uma vez que a concentração de testosterona é muito mais estável ao longo do dia que a de cortisol, é provável que a variação no resultado observado neste estudo se deva à variação diurna do cortisol.

A correlação positiva que encontramos com mais significado estatístico nas mães com fetos femininos pode eventualmente resultar da maior produção de testosterona nas SR quando os fetos são femininos. Essa produção é desencadeada pela acção da ACTH libertada pela hipófise, que por sua vez actua em receptores do córtex supra-renal (SR) e estimula a produção local de cortisol e de testosterona (Challis et al 2001). É possível também que a LH, que estimula a produção de testosterona nos ovários e testículos, seja mais elevada nas gravidezes com fetos femininos (Viau 2002). Sabe-se que, ao contrário do *stress* prolongado, que suprime a função gonadal, o *stress* agudo em humanos e roedores desencadeia uma pequena subida na LH, geralmente de curta duração, a qual se associa a subida também de testosterona (Rivier and Rivest 1991), o que favorece a nossa hipótese. É possível ainda que o sistema enzimático da aromatase na placenta, que faz a conversão da testosterona em estradiol (Speroff and Fritz 2005), tenha actividade diferente em gravidezes com o feto feminino e masculino, permitindo maiores níveis de testosterona no plasma materno na primeira. Todas estas considerações são, no entanto, meramente especulativas e requerem validação em estudos futuros. Lembra-se, no entanto, que uma outra enzima placentar, a 11 $\beta$ HSD tipo 2, mostrou maior actividade em placentas de mulheres com fetos femininos, apesar da expressão genética nos dois sexos ser idêntica (O'Donnell et al 2012). Em roedores, também se verificou que tanto os níveis basais de corticosterona (equivalente ao cortisol nos humanos) como os níveis de resposta, são sensíveis aos níveis maternos de *stress* ante-natal, principalmente nas fêmeas e a reactividade do eixo HHSR em ratos submetidos a *stress* pré-natal foi modificada de forma diferente nos dois sexos, sendo o efeito especialmente relevante nas fêmeas (Weinstock et al 1992, Weinstock 2007). Estes achados realçam diferenças entre sexos na produção hormonal e função enzimática e ajudam a explicar os nossos resultados.

Os valores médios da testosterona no plasma de grávidas com fetos masculinos e femininos não mostraram diferenças significativas (t teste=0,026; p=0,98), tal como os valores de cortisol (t teste=0,031; p=0,97). Encontrámos, no entanto, uma forte correlação ( $r=0,53$ ,  $p<0,001$ ) entre a **variação da testosterona e a variação do cortisol** após os 30 minutos de intervenção (Figura 4.26): as mulheres com maiores descidas de cortisol foram tendencialmente as que apresentaram também maiores descidas de testosterona. Tanto quanto é do nosso conhecimento, este estudo é o primeiro a encontrar uma correlação entre *variação* de cortisol e de testosterona no seguimento de uma intervenção relaxante. O *stress* agudo em humanos e roedores, como já foi dito, desencadeia uma curta subida de LH, a qual se associa à subida de testosterona. Esta subida poderá resultar de uma alteração no volume plasmático induzida pelo sistema nervoso autónomo (SNA), através dos ramos simpático e parassimpático, em

resposta ao *stress*, e de uma redução da taxa de *clearance* associada a uma redução do fluxo sanguíneo hepático (Cumming et al 1987). É possível que um mecanismo inverso ao descrito para a subida da testosterona no *stress* agudo se verifique em resposta ao relaxamento agudo, ou seja, na sequência de alterações hemodinâmicas traduzidas na descida do pulso e da pressão arterial, poderá haver uma rápida descida de LH, que deixa de actuar nos ovários, e também da ACTH, que actua na SR, levando à redução da produção de testosterona (Turner and Wass 2009). A forte correlação na variação do cortisol e da testosterona poderia ser assim explicada, embora este resultado necessite de ser confirmado em estudos futuros.

No **líquido amniótico**, não foi encontrada associação entre as concentrações de testosterona e de cortisol, nem quando se examinaram os sexos em conjunto nem separadamente. O mesmo aconteceu quando os dados foram examinados por hora do dia (manhã/tarde). Sarkar et al (2007a), pelo contrário, reportam uma correlação positiva em ambos os sexos. A Figura 5.1 confronta graficamente a relação entre as duas variáveis neste estudo e em Sarkar et al (2007a). Observa-se uma grande dispersão dos pontos nos gráficos e, mesmo em Sarkar et al, o cortisol explica apenas 9% da variabilidade observada na testosterona. A amostra do presente estudo é consideravelmente menor (menos 105 mulheres) e, num contexto de tamanha variabilidade, esse facto poderá eventualmente explicar a nossa falha em detectar uma associação estatisticamente significativa. Contudo, a observação dos dados em bruto (não logaritmizados) (Figura 5.2) por sexo, sugere que a relação entre as duas hormonas no LA pode ser mais complexa do que uma simples relação linear traduz. Os gráficos sugerem que em valores baixos ou médios de cortisol (< 30nmol/L), a testosterona pode tomar uma gama muito larga de valores (0 a ~2 nmol/L em masculinos, 0 a ~1,5 nmol/L em femininos). À medida que a concentração de cortisol aumenta, essa gama de variação aparenta tornar-se cada vez mais limitada superiormente, de forma gradual. As linhas a tracejado na Figura 5.2, que apresenta dados desta amostra, procuram representar a diminuição do nível superior permitido à testosterona, à medida que o cortisol aumenta, e foram colocadas nas figuras por inspecção visual.

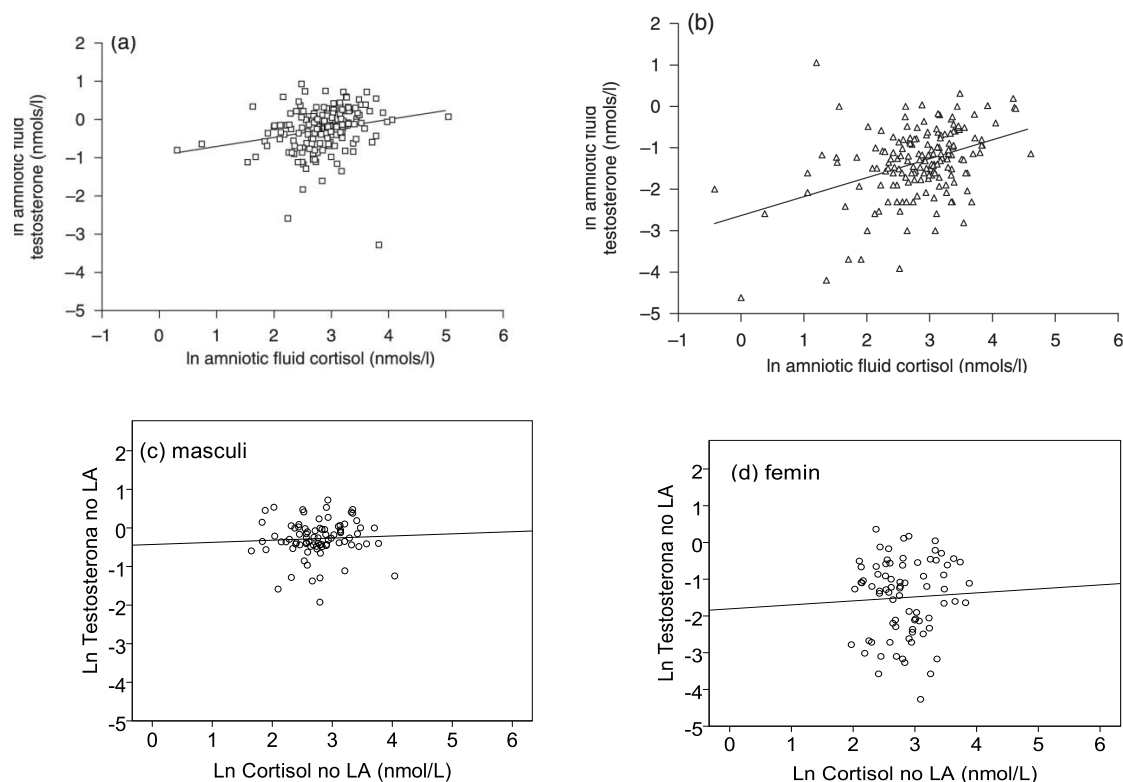


Figura 5.1. Relação entre as concentrações de cortisol (abcissas) e de testosterona (ordenadas) no LA, em fetos masculinos (esquerda) e femininos (direita), com dados logaritmizados. Topo: em Sarkar et al (2007a); Fundo: neste estudo. Os parâmetros dos gráficos e das rectas são: (a)  $r^2=0,09$ ;  $b=0,24$ ;  $n=133$ ;  $p<0,001$ ; (b)  $r^2=0,09$ ;  $b=0,46$ ;  $n=131$ ;  $p<0,001$ ; (c)  $r^2=0,003$ ;  $b=0,06$ ;  $n=83$ ;  $p=0,63$ ; (d)  $r^2=0,003$ ;  $b=0,13$ ;  $n=76$ ;  $p=0,65$ .

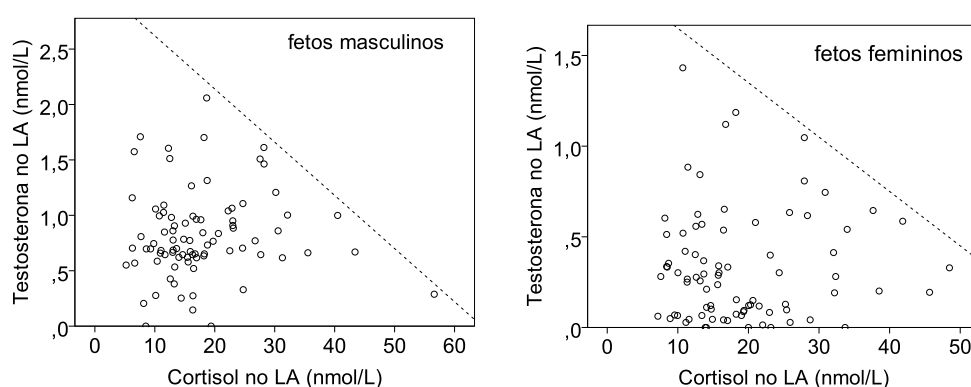


Figura 5.2. Relação entre as concentrações de cortisol e de testosterona no LA, por sexo do feto neste estudo. As linhas tracejadas foram desenhadas sobre os gráficos por inspecção visual. Fórmula das rectas: masculinos  $Test=3,1-0,048xcortisol$ ; femininos  $Test=1,95-0,03xcortisol$ .



O facto de a relação descrita nesta amostra surgir em ambos os sexos, confere-lhe mais credibilidade. É difícil julgar se os dados de Sarkar et al (2007a) respeitam a mesma relação, uma vez que os autores apresentam apenas dados logaritmizados, mas a inspecção das suas figuras (Figura 5.1, topo), não exclui essa hipótese. Tanto quanto é do meu conhecimento, não existe uma explicação bem estabelecida para a relação entre as concentrações das duas hormonas no LA, mas é pouco provável que seja adequadamente descrita por uma simples relação linear.

### 5.3.5 Idade gestacional na amniocentese e no parto

As amniocenteses foram efectuadas maioritariamente às 17 semanas (percentis 25-75%: 16,6-17,6) de gestação, pelo que os níveis de testosterona do LA na amostra são representativos dos níveis de cada feto maioritariamente no pico de produção de androgénios. As gónadas do feto iniciam a produção de testosterona pelas 7 semanas e entre as 8 e as 14 ocorre o primeiro pico pré-natal, associado aos efeitos de androgenização no feto, prolongando-se a produção até às 18 semanas (McIntyre 2006). Como já foi dito (Secção 5.3.3), a testosterona no plasma das grávidas (mas não no LA) mostrou correlação significativa com a idade gestacional dos fetos do sexo feminino na **amniocentese**, quando se consideraram apenas idades gestacionais inferiores a 18 semanas. Este resultado sugere diferenças na interacção do feto com a mãe consoante a diferenciação sexual (Secção 5.3.3 e 5.3.4).

Na altura do **parto** a idade gestacional média foi 39,3 semanas, sem diferenças significativas entre os sexos ( $p=0,32$ ) (Tabela 4.2A). Não se detectou evidência de associação entre a idade gestacional no parto e o estado ou o traço de **ansiedade** das mães, avaliado aquando da amniocentese: STAI-S ( $p=0,09$ ) e STAI-T ( $p=0,21$ ), respectivamente (Figura 4.20), nem globalmente, nem por hora do dia (de manhã ou de tarde). Seria expectável que as grávidas com traço mais elevado mostrassem alguma tendência para tempo de gestação mais curto, mas tal não aconteceu. Sendo a idade gestacional no parto pouco variável nesta amostra (35-41 semanas) e o STAI-T menos variável que o STAI-S, é possível que a detecção duma correlação negativa entre as duas exigisse uma amostra bastante maior. Outra explicação possível é os critérios de exclusão terem eliminado grandemente os partos de baixa idade gestacional.

Já o **cortisol** no plasma em mulheres mais ansiosas (STAI-S  $>40$ ) de manhã ( $n=53$ ) mostrou uma correlação negativa significativa com a idade gestacional no parto ( $r=-0,38$ ,  $p=0,01$ ), ou

seja, quanto mais elevado o cortisol mais curta a gestação (Figura 4.21). À tarde não se encontrou esta correlação. Diferentes formas de *stress* na grávida traduzem-se por níveis mais elevados de cortisol, aparentemente capazes de interagir com a neurofisiologia da gravidez e parto facilitando a prematuridade e baixo peso ao nascer (Rich-Edwards et al 2005) e vários estudos populacionais têm-no evidenciado (Copper et al 1996, Eskenazi et al 2007, Zhu et al 2010). Foi também encontrada associação com a idade gestacional no parto nas situações de maior resposta do cortisol ao acordar (CAR) e de menor atenuação dessa resposta (Buss et al 2009b). No presente estudo encontrou-se associação com a idade gestacional na altura do parto e o cortisol no plasma apenas no grupo das mulheres mais ansiosas de manhã, não se encontrando associação com as concentrações de cortisol à tarde, possivelmente porque os níveis são mais baixos e só uma amostra maior poria em evidência essa associação.

Os níveis de **testosterona** avaliados à data da amniocentese, quer no plasma, quer no LA, também não mostraram associação com a idade gestacional, possivelmente porque os critérios de exclusão podem ter eliminado grandemente os partos com idades gestacionais mais baixas, tornando assim difícil capturar alguma associação fraca e/ou porque o tamanho da amostra pode ser insuficiente para detectar esta associação.

### *5.3.6 Idade gestacional no parto e Peso ao nascer*

Vimos que no grupo da manhã a **idade gestacional** no parto está nesta amostra negativamente associada à concentração de cortisol no plasma das grávidas: as mulheres com nível de cortisol mais elevado tendem a ter partos mais cedo (Figura 4.21). Existe também correlação negativa entre o cortisol no LA e a idade gestacional, mas não é significativa, nem de manhã nem de tarde (Figura 4.21). Sabe-se que níveis elevados de cortisol actuam na placenta levando ao aumento da CRH produzida localmente com consequente elevação das prostaglandinas que actuam no miométrio e no colo, levando ao parto (Secção 1.5.3). Glover et al (2009) constataram que a correlação entre o cortisol do plasma das mães e do LA foi maior quando a ansiedade estado e traço na sua amostra foi também maior, sugerindo que a ansiedade materna tem repercussões nos níveis hormonais do LA. A tendência encontrada neste estudo vai ao encontro destes resultados, mas a correlação entre cortisol no plasma e no LA não aumentou com a ansiedade. Encontrou-se associação positiva em todos os quartis de ansiedade e não só no das mais ansiosas. Não se detectou evidência de associação entre o estado ou o traço de ansiedade das mães, e a idade gestacional no parto (Figura 4.20). No entanto, o STAI-S e o cortisol plasmático mostraram correlação positiva e níveis mais altos de cortisol associaram-se a menor idade gestacional no parto. Isto sugere associação entre

estados de ansiedade e menor tempo de gestação, o que foi encontrado em estudos populacionais com grandes amostras (Zhu et al 2010, Eskenazi et al 2007, Morken et al 2006, Copper et al 1996), mas neste estudo a amostra é pequena para evidenciar este efeito.

Houve 51% de recém-nascidos (RN) masculinos e 49% femininos e os rapazes pesaram em média significativamente mais do que as raparigas ( $p < 0.001$ ) (Figura 4.22). Em ambos os sexos o **peso do RN** mostrou correlação negativa, embora fraca, com a idade da mãe (Secção 4.2.9). Verifica-se que as mães mais idosas têm tendência a ter bebês mais leves, embora esta tendência não tenha atingido significado estatístico, e têm também tendência a ter de forma significativa menor concentração de testosterona no plasma (Figura 4.12). O peso dos RNs no parto mostrou correlação fraca com a concentração de testosterona no plasma materno, mas de sinal contrário nos dois sexos. Nos fetos masculinos o peso tende a aumentar com o aumento de testosterona enquanto nos femininos tende a diminuir (Figura 4.22).

Por outro lado, encontrou-se de manhã correlação negativa entre os níveis de cortisol no plasma das mães e o peso ao nascer em RNs masculinos e femininos, embora sem significado estatístico. À tarde não se encontrou associação, embora também haja uma ligeira tendência negativa nos rapazes. Jones et al (2006) encontraram resultados idênticos, reforçando a existência de diferenças entre sexos na interação do cortisol com o feto durante a gravidez. Também outros autores, com amostras maiores (Goedhart et al 2010), encontraram variação com a hora do dia na associação (negativa) entre o nível de cortisol na mãe às 13 semanas e o peso ao nascer do RN, e ainda associação positiva entre cortisol e risco de nascer leve para a idade gestacional (LIG).

Verificámos que no plasma das mães, à medida que a concentração de cortisol aumenta, a testosterona tende a aumentar (Figura 4.9, direita). Quando analisamos a relação das hormonas no plasma com o peso ao nascer verificamos que, nos fetos femininos, no quartil mais elevado de cortisol a testosterona também é mais alta. Esta elevação na concentração da testosterona nas mães parece ser suficiente para reduzir o peso dos seus fetos femininos (Figura 4.22 fundo-direita). Nos rapazes, acontece algo semelhante, mas a maior concentração da testosterona no plasma das mães no quartil de cortisol mais elevado, não se associa a menor peso nos rapazes, pelo contrário, há uma associação positiva com o peso, embora menos marcada que nos fetos femininos (Secção 4.2.9, Figura 4.22 fundo-esquerda). Nos rapazes, possivelmente apenas subidas muito grandes e mantidas de testosterona na mãe deverão associar-se a redução do peso, tal como acontece nas raparigas com subidas menores. As razões para estas diferenças não são claras, poderão relacionar-se com diferenças na

expressão e activação dos receptores de androgénios, sendo uma explicação possível para as diferenças entre sexos e aspectos morfológicos encontrados neste estudo. A testosterona no LA não mostrou correlação com o peso ao nascer.

As tendências ou correlações modestas e que não apresentaram significado estatístico, mas que vão ao encontro do que é conhecido da literatura, poderão resultar de uma potência insuficiente da amostra, mas também de um mecanismo complexo que envolve a mãe, a placenta e o feto na regulação hormonal e nas determinantes encontradas ao nascer (Torricelli et al 2009). Esse mecanismo poderá envolver aspectos epigenéticos das enzimas placentares que medeiam o ambiente hormonal entre a mãe e o feto, como a 11 $\beta$ HSD tipo2 (O'Donnell et al 2012). Globalmente, níveis de cortisol mais elevados têm mostrado associação com menor peso ao nascer e parecem influenciar o crescimento in útero (Bolten et al 2011).

As agressões sobre o feto durante a gravidez têm consequências diversas dependentes da idade gestacional em que ocorrem, da intensidade e da duração, variando também com o sexo do feto, quer em resultados comportamentais quer em características biométricas (Glover and Hill 2012, Weinstock 2007). O presente estudo mostra diferenças entre sexos de forma inequívoca quanto às interações dos fetos com o ambiente hormonal da mãe, quanto ao ambiente hormonal dos próprios fetos no líquido amniótico e sugere que também na placenta haverá diferenças de funcionalidade entre sexos, principalmente no que diz respeito aos sistemas enzimáticos que medeiam a passagem de glucocorticóides e androgénios entre os dois compartimentos, materno e fetal.

### *5.3.7 Pressão arterial, Índice de Massa Corporal (IMC) e Pulso*

Neste estudo, a PA sistólica à chegada (média 108, dp=13, 71-157) apresentou alguns valores superiores a 140 mmHg, apesar de nenhuma das grávidas incluídas estar classificada como hipertensa nem sob medicação. A PA diastólica (média 60, dp=8,5; 33-78) apresentou valores médios baixos e nenhum superior a 80 mmHg.

Em gravidezes que decorreram sem complicações hipertensivas foi encontrada uma relação directa entre a pressão arterial da mãe e o peso ao nascer do recém-nascido (nomeadamente com a percentagem de gordura) (Dionísio 2011, pp.191-197). No presente estudo verificou-se que o peso ao nascer dos recém-nascidos femininos se correlacionou negativamente com a PA sistólica: mães com PA mais elevada tiveram RNs de menor peso ( $r = -0,24$ ,  $p = 0,02$ ).

A PA sistólica mostrou-se também significativamente correlacionada com o IMC ( $r=0,2$ ,  $p=0,008$ ): as mulheres com mais peso relativo foram tendencialmente as que apresentaram PA sistólica mais elevada. A PA sistólica foi ainda tendencialmente mais elevada nas mulheres com mais idade ( $r=0,16$ ,  $p=0,03$ ). Estas relações eram esperadas e enquadram-se no maior risco para alterações metabólicas e complicações hipertensivas na clínica da gravidez associadas a parturientes mais velhas e com grau variável de obesidade.

Na literatura está também documentada a existência de associação entre hipertensão induzida pela gravidez e o traço de ansiedade (STAI-T) e também a associação da PA com o índice ponderal da mãe avaliado às 24-28 semanas (Poland et al 1986, Van den bergh et al 2005). Neste estudo avaliou-se o STAI-T e o IMC (inicial e na altura da amniocentese, maioritariamente às 17 sem) tendo-se verificado que, embora as mulheres de maior peso relativo tendessem a ter traço de ansiedade mais alto, a força de associação entre estas variáveis não é significativa ( $r=0,11$   $p=0,17$ ; STAI-T inicial).

O índice de massa corporal (IMC) médio antes da gestação foi 24,2 ( $dp=4$ ; min-máx: 17,6-43,7). Este valor está de acordo com o encontrado nas populações férteis, tendo as mulheres com  $IMC > 30$  ou  $< 20$ , menor probabilidade de engravidar (Taylor 2003). A amniocentese foi realizada maioritariamente no início do segundo trimestre, altura em que habitualmente ainda não há grande aumento ponderal na gravidez e as grávidas tinham em geral IMC adequado, com 1 ponto adicional relativamente ao IMC médio antes da gravidez (média: 25,2;  $dp=4$ ; min-máx: 18,4-41,4). Apesar da simplicidade, o IMC é um indicador preciso e de fácil utilização que mostra se o indivíduo está abaixo, acima ou no peso normal (Tabela 5.2). Durante a gravidez, a fórmula tradicional ( $\text{peso}/(\text{altura})^2$ ) não é válida para comparações com as referências da população geral, mas ainda assim dá-nos alguma informação útil sobre o estado nutricional da grávida.

Tabela 5.2- Classificação do índice IMC (WHO 2012)

IMC	Classificação
< 18,5	Abaixo do peso
18,6 - 24,9	Saudável
25 - 29,9	Peso em excesso
30 - 34,9	Obesidade grau I
35 - 39,9	Obesidade grau II (severa)
$\geq 40$	Obesidade grau III (mórbida)

Tal como Goedhart et al (2010), verificámos que o IMC da grávida, quer avaliado antes da gestação quer na altura da amniocentese, apresentou uma correlação negativa com o cortisol ( $r=-0,17$ ,  $p=0,02$ ), ou seja, grávidas com maior nível de cortisol no plasma tendem a ter menos peso. Estes resultados vão ao encontro de outros dados já conhecidos, por exemplo a maior resistência à insulina em mulheres com maior IMC e a associação à redução do peso corporal na presença de níveis elevados de cortisol, por sua vez resultantes da activação continuada do eixo HHSR (Charmandari et al 2005).

Neste estudo não se encontrou associação entre o IMC da grávida antes da concepção ou na altura da amniocentese (respectivamente,  $n=149$  e  $n=178$ ) e o peso ao nascer dos recém-nascidos. No entanto, um estudo populacional na Noruega ( $n\approx 60.000$ ) encontrou associação positiva entre o peso ao nascer e o IMC da mãe antes de engravidar em todas as seis categorias da classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), e também com o aumento ponderal da mãe durante a gravidez (Koepp et al 2012). Aparentemente esta situação poderá resultar de uma menor sensibilidade à insulina nas grávidas com IMC mais alto, resultante de maiores níveis de *Insulin-like growth-factor 2* (IGF2), enzima libertada pelo feto no sangue materno e que lhe permite dispor de níveis mais altos de glucose (Dionísio 2011, pp.200-201).

A variação da frequência cardíaca fetal (FCF) neste estudo não mostrou correlações com a variação de outras variáveis da mãe, como a PA, o pulso e as hormonas no plasma. Estudos anteriores mostraram que o estado emocional agudo da mãe pode influenciar o padrão de frequência cardíaca do seu feto (Monk et al 2000), mas este estudo teve apenas uma medição da FCF antes e outra depois da amniocentese e dificilmente detectaria alguma correlação com a mãe (Secção 5.2.4).

#### **5.4 Rácio digital 2D:4D**

A amostra de 106 pares de mãe-filho não apresentou diferença estatisticamente significativa relativamente à amostra original ( $n=184$ ) (Tabela 4.1), pelo que foi considerada representativa desta última. O conhecimento do rácio digital, um indicador antropométrico dimórfico facilmente acessível, levanta a possibilidade de detecção precoce de riscos acrescidos no indivíduo para diversas situações como doenças do sistema imunitário, alterações

cardiovasculares ou susceptibilidade oncológica (Manning 2011), o que lhe confere grande interesse.

#### 5.4.1 Nos recém-nascidos (RNs)

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o dimorfismo sexual no rácio 2D:4D já está presente na altura do nascimento, confirmando relatos prévios baseados em dados de fetos mortos que apresentaram evidência de dimorfismo a partir das 14 semanas de gestação (Gallis et al 2010). Como se esperava, o rácio foi menor em RNs masculinos que em femininos (Tabela 4.11). Esta diferença entre os sexos ao nascer sugere que houve acção da testosterona pré-natal. À semelhança do que outros autores encontraram (Manning et al 1998, McIntyre et al 2005), verificou-se que a diferença é subtil e que existe grande sobreposição na distribuição do 2D:4D dos dois sexos (Figura 4.28). Estudos prévios em crianças dos 3 meses a um ano não encontraram diferenças entre sexos com significado estatístico no 2D:4D da mão esquerda medido a partir de radiografias (McIntyre et al 2005), sendo possivelmente a componente óssea dos dedos a que mais se desenvolve após o nascimento sob a acção das hormonas sexuais nos receptores de androgénios e estrogénios (Zheng and Cohn 2011).

Tem existido na literatura alguma polémica sobre se a exposição pré-natal aos androgénios, *de per se*, é suficiente para explicar as diferenças sexuais no rácio 2D:4D mais tarde observadas na pré-puberdade e em adultos (McIntyre et al 2006). Como anteriormente exposto, a produção de testosterona compreende três picos perinatais (McIntyre 2006b, Prince 2001), o primeiro a meio da gestação e dois após o nascimento. O pico pré-natal ocorre entre as 14 e as 18 semanas (Reyes et al 1974), embora haja produção desde as 7 semanas, a qual despoleta efeitos androgénicos no feto entre as 7 e as 12. Logo após o parto, a hormona luteinizante (LH) sobe rapidamente, levando à subida da testosterona total algumas horas depois e originando o primeiro pico pós-natal, o qual se pode prolongar por duas semanas (McIntyre 2006, Forest 1990). A testosterona sérica sobe de novo pelos 2 meses após o nascimento (2º pico pós-natal) e mantém-se elevada até aos 4 a 6 meses. Um terceiro pico pós-natal inicia-se na puberdade e continua pela vida adulta. A produção pós-natal é crítica para o normal desenvolvimento da função reprodutiva (Main et al 2006) e as diferenças entre sexos que possam surgir antes da puberdade, como o rácio digital 2D:4D, são normalmente atribuídas aos efeitos da testosterona nos picos pré-natal e pós-natal precoce, sendo o primeiro associado às diferenças sexuais observadas ao nascer (McIntyre 2006). Neste estudo, as medições das mãos dos RNs foram efectuadas, em média, 39h após o parto (50% até 27h; 75% até 45h e 90% até 63h),

---

pelo que é legítimo assumir que as medições traduzem o efeito da testosterona *apenas* pré-natal sobre o desenvolvimento das mãos.

Verificou-se que as diferenças entre sexos foram significativas para a mão esquerda mas não para a direita. Isto contrasta com estudos em indivíduos de idade superior a dois anos, nos quais foi encontrada uma diferença maior no rácio 2D:4D da mão direita do que no da esquerda (Manning et al 2007b, Gobrogge et al 2008, Williams et al 2000). Como se viu, os resultados deste estudo dizem respeito a indivíduos que se encontram apenas sob influência de exposição pré-natal à testosterona. Uma vez que não foi encontrado dimorfismo sexual estatisticamente significativo na mão direita, sugerimos que a exposição pós-natal aos androgénios é especialmente importante para a acentuação desse dimorfismo e para a estabilização do rácio 2D:4D na mão direita. A mão esquerda parece de facto receber maior influência directa dos genes homeobox, mostrando diferenças significativas entre os sexos dos RNs ao nascer. A este propósito, é importante notar que um estudo recente (McIntyre and Alexander 2011) baseado apenas em fotocópia da mão direita de crianças entre os 3 e os 5 meses de idade, também não encontrou diferenças significativas entre sexos no 2D:4D. Também Knickemeyer et al (2011), estudando a estabilização do RD nos primeiros 2 anos de vida, encontrou uma tendência para o dimorfismo em ambas as mãos, porém sem significado estatístico.

A exposição pós-natal à testosterona parece assim ser determinante para o dimorfismo observado mais tarde na vida, principalmente na mão direita e mais nos rapazes, visto que as raparigas mostraram correlação significativa entre as suas mãos direita e esquerda ( $r=0,54$ ,  $p<0,001$ ) e com as mães ( $r=0,6$ ,  $p<0,001$ ), mas os rapazes não. Em roedores, os androgénios e estrogénios regulam de forma diferente o conjunto de genes que controlam a proliferação de condrocitos levando a um crescimento diferente no 4D (4º dedo) em machos e fêmeas. Zheng and Cohn (2011) mostraram que nestes animais a actividade do receptor de androgénio (RA) e do receptor  $\alpha$  de estrogénio (RE- $\alpha$ ) é mais elevada no 4º dedo (4D) que no 2º dedo (2D). A inactivação do RA ou a administração de estrogénios diminui o crescimento do 4D levando a um rácio 2D:4D mais elevado, e a inactivação do RE- $\alpha$  ou a administração de androgénios aumenta o crescimento do 4D, levando a um rácio mais baixo. Estes resultados em animais estão, como vemos, em concordância com o que encontrámos neste nosso estudo em humanos.



Os recém-nascidos masculinos apresentaram em ambas as mãos, em média, dedos mais longos do que os femininos (Tabela 4.14), corroborando a tendência apontada por outros autores baseados em amostras de crianças com 3-5 meses de idade (McIntyre and Alexander 2011). Os dados deste estudo também apoiam anteriores sugestões de que o rácio 2D:4D aumenta desde o nascimento até à vida adulta (McIntyre et al 2005, Trivers et al 2006, Galis et al 2010, McIntyre and Alexander 2011), uma vez que as mães apresentam rácios 2D:4D significativamente maiores do que os seus RNs (Tabela 4.11) em ambas as mãos e ambos os sexos. Tudo indica que os processos de desenvolvimento pós-natal deverão estar envolvidos na determinação do rácio 2D:4D encontrado mais tarde na vida.

#### 5.4.2 Correlações com a mãe

O padrão de correlações do rácio 2D:4D entre os RNs e as mães (Tabela 4.12) indica que os RNs femininos têm maior semelhança com as mães do que os masculinos. A mão direita das raparigas, em particular, correlaciona-se significativamente com ambas as mãos da mãe. Em contraste, não foi encontrada correlação significativa entre o 2D:4D dos RNs rapazes com nenhuma das mãos das mães. Estes resultados parecem concordar com um estudo em gémeos (dos 18 aos 29 anos) (Gobrogge et al 2008) que relata evidência de que existe predominância de factores genéticos sobre factores ambientais na determinação da mão direita das raparigas, mas não dos rapazes. Também verificámos que as mãos direita e esquerda são mais semelhantes entre si nos RNs femininos ( $r=0,54$ ,  $p<0,001$ ) e nas mães ( $r=0,6$ ,  $p<0,001$ ) do que nos RNs masculinos ( $r=0,14$ ,  $p=0,32$ ) (Tabela 4.13). Estes dados, em conjunto, sugerem que o rácio 2D:4D nos RNs masculinos se desvia mais das suas mães do que o rácio dos RNs femininos, eventualmente pela acção da testosterona pré-natal, uma tendência que se pode eventualmente acentuar com a acção dos picos de testosterona pós-natais. Na verdade, o primeiro e segundo pico de testosterona pós-natal, concluídos pelos seis meses de idade, devem ter particular importância para o crescimento dos dedos em ambos os sexos, principalmente o 4D, o que está de acordo com os resultados de Zheng et Cohn (2011) em ratos.

Curiosamente as mães com RNs masculinos mostraram uma tendência para ter 2D:4D menor que as mães com RNs femininos ( $p=0,007$  e  $p=0,14$  para as mãos esquerda e direita, respectivamente) (Tabela 4.11), um efeito também apresentado por Manning et al (2002c). Esta tendência poderá explicar parcialmente o menor 2D:4D na mão esquerda dos rapazes em relação às raparigas nesta amostra, contribuindo para a diferença significativa entre os sexos

no 2D:4D desta mão e evidenciando possíveis aspectos genéticos herdados. Manning et al (2002c) relatou a existência de uma associação negativa entre o 2D:4D dos ascendentes e a proporção de nascimentos de rapazes, independentemente da etnia dos pais e mães. Elevados níveis de testosterona na altura da concepção parecem associar-se a maior proporção de nascimento de rapazes, ou seja, mães com mais testosterona e menor rácio 2D:4D tendem a ter mais filhos do sexo masculino. Esta hipótese tem sido postulada para todos os mamíferos e, aparentemente, sucessivamente confirmada por outros autores (cf. James 1996, 2004 para um sumário).

Não foi encontrada associação entre o traço e o estado de ansiedade da mãe e o rácio digital no RN, nem entre este e as concentrações de cortisol no plasma e no LA (Tabela 4.16). Possivelmente uma amostra maior e com valores mais extremos do traço de ansiedade poderia eventualmente mostrar alguma correlação.

A regressão múltipla mostrou que o 2D:4D da mãe é um preditor significativo do 2D:4D do recém-nascido em ambas as mãos (direita:  $R^2=10\%$ ,  $p=0,006$ ; esquerda:  $R^2=9,2\%$ ,  $p=0,008$ ), depois de controlar para o sexo.

Para investigar até que ponto o sexo do RN afecta as associações encontradas entre, por um lado, os rácios digitais dos RN e, por outro lado, os rácios digitais da mãe e a concentração de testosterona no LA, dividiram-se os RNs em dois grupos, segundo o sexo. Em cada grupo, investigou-se até que ponto o 2D:4D do RN é explicado pelo rácio materno (mão esquerda, mão direita) e pela testosterona no LA.

Verificámos que o 2D:4D da mãe é um preditor significativo do 2D:4D das filhas mas não dos filhos. Nas raparigas, uma parte significativa do rácio pode ainda ser explicado pela testosterona no LA (Tabela 4.16). A percentagem de variabilidade do rácio do RN explicada pelo rácio materno e pela testosterona foi, respectivamente, uns significativos 15,3% e 9,6% na mão direita do RN e 13,5% e 11,8% na mão esquerda, sugerindo uma contribuição equilibrada da genética (materna) e da testosterona para o 2D:4D das raparigas à nascença (Tabela 4.16).

Nos rapazes o modelo de regressão apenas conseguiu explicar 8,4% e 1,2% de variabilidade, respectivamente, nas mãos direita e esquerda, podendo esta falta de correlação resultar da existência de altos níveis de testosterona no ambiente pré-natal do desenvolvimento embrionário masculino durante os períodos críticos de formação dos dedos. A investigação em modelos animais mostrou que o desenvolvimento digital é um processo complexo (Zheng and Cohn 2011) durante o qual a expressão génica é regulada por testosterona e estrogéneos. É

concebível que altos níveis de testosterona possam induzir um nível de variabilidade individual no desenvolvimento digital dos rapazes que rompa qualquer correlação potencial que houvesse com o 2D:4D das suas mães.

Teria interesse avaliar também até que ponto o rácio paterno poderia contribuir para explicar a variabilidade do rácio nos recém-nascidos femininos e masculinos, mas este estudo não contemplou essa variável, o que poderá ser feito em futuros estudos com este coorte.

#### *5.4.3 Correlações com a testosterona*

O dimorfismo sexual à nascença tem sido interpretado como evidência da acção da testosterona pré-natal e esperávamos encontrar níveis elevados de testosterona associados a 2D:4D mais baixos, masculinizados, nos RNs rapazes e nas raparigas (Manning et al 1998). De facto, encontramos correlações negativas fracas entre os níveis de testosterona no plasma da mãe e o 2D:4D em ambas as mãos e em ambos os sexos, mas a nossa amostra (52 rapazes e 54 raparigas) poderá não ter tido potência suficiente para se chegar a resultados com significado estatístico neste domínio. Quanto à testosterona no LA, mostrou de forma mais convincente uma correlação negativa com o 2D:4D de ambas as mãos das raparigas (Tabela 4.15, Figura 4.29), mas nos rapazes não houve correlação. Aparentemente, o nível de testosterona no LA resulta de um processo que decorre relativamente independente da mãe e tem consequências mais sensíveis para os fetos femininos. Brown et al (2002) sugeriram ser possível que, nos fetos masculinos, já normalmente sujeitos a níveis elevados de testosterona no LA (Figura 4.17), os receptores de androgénio estejam em geral saturados e níveis ainda mais elevados de testosterona tenham menos impacto no 2D:4D do que nas raparigas.

Por outro lado, a influência pós-natal da testosterona pode ter especial importância no crescimento dos dedos dos rapazes, fazendo-se sentir progressivamente após o nascimento, com implicações na determinação do dimorfismo sexual do 2D:4D observado por outros investigadores em maiores de 2 anos. De facto, o pico de testosterona que ocorre entre os 2 e os 3 meses após o nascimento está principalmente associado ao desenvolvimento das células de Leydig nos testículos e está dependente da reactivação do eixo hipotálamo-hipófise-testículo (Prince 2001). A teoria da organização-activação (Knickmeyer et al 2006) sugere que, na ausência de hormonas masculinas, o sexo dos mamíferos tende a diferenciar-se por defeito em feminino (Vermeersch et al 2008). Assim, a diferenciação de um rácio digital tipicamente masculino, necessitaria de intensa produção androgénica, ao contrário da diferenciação

feminina, que necessitaria apenas da sua escassa ou ausente produção. Evidentemente, as influências genéticas directas e a contribuição dos estrogénios de origem ovárica poderão também ter influência para o resultado final (Knickmeyer et al 2006). Knickmeyer et al (2011) também estudaram o 2D:4D em recém-nascidos desde as duas semanas de vida até aos 2 anos, encontrando uma tendência para o dimorfismo sexual nos RNs mas sem significado estatístico e concluíram que o 2D:4D é influenciado pela testosterona pós-natal e também pela variação no polimorfismo do receptor de androgénio.

Em resumo, o dimorfismo sexual do rácio 2D:4D, quase exclusivamente estudado em indivíduos de idade superior a 2 anos, tem sido encontrado de forma mais robusta na mão direita do que na esquerda (Manning et al 2007, Williams et al 2000), parecendo a esquerda ser mais afectada por factores genéticos. Os resultados deste estudo, porém, sugerem à nascença um cenário diferente: o dimorfismo sexual é mais forte na mão esquerda do que na direita e as correlações com a testosterona e as mões foram mais fortes nas raparigas, em particular na mão esquerda. Estes resultados não estão em contradição, pelo contrário, mostramos que os factores genéticos de facto são relevantes na mão esquerda, mas a testosterona pós-natal é importante para o completo estabelecimento do dimorfismo no rácio digital em humanos, principalmente pela acção sobre o 4D da mão direita e mais nos rapazes que nas raparigas. A exposição hormonal pré-natal deixa impressa de forma relevante a sua influência no 2D:4D, sugerindo que este rácio pode servir como indicador de alterações endócrinas durante o desenvolvimento, tal como o evidenciam estudos em animais (Zheng et Cohn 2011). Pela sua grande variação individual, não deverá ser usado isoladamente como marcador biológico de risco, mas em conjunto com outros marcadores, poderá ajudar a identificar doenças no adulto com origem na vida intra-uterina.

## **6.Limitações, Contribuição para a Ciência, Conclusões e Perspectivas**

---

## 6.1 Limitações do estudo

Este estudo apresenta algumas limitações que serão em seguida apresentadas com as respectivas explicações.

A amostra em que o estudo se baseia representa apenas grávidas portuguesas, que utilizam o HDE, com idade superior a 30 anos e com idades gestacionais entre as 16 e as 23 semanas, podendo os resultados não ser inteiramente extrapoláveis para outras idades maternas ou idades gestacionais. Apenas foram incluídas gravidezes simples, sem patologia da mãe ou do feto, pelo que os resultados não representam gravidezes gemelares nem gravidezes com patologia.

Por outro lado, os critérios de exclusão utilizados na formação da amostra, retiraram ao estudo valores extremos da idade gestacional e do peso do RN na altura do parto, o que pode ter limitado a detecção de algumas correlações, nomeadamente envolvendo associações hormonais com prematuridade ou baixo peso ao nascer.

O sentimento de conforto e segurança oferecido no ambiente clínico é relevante para o relaxamento, mas pode ter afectado as mulheres de forma diferente nos três grupos, uma vez que as grávidas do grupo da revista e da música relaxaram isoladas de outras utentes do hospital. No que respeita à aplicação prática dos resultados, estes podem não ter validade universal para todos os estilos de vida. Neste estudo, mulheres com diferentes estilos de vida usufruíram durante meia hora uma forma de relaxamento que pode não estar ao seu alcance reproduzir em casa. Ignora-se qual a relevância completa dos resultados encontrados para programas de uso doméstico. A implementação do uso de música relaxante em ambientes clínicos não deveria levantar grandes dificuldades. Sugere-se que possa ser posta em curso numa sala agradável junto à sala onde a amniocentese ou outras técnicas invasivas possam vir a ocorrer. Apesar disso, estes resultados também podem ter limitações para aplicações clínicas, pois a habitual presença de outras utentes do hospital pode ser fonte de perturbação ou distração, embora o uso de auscultadores aqui possa mostrar vantagem.

O estudo teve lugar numa pequena maternidade, onde as grávidas habitualmente se sentiam muito integradas, limitando possivelmente níveis mais extremos de ansiedade reportados por outros autores (Sarkar et al, 2006) em maternidade de maior dimensão.

As amostras foram obtidas apenas até às 15 horas, e poucas nas últimas horas, não se sabendo o que se passa depois dessa hora, nomeadamente em relação aos níveis hormonais. Ainda a propósito de níveis hormonais, note-se que ao contrário das variações encontradas no plasma materno, no líquido amniótico não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos intervencionados. É possível que os 30 min de intervenção tenham sido insuficientes para introduzir variações detectáveis no líquido amniótico. Estas diferenças poderão também levar mais tempo a ocorrer, pois deverão envolver processamentos do próprio feto.

Finalmente, esta amostra foi limitada à população que não apresentava critérios de exclusão. Não sabemos se poderá ter resultados semelhantes em mulheres com patologia médica ou sob medicação, as quais podem por alguma razão fugir à média das respostas das intervenções relaxantes.

## 6.2 Contribuição para a ciência

Apresenta-se pela primeira vez um estudo experimental que combina, simultaneamente, a avaliação de respostas psicológicas e hormonais em grávidas sujeitas a uma intervenção relaxante, facilmente acessível em enquadramento clínico, e seguida de medição dos dedos da mãe e do filho após o nascimento. Investigou-se os efeitos do relaxamento, caracterizaram-se associações entre variáveis de diferente natureza e entre as variações das próprias variáveis. A forte correlação aqui detectada entre a *variação* do cortisol e da testosterona é um resultado inesperado que, a ser confirmado, poderá eventualmente ter implicações práticas para a clínica e para o quotidiano da grávida, pois evidencia os benefícios do relaxamento na redução das duas hormonas. As conclusões relativas ao efeito global e comparado das intervenções tem também aplicações óbvias em contexto clínico e doméstico, numa perspectiva de melhoria do bem-estar da grávida e, indirectamente, do futuro recém-nascido.

Foi feita observação dos rácios digitais 2D:4D entre os dois picos de testosterona perinatal. Esta amostra permitiu pela primeira vez isolar os efeitos pré e pós natais para o desenvolvimento do rácio digital 2D:4D, contribuindo assim para esclarecer a controvérsia relativa ao papel de cada um dos efeitos.

Apresentou-se evidência de que existem diferenças entre sexos no que respeita à forma como o feto interage com o ambiente hormonal, quer materno quer no líquido amniótico traduzindo-se aqui em diferenças antropométricas no 2D:4D; também se reforça a ideia de que a placenta aparenta ter funcionalidades que diferem entre sexos, nomeadamente no que respeita aos sistemas enzimáticos que medeiam a passagem de glucocorticóides e androgénios entre os compartimentos materno e fetal.

Este estudo permite ainda corroborar, ou não, estudos anteriores que avaliaram as mesmas hormonas e as mesmas variáveis de ansiedade em grávidas. Este aspecto não deve ser negligenciado porque existe enorme variabilidade entre indivíduos no que respeita a estas variáveis. Uma vez que as amostras têm sempre dimensão limitada, a potência dos estudos, isto é, a sua capacidade para distinguir associações e/ou diferenças entre grupos é também sempre limitada. Este estudo, com amostras diferentes, permite a validação cruzada de resultados de outros autores e contribui para futuras meta-análises, eventualmente mais potentes que os estudos parciais.

### 6.3 Conclusões

Apresenta-se evidência de que mulheres grávidas beneficiam da prática rotineira de 30 min de relaxamento perante a eminência de um acontecimento indutor de *stress*. O benefício será tanto psicológico como fisiológico e será mais marcado de manhã do que de tarde. As mulheres com maior tendência ansiosa, tipicamente mais jovens e com menor idade gestacional, são as que mais beneficiam. Entre os tipos de intervenção experimentados, todos eles não dispendiosos e fáceis de implementar, a audição de música foi globalmente o mais eficaz para o propósito pretendido. A variação do cortisol e a variação da testosterona estão altamente correlacionadas, e este efeito poderá ser explorado em futuras intervenções relaxantes. É possível conceber programas curtos de relaxamento que conduzam a benefícios para o bem-estar psicológico e para a saúde da grávida, com benefícios adicionais no desfecho da gravidez.

O rácio digital 2D:4D do recém-nascido apresenta, como esperado, características dimórficas, sendo mais baixo em rapazes que em raparigas, mas há grande sobreposição entre os sexos e, isoladamente, não pode ser utilizado como marcador de risco. Os RN masculinos tiveram rácios 2D:4D mais baixos que as raparigas, sugerindo que a testosterona pré-natal teve um



efeito sobre o 2D:4D, e isto foi significativo para a mão esquerda mas não para a direita. Os RN tiveram 2D:4D mais baixos que as suas mães, efeito este independente do sexo e da mão, sugerindo que o 2D:4D aumenta com a idade. O 2D:4D da mãe mostrou correlação positiva com o 2D:4D dos seus filhos (significativa nas raparigas) e houve uma tendência para o 2D:4D se associar negativamente com a testosterona no LA (significativo para as raparigas) e no plasma materno (não significativo). Se associado a outros marcadores biológicos como o peso ao nascer e a circunferência cerebral, entre outros, o 2D:4D poderá ser um parâmetro a valorizar desde cedo, possivelmente no acompanhamento pediátrico. Em ambos os sexos, o rácio 2D:4D aumenta após o nascimento e o dimorfismo sexual observado com base em amostras de crianças com mais de dois anos de idade, é afectado pelo pico pós-natal de testosterona, especialmente no que se refere à mão direita.

Em relação às hipóteses inicialmente formuladas (secção 2.2), concluímos:

H1 – Confirma-se que meia hora de relaxamento é suficiente para baixar os níveis de ansiedade e de cortisol.

H2 – Confirma-se que ouvir música é um relaxante mais eficaz do que ver revistas ou aguardar na sala de espera junto a um familiar, pelo menos no que respeita à ansiedade e ao cortisol plasmático.

H3 - A intervenção destinada a relaxar é mais eficaz de manhã e aparenta ser mais eficaz nas grávidas mais jovens.

H4 - A concentração de cortisol no plasma materno correlaciona-se positivamente com a concentração de cortisol no LA, mas aparentemente não existe associação entre testosterona plasmática e testosterona no LA.

H5 – O rácio digital 2D:4D nos recém-nascidos femininos confirma-se como maior, em média, que o 2D:4D dos masculinos. Porém, a diferença só é significativa para a mão esquerda. Além disso, existe grande sobreposição entre os sexos no dimorfismo sexual do rácio digital.

H6 - Existe correlação entre o rácio digital do recém-nascido e o da mãe em meninas, em particular na mão direita da recém-nascida. O rácio dos rapazes não se correlaciona com o da mãe.

H7 - O RD na mão direita do RN tem correlação com os níveis de testosterona no LA às 16-23 semanas apenas nas meninas.

H8 – Não foi encontrada associação entre níveis de cortisol mais elevados no LA e RD mais baixo no RN.

## 6.4 Perspectivas

Este estudo identifica a música como forma mais eficaz de relaxar grávidas, pelo que seria importante investigar e desenvolver formas mais abrangentes de aplicabilidade clínica de diferentes tipos de música. Em salas de espera onde se encontram várias mulheres, a escolha musical é um assunto que merece ponderação, tendo em conta que a preferência pessoal é importante nos resultados obtidos, como estudos anteriores o demonstraram. Perante diferentes preferências em simultâneo, músicas mais abrangentes ou especificamente estudadas para relaxar, possivelmente seriam as mais indicadas, mas este aspecto carece de investigação em estudos futuros mais focados na comparação de preferências. A música de ressonância, especialmente concebida para terapias médicas, é uma forma de música que poderia ser incluída no cenário de estudo. Se a música comercial foi eficaz, a música de ressonância, já testada noutras circunstâncias, poderia revelar-se particularmente vantajosa em ambientes clínicos e carece de investigação.

O efeito da música limitou-se a uma única sessão de 30 min. A duração da intervenção e o efeito da repetibilidade de sessões durante a gravidez, bem como a sua periodicidade, são itens que deverão também ser contemplados em estudos futuros.

A base de dados que foi criada neste estudo possibilita que no futuro próximo se realizem estudos longitudinais, baseados no acompanhamento prospectivo das crianças participantes nesta amostra, agora já no domínio da Pediatria e do desenvolvimento psicobiológico.

Houve alguns resultados únicos neste estudo que carecem de reprodução em estudos futuros, nomeadamente a significativa correlação entre a variação de cortisol e testosterona no plasma da mãe em resposta a uma intervenção. Este resultado é especialmente relevante para esquemas de relaxamento de curta duração e poderá ter muito interesse em intervenções repetidas, requerendo avaliação futura. Um outro aspecto a investigar respeita à associação entre cortisol e testosterona no LA. Os resultados aqui apresentados não corroboraram a correlação linear encontrada pela equipe de Sarkar e colaboradores, sugerindo antes uma associação mais complexa que carece mais investigação.

As características do 2D:4D em recém-nascidos e as correlações encontradas com ambas as mãos, em crianças femininas e masculinas, algumas aparentemente em contradição com o que tem sido encontrado em idades mais avançadas, também merecem investigação futura para validar os resultados acerca da importância relativa dos picos pré e pós natais de testosterona.

## **7. Referências Bibliográficas**

---

## 7. Referências Bibliográficas

- Alder J, C Urech, N Fink, J Bitzer, I Hoesli (2011): Response to Induced Relaxation During Pregnancy: Comparison of Women with High Versus Low Levels of Anxiety. *J Clin Psychol Med Settings*; 18:13–21.
- Alladi PA, S Wadhwa, N Singh (2002): Effect of prenatal auditory enrichment on developmental expression of synaptophysin and syntaxin 1 in chick brainstem auditory nuclei. *Neurosci*; 114:577-90.
- Al-Qahtani NH (2005): Foetal response to music and voice. *Austral and New Zeal J Obstet Gynecol*; 45: 414-417.
- Altenmüller EO (2004): The music in your head. *Scientific Am* 14 (1), pp. 24–31.
- Amaral DG, A Pitkanen, ST Carmichael (1992): Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*. Aggleton J, New York: Wiley. The Amygdala: 1-67.
- Amiel-Tison C, D Cabrol, R Denver, P-H Jarreau , E Papiernik , PV Piazza (2004): Fetal adaptation to stress Part II. Evolutionary aspects; Stress-induced hippocampal damage; long-term effects on behavior; consequences on adult health. *Early Hum Develop*; 78:81-94.
- Arabin B (2002): Music during pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 20:425–30.
- Avishai-Eliner S, KL Brunson, CA Sandman and TZ Baram (2002): Stressed-out, or in (utero)? *Trends in Neurosciences*; 25 No.10.
- Baker F (1888): Anthropological notes on the human hand. *The Am Anthropologist*; 1:51-75.
- Barbazanges A, PV Piazza, M Le Moal, S Maccari (1996): Maternal glucocorticoid secretion mediates longterm effects of prenatal stress. *J Neurosci*; 16(12): 3943–3949.
- Barker DJP, C Osmond, PD Winter, B Maergetts, SJ Simmonds (1989): Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*; 2:577-80.
- Barker DJP, T Forsen, A Uutela, C Osmond, JG Eriksson (2001): Size at birth and resilience to the effects of poor living conditions in adult life: longitudinal study. *BMJ*; 323:1273–1276.
- Barker DJP, JG Eriksson, T Forsén, C Osmond (2002): Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol*; 31:1235-1239.
- Barker DJP (2002): Fetal programming of coronary heart disease. *Tren Endoc Metab*; 13 (9): 364-368.
- Barker DJP, C Osmond, TJ Fórsen, E Kajantie, JG Eriksson (2005): Trajectories of growth among children who later develop coronary heart disease or its risk factors. *N Engl J Med*; 353:1802-1809.
- Barker DJP (2005): The Developmental Origins of Insulin Resistance. *Horm Res*; 64(suppl 3):2-7.
- Barker DJP, SP Bagby, MA Hanson (2006): Mechanisms of disease: in utero programming in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol*; 2:700 –707.
- Barker DJP, C Osmond, TJ Forsen, E Kajantie, JG Eriksson (2007): Maternal and Social Origins of Hypertension. *Hypertension*; 50: 565-571.
- Barker DJP, C Osmond, KL Thornburg, E Kajantie, TJ Forsen, JG Eriksson (2008): A Possible Link Between the Pubertal Growth of Girls and Breast Cancer in Their Daughters. *Am J Hum Biol*; 20:127-131.
- Baron-Cohen S, S Lutchmaya, R Knickmeyer (2004): *Prenatal testosterone in mind*. Cambridge, MA: MIT Press.

- Behan DP, O Khongsaly, MJ Owens, HD Chung, CB Nemeroff, EB De Souza (1997): Corticotropin-releasing factor (CRF), CRF-binding protein (CRF-BP), and CRF/CRF-BP complex in Alzheimer's disease and control postmortem human brain. *J Neurochem*; 68: 2053–2060.
- Bennett HA, A Einarson, A Taddio, G Koren, TR Einarson (2004): Prevalence of depression during pregnancy: systematic review. *Obstet Gynecol*; 103: 698–709.
- Bergman K, P Sarkar, TG O'Connor, N Modi, V Glover (2007): Maternal stress during pregnancy predicts cognitive ability and fearfulness in infancy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*; 46:1454-1463.
- Bergman K, V Glover, P Sarkar, DH Abbott, T G O'Connor (2010a): In utero cortisol and testosterone exposure and fear reactivity in infancy. *Hormones and Behavior*; 57: 306–312.
- Bergman K, P Sarkar, V Glover, TG O'Connor (2010b): Maternal prenatal cortisol and infant cognitive development: Moderation by infant–mother attachment. *Biological Psychiatry*; 67: 1026–1032.
- Bernardi M, F Trevisani, A Gasbarrini, G Gasbarrini (1991): Degradation of circulating cortisol steroids, pp. 268-273 in: Henriksen JH (Ed). *Degradation of bioactive substances: physiology and pathophysiology*. CRC Press, Inc. Florida, USA.
- Bernardi L, C Porta and P Sleight (2006): Silence musicians and non-musicians: the importance of changes induced by different types of music in Cardiovascular, cerebrovascular, and respiratory. *Heart*; 92: 445-452.
- Berkowitz GS, MS Wolff, TM Janevic, IR Holzman, R Yehuda, PJ Landrigan (2003): The World Trade Center disaster and intrauterine growth restriction. *J Am Med Assoc*; 290: 595-96.
- Biaggio AMB, L Natalício, CD Spielberger (1977): O desenvolvimento da forma experimental em português do Inventário de Ansiedade Traço-Estado (IDATE), de Spielberger. *Arquivo Brasileiro de Psicologia Aplicada*, 29(3): p. 31-44.
- Bluestone AY, G Abdoulaev, CH Schmitz, RL Barbour, AH Hielscher (2001): Threedimensional optical tomography of hemodynamics in the human head. *Opt Express*; 9:272–86.
- Bolten MI, H Wurmser, A Buske-Kirschbaum, M Papoušek, KM Pirke, D Hellhammer (2011): Cortisol levels in pregnancy as a psychobiological predictor for birth weight. *Arch Womens Ment Health*; 14:33–41.
- Bornstein SR, GP Chrousos (1999): Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J Clin Endocrinol Metab*; 84:1729–36.
- Boyce WT, M Champoux, SJ Suomi, MR Gunnar (1995): Salivary cortisol in nursery-reared rhesus monkeys: reactivity to peer interactions and altered circadian activity. *Develop Psychobiol*; 28:257–267.
- Bradshaw DH, GW Donaldson, RC Jacobson, Y Nakamura, CR Chapman (2011): Individual differences in the effects of music engagement on responses to painful stimulation. *J Pain*; 12(12):1262-73.
- Bradt J (1997): Ethical issues in multicultural counseling: implications for the field of music therapy. *The Arts in Psychotherapy*; 24: 137–143.
- Bremner JD (2004): Brain imaging in anxiety disorders. *Expert Rev Neurother*; 4:275–84.
- Brouwers MM, WF Feitz, LA Roelofs, LA Kiemeneij, RP de Gier, N Roeleveld (2006): Hypospadias: a transgenerational effect of diethylstilbestrol? *Hum Reprod*; 21: 666–669.
- Brown RW, KE Chapman, CR Edwards, JR Seckl (1993): Human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology*; 132: 2614-2621.
- Brown WM, M Hines, BA Fane, SM Breedlove (2002): Masculinized finger length patterns in human males and females with congenital adrenal hyperplasia. *Hormones and Behaviour*; 42: 380-386.
- Browning CA (2000): Using music during childbirth. *Birth*; 27:272-276.

Brownley KA, RG McMurray, AC Hackney (1995): Effects of music on physiological and affective responses to graded treadmill exercise in trained and untrained runners. *Inter J Psychophysiology*; 19: 193-201.

Buck JJ, RM Williams, IA Hughes, CL Acerini (2003): In-utero androgen exposure and 2nd to 4th digit length ratio-comparisons between healthy controls and females with classical congenital adrenal hyperplasia. *Hum Reprod*; 18: 976-79.

Buitelaar JK, AC Huizink, EJ Mulder, PG Robles de Medina, GHA Visser (2003): Prenatal stress and cognitive development and temperament in infants. *Neurobiology of Aging*; 24: 553-560.

Buss C, EP Davis, LT Muftuler, K Head, CA Sandman (2009a): High pregnancy anxiety during mid-gestation is associated with decreased gray matter density in 6-9-year-old children. *Psychoneuroendocrinology*; 35: 141-153.

Buss C, Entringer S, Reyes JF, A Chicz-DeMet, CA Sandman, F Waffarn, PD Wadhwa (2009b): The maternal cortisol awakening response in human pregnancy is associated with the length of gestation. *Am J Obstet Gynecol*; 201(4):398.e1-8.

Caldji C, J Diorio, MJ Meaney (2000): Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biologic Psychiat*; 48: 1164-74.

Cardoso I, E Ponciano, AMS Pereira, N Endler (2005): Adaptação de uma versão experimental do *Endler Multidimensional Anxiety Scales (EMAS)* em Estudantes do Ensino Superior. In A. Pereira & E. Motta (Eds), *Ação Social e Aconselhamento Psicológico no Ensino Superior: Investigação e Intervenção. Actas do Congresso Nacional*. Coimbra: SASUC Edições, pp. 357-366.

Carlson JN, SD Glick (1989): Cerebral lateralization as a source of individual differences in behavior. *Experientia*; 15(9):788-98.

Carr BR, CR Parker, JD Madden, PC MacDonald, JC Porter (1981): Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. *Am J Obst Gynecol*; 139: 416-22.

Caspi A, K Sugden, TE Moffitt, A Taylor, IW Craig, H Harrington, J McClay, J Mill, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003): Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*; 301, 386-389.

Caswell N, JT Manning (2009): A Comparison of Finger 2D:4D by Self-Report Direct Measurement and Experimenter Measurement from Photocopy: Methodological Issues. *Arch Sex Behav*; 38:143-148.

Catrrall FR, BJ Vollenhoven, GC Weston (2005): Anatomical evidence for in utero androgen exposure in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*; 84:1689-1692.

Causevic M, M Mohaupt (2007): 11[beta]-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in pregnancy and preeclampsia. *Mol Aspects Med*; 28: 220-226.

Challis JRG, D Sloboda, SG Matthews, A Holloway, N Alfaidy, FA Patel, W Whittle, M Fraser, TJ Moss, J Newnham (2001): The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Molec Cel Endoc*;185: 135-144.

Chan YM, PWH Lee, TY Ng, HYS Negan, LC Wong (2003): The use of music to reduce anxiety for patients undergoing colposcopy: a randomized trial. *Gynecologic Oncology*; 91: 213-217.

Chang MY, SY Wang, CH Chen (2002): Effects of massage on pain and anxiety during labour: a randomised controlled trial in Taiwan. *J Adv Nurs*; 38(1):68-73.

Chang SC, CH Chen (2005): Effects of music therapy on women's physiologic measures, anxiety and satisfaction during cesarean delivery. *Res in Nursing and Health*; 28: 453-461.

Chang MY, CH Chen, KF Huang (2008): Effects of music therapy on psychological health of women during pregnancy. *J Clin Nurs*; 17: 2580-2587.

Charmandari E, T Kino, E Souvatzoglou, GP Chrousos (2003): Pediatric Stress: Hormonal Mediators and Human Development. *Horm Res*; 59 (4): 161-79.

- Charmandari E, C Tsigos, G Chrousos (2005): ENDOCRINOLOGY OF THE STRESS RESPONSE. *Annu Rev Physiol*; 67:259–84
- Charil A, DP Laplante, C Vaillancourt, S King (2010): Prenatal stress and brain development. *Brain Res Rev*; 65(1):56-79.
- Chen DG, YF Huang, JY Zhang, GP Qi (1994): Influence of prenatal music and touch-enrichment on the IQ, motor development, and behavior of infants. *Clin J Psychol*; 8:148–51.
- Chisaka H, JF Johnstone, M Premyslova, Z Manduch, JR Challis (2005): Effect of pro-inflammatory cytokines on expression and activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cultured human term placental trophoblast and human choriocarcinoma JEG-3 cells. *J Soc Gynecol Investig*; 12,303-309.
- Cheour-Luhtanen M, K Alho, K Sainio, T Rinne, K Reinikainen, M Pohjavuori, M Renlund, O Aaltonen, O Eerola, R Naatanen (1996): The ontogenetically earliest discriminative response of the human brain. *Psychophysiology*; 33,478– 481.
- Chong S, E Whitelaw, (2004): Epigenetic germline inheritance. *Curr Opin Genet Develop* ; 14, 692–696.
- Chrousos GP, T Kino (2005): Ikaros transcription factors: flying between stress and inflammation. *J Clin Invest*; 115:844–848.
- Chrousos GP, DJ Torpy, PW Gold (1998): Interactions between the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Female Reproductive System: Clinical Implications. *Ann In Med*; 129(3):229-240.
- Chrousos GP (2002): Organization and integration of the endocrine system. In *Pediatric Endocrinology*, ed. M Sperling, pp 1-14. Philadelphia: Saunders.
- Chuang L-L, L-C Lin, P-J Cheng, C-H Chen, S-C Wu, C-L Chang (2011): Effects of a relaxation training programme on immediate and prolonged stress responses in women with preterm labour. *J Advanced Nursing*; 68(1): 170–180.
- Chuang LL, LC Lin, PJ Cheng, CH Chen, SC Wu, CL Chang (2012): The effectiveness of a relaxation training program for women with preterm labor on pregnancy outcomes: a controlled clinical trial. *Int J Nurs Stud*;49(3):257-64.
- Clark ME, RR Mccorkle, SB Willians (1981): Music therapy assisted labor and delivery. *J Music Therapy*; 18, 88–100.
- Clark M, G Isaacks-Downton, N Wells, et al (2006): Use of preferred music to reduce emotional distress and symptom activity during radiation therapy. *J Music Therapy*; 43:247-265.
- Claessens SEF, NP Daskalakis, R van der Veen, MS Oitzl, ER de Kloet, DL Champagne (2011): Development of individual differences in stress responsiveness: an overview of factors mediating the outcome of early life experiences. *Psychopharmacology*; 214:141-154.
- Coe CL, M Kramer, B Czeh, E Gould, Alison J Reeves, C Kirschbaum, E Fuchs (2003). Prenatal Stress Diminishes Neurogenesis in the Dentate Gyrus of Juvenile Rhesus Monkeys. *Biol Psychiatry*; 54:1025-1034.
- Cohen-Bendahan CCC (2005): *Biological roots of sex differences: A longitudinal twin study*. PhD Thesis, University Utrecht, The Netherlands.
- Cohen-Bendahan CCC, JK Buitelaar, SHM Van Goozen, JF Orlebeke, PT Cohen-Kettenis (2005a): Is there an effect of prenatal testosterone on aggression and other behavioral traits? A study comparing same-sex and opposite-sex twin girls. *Hormones and Behaviour*; 47:230-7.
- Cohen-Bendahan CCC, C van de Beek, SA Berenbaum (2005b): Prenatal sex hormone effects on child and adult-sex typed behavior: methods and findings. *Neurosci Biobehav Rev*; 29:353-84.
- Collinge W (1998): *Subtle energy*, Warner Books, New York.
- Conover, WJ. 1999 (3<sup>a</sup> Ed). *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley & Sons.
- Copper R, RL Goldenberg, A Das, N Elder, M Swain, G Norman, R Ramsey, P Cotroneo, BA Collins, F Johnson, P Jones, A Meier, and the National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network (1996): The preterm prediction study: Maternal stress is associated with spontaneous preterm birth at less than thirty-five weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol*; 175:1286-92.

- Corbier P, DA Edwards, J Roffi (1992): The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*; 100 (2): 127–31.
- Courchesne E (1990): Chronology of postnatal human brain development: event-related potential, positron emission tomography, myelinogenesis, and synaptogenesis studies, event-related brain potentials. *Event- Related Brain Potentials: Basic Issues and Applications*. Oxford University, New York.
- Crespi E, J Denver (2005): Ancient origins of Human developmental plasticity. *Am J Hum Biol*; 17:44-54
- Crowe BJ (2004): *Music and soul making: Toward a new theory of music therapy*. Scarecrow Press.
- Csaba A, MC Bush, C Saphier (2006): How painful are amniocentesis and chorionic villus sampling? *Prenat Diagn*; 26(1): 35-38.
- Cumming DC, SR Wall, I-IA Quinnev, AN Belcastro (1987): Decrease in serum testosterone levels with maximal swimming exercise in trained male and female swimmers. *Endocrine Rev*; 13:31-41.
- Cunningham M, LH Zayas (2002): Reducing depression in pregnancy: designing multimodal interventions. *Social Work*; 47:114-123.
- Daniel FCB (2003). *Teoria e Prática Psicométrica: Contribuição para a Validação do Stai - Y de Spielberger em Estudantes do Ensino Superior*. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior Miguel Torga, Coimbra.
- Daniel F, E Ponciano, R Figueirinha e C Spielberger (2006): Estrutura Factorial de uma versão experimental do STAI-Y de Spileberger em Estudantes Universitários Portugueses. In Tavares J, Pereira A, Fernandes C, Monteiro S (Eds) *Ativação do desenvolvimento psicológico: actas do Simpósio Internacional – Aveiro*: Universidade de Aveiro. Departamento de Ciências da Educação. pp 144-150 ISBN 972-789-191-8.
- Dakin CL, CA Wilson, I Kalló, CW Coen, DC Davies (2008): Neonatal stimulation of 5-HT(2) receptors reduces androgen receptor expression in the rat anteroventral periventricular nucleus and sexually dimorphic preoptic area. *Eur J Neurosci*; 27 (9): 2473–80.
- Davis WB, KE Gfeller, MH Thaut (1999): *An Introduction to Music Therapy: Theory and Practice*, 2nd ed. McGraw-Hill, Boston.
- Davis EP, LM Glynn, F Waffarn, CA Sandman (2011): Prenatal maternal stress programs infant stress regulation. *J Child Psychol Psychiatry*; 52:119–29.
- Dawson W. Hedges & Fu Lye Woon (2011): Early-life stress and cognitive outcome. *Psychopharmacol*; 214:121–130.
- Draganova R, H Eswaran, P Murphy, M Huotilainen, C Lowery, H Preissl (2005): Sound frequency change detection in fetus and newborns, a magnetoencefalographic study. *Neuroimage*; 28(2): 354-361.
- de Bruijn ATCE, HJA van Bakel, AL van Baar (2009): Sex differences in the relation between prenatal maternal emotional complaints and child outcome. *Early Hum Develop*; 85:319–324.
- Del Cerro MC, C Perez-Laso, E Ortega, JL Martin, F Gomez, MA Perez-Izquierdo, S Segovia (2010): Maternal care counteracts behavioral effects of prenatal environmental stress in female rats. *Behavioural Brain Res*; 208: 593–602.
- de Quervain DJ, B Roozendaal, JL McGaugh (1998): Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*; 394:787-790.
- de Ronde W, YT van der Schouw, FH Pierik, HAP Pols, M Muller, DE Grobbee, L JG Gooren, RFA Weber, FH De Jong (2005): Serum levels of sex hormone binding globulin (SHBG) are not associated with lower levels of non-SHBG-bound testosterone in male NBs and healthy adult men. *Clin Endocrinol*; 62(4):498-503.
- de Weerth C, RH Zijl, JK Buitelaar (2003): Development of cortisol circadian rhythm in infancy. *Early Hum Develop*; 73(1-2):39–52.
- de Weerth C, JK Buitelaar (2005): Physiological stress reactivity in human pregnancy—a review. *Neurosci and Biobehavioral Reviews*; 29:295-312.



- Ding D, L Xu, M Menon, GPV Reddy, ER Barrack (2004): Effect of a short CAG (Glutamina) repeat on human androgen receptor function. *The Prostate*; 58:23-32.
- Dionísio F (2011): *Uma Tampa para cada Tacho – conflitos genéticos e evolução*. Ed Bizâncio.
- DiPietro JA, KA Costigan, ER Pressman, JA Doussard-Roosevelt (2000): Antenatal origins of individual differences in heart rate. *Developmental Psychobiology*; 37: 221-228.
- DiPietro J, R Irizarry, KA Costigan, ED Gurewitsch (2004): The psychophysiology of the maternal–fetal relationship. *Psychophysiology*; 41: 510–520.
- DiPietro JA, KA Costigan, P Nelson, ED Gurewitsch, ML Laudenslager (2008): Fetal responses to induced maternal relaxation during pregnancy. *Biological Psychology*; 77:11–19.
- Dole N, DA Savitz, AM Siega-Riz, MJ McMahon, P Buekens (2003): Maternal stress and preterm birth. *Am J Epidem*; 157:14-24.
- Doman J, S Thompson, V Grochocinski, D Jarrett, DJ Kupfer (1986): A computer algorithm to determine the nadir and rise time in nocturnal cortisol secretion. *Psychoneuroendocrinology*; 11:359–366.
- Dörner G, WD Döcke (1983): Prevention of demasculinization and feminization of the brain in prenatally stressed male rats by perinatal androgen treatment. *Exp Clin Endocrinol*; 81: 88-90.
- Draganova R, H Eswaran, P Murphy, M Huotilainen, C Lowery, H Preissl (2005): Sound frequency change detection in fetus and newborns, a magnetoencefalographic study. *Neuroimage*; 28: 354-361.
- Drake AJ, BR Walker, JR Seckl (2004): Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. *Am J Physiology – Regular, Integrative and Comparative Physiology*; 288: R34–R8.
- Draper NR and H Smith (1998) (3rd Ed). *Applied Regression Analysis*. Wiley Series in Probability and Statistics.
- Dunn K (2004): Music and the reduction of post-operative pain. *Nurs Stand*; 18:33-39.
- Ebneshahidi A, M Mohseni (2008): The Effect of Patient-Selected Music on Early Postoperative Pain, Anxiety, and Hemodynamic Profile in Cesarean Section Surgery. *The J Alternative and Complementary Medicine*; 14 (7): 827–831.
- Ecker A (1875): Some remarks about a varying character in the hands of humans. *Archiv fur Anthropologie*; 8: 68-74.
- Egliston K-A, C McMahon, M-P Austin (2007): Stress in pregnancy and infant HPA axis function: Conceptual and methodological issues relating to the use of salivary cortisol as an outcome measure. *Psychoneuroendocrinology*; 32: 1–13.
- Elliott D, R Polman, R McGregor (2011): Relaxing music for anxiety control. *J Music Therapy*; 48(3):264-88.
- Ellison PT (2010): Fetal Programming and Fetal Psychology. *Inf Child Develop*; 19: 6–20.
- Engert V, SI Efanov, K Dedovic, A Dagher, JC Pruessner (2011): Increased cortisol awakening response and afternoon/ evening cortisol output in healthy young adults with low early life parental care. *Psychopharmacology*; 214:261–268.
- Entringer S, C Buss, R Kumsta, DH Hellhammer, PD Wadhwa, S Wüst (2009): Prenatal psychosocial stress exposure is associated with subsequent working memory performance in young women. *Behav Neurosci* 123(4): 886–893.
- Emory EK (2010): Womb with a View: Ultrasound for Evaluation of Fetal Neurobehavioral Development. *Inf Child Develop*; 19: 119–124.
- Eriksson J, T Forsen, J Tuomilhto, C Osmond, D Barker (2000): Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. *Hypertension*; 36: 790–794.

- Eskenazi B, AR Marks, R Catalano, T Bruckner, PG Toniolo (2007): Low birthweight in New York City and upstate New York following the events of September 11th. *Hum Reproduction*; 22(11):3013-20.
- Eswaran H, R Draganova, H Preissl (2007): Auditory evoked responses: A tool to assess the fetal neurological activity. *Applied Acoustics*; 68: 270–280.
- Evans J, J Heron, H Francomb, S Oke, J Golding (2001): Cohort study of depressed mood during pregnancy and after childbirth. *BMJ*; 323: 257–260.
- Evans D (2002): The effectiveness of music as an intervention for hospital patients: a systematic review. *J Adv Nurs*; 37 (1): 8-18.
- Evardone M, GM Alexander (2009): Anxiety, Sex-Linked Behaviors, and Digit Ratios (2D:4D). *Arch Sex Behav*; 38(3): 442-455.
- Even MD, MG Dhar, FS vom Saal (1992): Transport of steroids between fetuses via amniotic fluid in relation to the intrauterine position phenomenon in rats. *J Reproduction and Fertility*; 96:709-716.
- Faiman C, FI Reyes, JSD Winter (1974): Serum gonadotropin patterns during the perinatal period in man and in the chimpanzee. *INSERM Inst Natl Santé Rech Méd*; 32:281-298.
- Fenling F, Y Zou, A Ma, Y Yue, W Mao, X Ma (2009): Hormonal changes and somatopsychologic manifestations in the first trimester of pregnancy and post partum. *Int J Gynecol and Obstet*; 105: 46-49.
- Ferreira A (1965): Emotional factors in prenatal environment. A review. *J Nerv Ment Dise*; 141: 108-118.
- Field T, M Hernandez-Reif, S Taylor, O Qunitino, I Burman (1997): Labour pain is reduced by massage therapy. *J Psychosom Obstet Gynaecol*; 18:286–91.
- Field T, A Martinez, T Nawrocki, J Pickens, N Fox, S Schanber (1998): Music shifts frontal EEG in depressed adolescents. *Adolescence*; 33, issue 129, 109-17.
- Field T, M Hernandez-Reif, S Hart, H Theakston, S Schanberg, C Kuhn (1999): Pregnant women benefit from massage therapy. *J Psychosomatic Obstet Gynaecol*; 20: 31-38.
- Field T, M Diego, M Hernandez-Reif, S Schanberg, C Kuhn, R Yando, D Bendell (2003): Pregnancy anxiety and comorbid depression and anger: Effects on the fetus and neonate. *Depression and Anxiety*; 17: 140–151.
- Field T, MA Diego, M Hernandez-Reif, S Schanberg, C Kuhn (2004): Massage therapy effects on depressed pregnant women. *J Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology*; 25: 115–122.
- Field T, M Hernandez-Reif, M Diego, S Schanberg, C Kuhn (2005): Cortisol decreases and serotonin and dopamine increase following massage therapy. *The Inter J Neurosci*; 115 (10): 1397–1413.
- Field T, M Hernandez-Reif, L Feijo, J Freedman (2006): Prenatal, perinatal and neonatal stimulation: A survey of neonatal nurseries. *Infant Behav Develop*; 29: 24–31.
- Field T, M Diego, M Hernandez-Reif, O Deeds, B Figueiredo (2009): Pregnancy massage reduces prematurity, low birth weight and postpartum depression. *Infant Behav Develop*; 32 (4): 454-460.
- Field T, M Diego, M Hernandez-Reif (2010): Prenatal depression effects and interventions: a review. *Infant Behav Develop*; 33 (4): 409–418.
- Finegan JK, B Bartleman, PY Wong (1989): A window for the study of prenatal sex hormone influences on postnatal development. *J Genet Psychol*; 150: 101–112.
- Fink B, N Neave, JT Manning (2003): Second and fourth digit ratio, body mass index, waist-to-hip ratio, and waist-to-chest ratio: their relationships in heterosexual men and women. *Ann Hum Biol*; 30:728-38.
- Fink NS, C Urech, F Isabel, A Meyer, I Hoesli, J Bitzer, J Alder (2011): Fetal response to abbreviated relaxation techniques. A randomized controlled study. *Early Hum Develop*; 87: 121–127.

- Fitch WT (2006): The biology and evolution of music: A comparative perspective. *Cognition*; 100:173–215.
- Foley DL, R Rowe, H Maes, J Silberg, L Eaves, A Pickles (2008): The relationship between separation anxiety and impairment. *J Anxiety Disorders*; 22:635–641.
- Forest MG, AM Cathiard, JA Bertrand (1973): Evidence of testicular activity in early infancy. *J Clin Endocrinol Metab*; 37(1): 148–51.
- Forest MG (1990): *Pituitary gonadotropin and sex steroid secretion during the first two years of life. In Control of the Onset of Puberty* Edited by: MM Grumbach, PC Sizonenko and ML Aubert. Baltimore, Williams & Wilkins
- Gadberry AL (2011): Steady beat and state anxiety. *J Music Therapy*; Fall; 48(3):346-56.
- Galaal K, A Bryant, KH Deane, M Al-Khaduri, AD Lopes (2011): Interventions for reducing anxiety in women undergoing colposcopy. *Cochrane Database Syst Rev*; (12):CD006013.
- Galis F, CMA Ten Broek, S Van Dongen, LCD Wijnaendts (2010): Sexual Dimorphism in the Prenatal Digit Ratio (2D:4D). *Arch Sex Behav*; 39:57-62.
- Garn SM, AR Burdi, WJ Babler, S Stinson (1975): Early prenatal attainment of adult metacarpal-phalangeal rankings and proportions. *Am J Phys Anthropol*; 43:327-32.
- Gaskin JH, JI Kitay (1971): Hypothalamic and pituitary regulation of adrenocortical function in the hamster: effects of gonadectomy and gonadal hormone replacement. *Endocrinology*; 89: 1047–1053.
- Gedde-Dahl M, EA Fors (2012): Impact of self-administered relaxation and guided imagery techniques during final trimester and birth. *Complement Ther Clin Pract*; 18(1):60-5.
- George R (1930): Human finger types. *Anatomical Record*; 46(2): 199-204.
- Gerra G, GG Mascetti, S Gardini, U Zambelli, M Timpano, MA Raggi, F Brambilla (2001): Neuroendocrine responses to experimentally-induced psychological stress in healthy humans. *Psychoneuroendocrinology*; 26: 91-107.
- Giancoli DG (1998): (5th Ed). *Physics. Principles with Application*. Prentice Hall, Inc.
- Giguere Y, E Dewailly, J Brisson, P Ayotte, N Laflamme, A Demers, V-I Forest, S Dodin, J Robert, F Rousseau (2001): Short polyglutamine tracts in the androgen receptor are protective against breast cancer in the general population. *Cancer Res*; 61: 5869-5874.
- Gitau R, Adams D, Fisk NM, Glover V (2005): Fetal plasma testosterone correlates positively with cortisol. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*; 90: F166–F169.
- Glover V, M Kammerer (2004a): The biology and pathophysiology of perinatal psychiatric disorder. *Primary Psychiatry*; 11:37-41.
- Glover V, TG O'Connor, J Heron, J Golding (2004b): Antenatal maternal anxiety is linked with atypical handedness in the child. *Early Hum Develop*; 79: 107–118.
- Glover V, K Bergman, P Sarkar, TG O'Connor (2009). Association between maternal and amniotic fluid cortisol is moderated by maternal anxiety. *Psychoneuroendocrinology*; 34: 430-435.
- Glover V, TG O'Connor, K O'Donnell (2010): Prenatal stress and the programming of the HPA axis. *Neurosci Biobehav Rev*; 1241:1-6.
- Glover V (2011): Annual Research Review: Prenatal stress and the origins of psychopathology: an evolutionary perspective. *J Child Psychology and Psychiatry*; 52: (4)356-367.
- Glover V, J Hill (2012): Sex differences in the programming effects of prenatal stress on psychopathology and stress responses: An evolutionary perspective. *Physiol Behav*; 106(5):736-40.

- Gluckman PD, MA Hanson, HG Spencer (2005): Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends in Ecology and Evolution*; 20: 527–533.
- Gluckman PD, MA Hanson, AS Beedle (2007): Early life events and their consequences for later disease: A life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biology*; 19: 1–19.
- Gluckman PD, MA Hanson, C Cooper, KL Thornburg (2008): Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*; 359: 61-73.
- Gluckman PD, MA Hanson (2010): The Plastic Human. *Inf Child Develop*; 19:21–26.
- Glynn LM, PD Wadhwa, C Dunkel-Schetter, A Chicz-DeMet, CA Sandman (2001): When stress happens matters: Effects of earthquake timing on stress responsivity in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 185: 779-80.
- Glynn LM, CD Schetter, PD Wadhwa, CA Sandman (2004): Pregnancy affects appraisal of negative life events. *J Psychosom Res*; 56(1): 47–52.
- Gobrogge KL, SM Breedlove, KL Klump (2008): Genetic and environmental influences on 2D:4D finger length ratios: a study of monozygotic and dizygotic male and female twins. *Arch Sex Behav*; 37(1):112-8.
- Goedhart G, TGM Vrijkotte, TJ Roseboom, MF van der Wal, P Cuijpers, GJ Bonse (2010): Maternal cortisol and offspring birthweight: Results from a large prospective cohort study. *Psychoneuroendocrinology*; 35:644-652.
- Gomez F, MF Dallman (2001): Manipulation of androgens causes different energetic responses to cold in 60- and 40-day-old male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 280: R262-R273.
- Gorenstein C, L Andrade (1996): Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects. *Brazilian J Medical and Biological Res*; 29(4):p. 453-7.
- Grammatopoulos DK, GP Chrousos (2002): Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab*; 13:436-44.
- Grant KA, C McMahon, MP Austin, N Reilly, L Leader, S Ali (2009): Maternal prenatal anxiety, postnatal caregiving and infants' cortisol responses to the still-face procedure. *Developmental Psychobiology*; 51:625-637.
- Graven SN, JV Browne (2008): Auditory development in the fetus and infant. *Newborn & Infant Nursing Reviews* 8 (4): 187-193.
- Gutteling BM, de Weerth C, Buitelaar JK (2004): Maternal prenatal stress and 4-6 year old children's salivary cortisol concentrations pre- and post-vaccination. *Stress*; 7:257-260.
- Gutteling BM, C de Weerth, JK Buitelaar (2005): Prenatal stress and children's cortisol reaction to the first day of school. *Psychoneuroendocrinology*; 30, 541–549.
- Hales CN, DJ Barker (2001): The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bull*; 60: 5–20.
- Hampson E, LE Connie, MT Christine (2008): On the Relation Between 2D:4D and Sex-Dimorphic . *Personality Traits Arch Sex Behav*; 37:133-144.
- Hantoushzadeh S, N Alhousseini, AH Lebaschi (2007): The effects of acupuncture during labour on nulliparous women: a randomized controlled trial. *Aust NZ J Obstet Gynaecol*;47:26– 30.
- Harris A, J Seckl (2011): Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav*; 59(3):279-89.
- Harvison KW, DL Molfese, J Woodruff-Borden, RA Weigel (2009): Neonatal auditory evoked responses are related to perinatal maternal anxiety. *Brain and Cognition*; 71: 369–374.
- Hayes A, M Buffum, E Lanier, E Rodahl, C Sasso (2003): A music intervention to reduce anxiety prior to gastrointestinal procedures. *Gastroenterology Nursing*; 26: 145–149.
- Hedges DW, FL Woon (2011): Early-life stress and cognitive outcome. *Psychopharmacology*; 214:121–130.

- Heim C, CB Nemeroff (1999): The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol Psychiatry*; 46:1509–1522.
- Heim C, DJ Newport, S Heit, YP Graham, M Wilcox, R Bonsall, AH Miller, CB Nemeroff (2000): Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. *JAMA*; 284:592–597.
- Heim C, PM Plotsky, CB Nemeroff (2004): Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacology*; 29:641–648.
- Heim C, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Nemeroff CB (2008): The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology*; 33:693–710.
- Heim C, UM Nater, E Maloney, R Boneva, JF Jones, WC Reeves (2009): Childhood trauma and risk for chronic fatigue syndrome: association with neuroendocrine dysfunction. *Arch Gen Psychiatry*; 66, 72–80.
- Hendrick V, ZN Stowe, LL Altshuler, S Hwang, E Lee, D Haynes (2003): Placental passage of antidepressant medications. *Am J Psychiatry*; 160: 993-996.
- Hepper PG, BS Shahidullah (1994): Development of fetal hearing. *Arch Dis Child*; 71(2): F81– F87.
- Herauld Y, N Fradeau, ZJ Ulinaless (1997): A regulatory mutation inducing both loss-of-function and gain-of-function of posterior Hoxd genes. *Development*; 124: 3493-3500.
- Herman JP, MK Schäfer, EA Young, R Thompson, J Douglass, H Akil, SJ Watson (1989): Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary adrenocortical axis. *J Neurosci*; 9(9): 3072–3082.
- Hertig A, P Liere, N Chabbert-Buffet, J Fort, A Pianos, B Eychenne et al (2010): Steroid profiling in preeclamptic women: evidence for aromatase deficiency. *Am J Obstet Gynecol*; 203:477.e1-9.
- Hiiipakka RA, S Liao (1998): Molecular mechanism of androgen action. *Trends Endocrinol Metab*; 9 (8): 317–24.
- Hillhouse EW, D Grammatopoulos, NG Milton, HW Quartero (1993): The identification of a human myometrial corticotropine-releasing hormone receptor that increases in affinity during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*; 76: 731-41.
- Hobel CJ, Dunkel C -Schetter, SC Roesch, LC Castro, CP Arora (1999a): Maternal plasma corticotrophin-releasing hormone associated with stress at 20 weeks' gestation in pregnancies ending in preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*; 180: S257-63.
- Hobel CJ, CP Arora, LM Korst (1999b): Corticotrophin-releasing hormone and CRH-binding protein: differences between patients at risk for preterm birth and hypertension. *Ann N Y Acad Sci*; 897:54-65.
- Holmes MC, CT Abrahamsen, KL French, JM Paterson, JJ Mullins, JR Seckl (2006): The mother or the fetus? 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticoids. *J Neurosci*; 26: 3840-3844.
- Honekopp J, L Bartholdt, L Beier, A Liebert (2007): Second to fourth digit length ratio (2D:4D) and adult sex hormone levels: new data and a meta-analytic review. *Psychoneuroendocrinology*; 32:313–321.
- Hosseini SM, MW Biglan, C Larkby, MM Brooks, MB Gorin, NL Day (2009): Trait anxiety in pregnant women predicts offspring birth outcomes. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*; 23: 557-566.
- Huizink AC, PG de Medina, EJ Mulder, GH Visser, JK Buitelaar (2002): Psychological measures of prenatal stress as predictors of infant temperament. *J Am Academy of Child and Adolescent Psychiatry*; 41: 1078–1085.
- Huizink, A.C., Robles de Medina, P.G., Mulder, E.J., Visser, G.H., & Buitelaar, J.K. (2003). Stress during pregnancy is associated with developmental outcome in infancy. *J Child Psychology and Psychiatry*; 44:810–818.
- Huizink AC, EJ Mulder, JK Buitelaar (2004): Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychol Bull*; 130: 115-142.

- Huizink AC, E Sihvola, L Pulkkinen, RJ Rose, J Kaprio (2007a): Chernobyl exposure as stressor during pregnancy and behaviour in adolescent offspring. *Acta Psych Scand*; 116(6): 438-446.
- Huizink AC, M Bartels, R J Rose, L Pulkkinen, C J P Eriksson, J Kaprio (2007b). Chernobyl exposure as stressor during pregnancy and hormone levels in adolescent offspring. *J Epidemiol Community Health*; 62:1-6.
- James WH (1996): Evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels at the time of conception. *J Theor Biol*; 180:271-86.
- James WH (2001): Finger-length Ratios, Sexual Orientation and Offspring Sex Ratios. *J theor Biol*; 212,273-274.
- James WH (2004): Further evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels around the time of conception. *Human Reprod*; 19:1250-6.
- Jardri R, P Delphine, V Houfflin-Debarge, C Chaffiotte, N Rocourt, J-P Pruvo, M Steinling, P Delion, P Thomas (2008): Fetal cortical activation to sound at 33 weeks of gestation: A functional MRI study. *NeuroImage*; 42 10–18.
- Jensen RB, S Vielwerth, T Larsen, L Hilsted, A Cohen, DM Hougaard, LT Jensen, G Greisen, A Juul (2011): Influence of fetal growth velocity and smallness at birth on adrenal function in adolescence. *Horm Res Paediatr*; 75(1):2-7.
- Johnson B, S Raymond, J Goss (2012): Perioperative music or headsets to decrease anxiety. *J Perianesth Nurs*; 27(3):146-54.
- Jones NM, CB Holzman, AJ Zanella, CM Leece, MH Rahbar (2006): Assessing mid-trimester salivary cortisol levels across three consecutive days in pregnant women using an at-home collection protocol. *Paediatr Perinat Epidemiol*; 20:425–37.
- Kafali H, A Derbent, E Keskin, S Simavli, E Gözdemir (2011): Effect of maternal anxiety and music on fetal movements and fetal heart rate patterns. *J Matern Fetal Neonatal Med*; 24(3):461-4.
- Kajantie E, L Dunkel, U Turpeinen, UH Stenman, PJ Wood, M Nuutila, S Andersson (2003): Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 and fetal cortisol/cortisone shuttle in small preterm infants. *J Clin Endocrinol Metab*; 88:493–500.
- Kalantaridou SN, E Zoumakis, A Makrigiannakis, LG Lavasidis, T Vrekoussis, GP Chrousos (2010): Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: an update. *J Reprod Immunol*; 85: 33–39.
- Kammerer M, D Adams, BB Castelberg, V Glover (2002): Pregnant women become insensitive to cold stress. *BMC Pregnancy Childbirth*; 2(1):8.
- Kanaya M, K Yamanouchi (2012): Defeminization of Brain Functions by a Single Injection of Estrogen Receptor  $\alpha$  or  $\beta$  Agonist in Neonatal Female Rats. *Neuroendocrinology*; 95(4):297-304.
- Kaplan LA, Evans L, C Monk (2008): Effects of mothers' prenatal psychiatric status and postnatal caregiving on infant biobehavioral regulation: can prenatal programming be modified? *Early Hum Develop*; 84(4): 249–56.
- Kapoor A, SG Matthews (2011): Testosterone is involved in mediating the effects of prenatal stress in male guinea pig offspring. *J Physiol*; 589.3:755–766.
- Kaminski J, W Hall (1996): The effect of soothing music on neonatal behavioral states in the hospital newborn nursery. *Neonatal Network*; 15: 45-54.
- Kastin AJ, V Akerstrom (2002): Differential interactions of urocortin/corticotropin releasing hormone with the blood–brain barrier. *Neuroendocrinology*; 75, 367-374.
- Kay G, N Tarcic, T Poltyrev, M Weinstock (1998): Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol Behav*; 63:397-402.
- Keim SA, JL Daniels, N Dole, AH Herring, AM Siega-Riz, PC Scheidt (2011): A prospective study of maternal anxiety, perceived stress, and depressive symptoms in relation to infant cognitive development. *Early Hum Develop*; 87: 373–380.

- Khalifa S, S Dalla Bella, M Roy, I Peretz, S Lupien (2003): Effects of relaxing music on Salivary Cortisol level after Psychological Stress. *Ann NY Acad Sci*; 999:374-376.
- Khashan AS, KM Abel, R McNamee, MG Pedersen, RT Webb, PN Baker, LC Kenny, PB Mortensen (2008): Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch General Psychiatry*; 65: 146-152.
- Khodakarami N, A Safarzadeh, N Fathizadeh (2006): The effects of massage therapy on labour pain and pregnancy outcome. *Eur J Pain*; 10(Suppl. S1):S214.
- Kim JJ, EY Song, TA Kosten (2006): Stress effects in the hippocampus: Synaptic plasticity and memory. *Stress*; 9(1): 1–11.
- Kimber L, M McNabb, M Court, A Haines, P Brocklehurst (2008): Massage or music for pain relief in labour: a pilot randomized placebo controlled trial. *Eur J Pain*; 12:961—969.
- Kim H, M-H Lee, H-K Chang, T-H Lee, H-H Lee, M-C Shina, M-S Shina, R Wona, H-S Shin, C-J Kim (2006): Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain & Development*; 28: 109–114.
- Kim-Cohen J, A Caspi, A Taylor, B Williams, R Newcombe, IW Craig, TE Moffitt (2006): MAOA, maltreatment, and gene–environment interaction predicting children’s mental health: New evidence and a meta-analysis. *Mol Psychiatry*; 11(10): 903-913.
- King S, Laplante DP (2005a): The effects of prenatal maternal stress on children’s cognitive development: Project Ice Storm. *Stress*; 8(1): 35–45.
- King S, D Laplante, R Joober (2005b): Understanding putative risk factors for schizophrenia: retrospective and prospective studies. *Rev Psychiatr Neurosci*; 30(5):342-348.
- King S, A Mancini-Marie, A Brunet, E Walker, MJ Meaney, DP Laplante (2009): Prenatal maternal stress from a natural disaster predicts dermatoglyphic asymmetry in humans. *Dev Psychopathol*; Spring; 21(2): 343-53.
- Kinney DK, AM Miller, DJ Crowley, E Huang, E Gerber (2008): Autism prevalence following prenatal exposure to hurricanes and tropical storms in Louisiana. *J Autism and Developmental Disorders*; 38: 481–488.
- Kisilevsky BS, GAL Davies (2007): Auditory processing deficits in growth restricted fetuses affect later language development. *Medical Hypotheses*; 68: 620–628.
- Kisilevsky BS, SMJ Hains, CA Brown, CT Lee, B Cowperthwaite, SS Stutzman, ML Swansburg, K Lee, X Xie, H Huang, H-H Ye, K Zhang, Z Wang (2009): Fetal sensitivity to properties of maternal speech and language. *Infant Behav Develop*; 32: 59–71.
- Kisilevsky B et S Hains (2010): Exploring the Relationship between Fetal Heart Rate and Cognition. *Inf Child Develop*; 19: 60–75.
- Klapuri A, M Davy (2006): *Signal processing methods for music transcription*. Springer, NY.
- Klopper A (1970): Steroids in amniotic fluid. *Ann Clin Res*; 2: 289–299.
- Knickmeyer R, S Baron-Cohen, P Raggatt, K Taylor, G Hackett (2006): Fetal testosterone and empathy. *Hormones and Behavior*; 49:282-292.
- Knickmeyer RC, S Woolson, RM Hamer, T Konneker, JH Gilmore (2011). 2D:4D ratios in the first 2 years of life: stability and relation to testosterone exposure and sensitivity. *Hormones and Behavior*; 60(3): 256-63.
- Knutsson U, J Dahlgren, C Marcus, S Roseberg, M Bronnegard, P Stierna, K Albertsson-Wikland (1997): Circadian Cortisol Rhythms in Healthy Boys and Girls: Relationship with Age, Growth, Body Composition, and Pubertal Development. *J Clinical Endocrinology and Metabolism*; 82 (2): 536-40.

- Koehl M, M Darnaudery, J Dulluc, O Van Reeth, M Le Moal, S Maccari (1999): Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo–pituitary–adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol*; 40: 302–315.
- Koeniga JI, GI Elmera, PD Sheparda, PR Leeb, C Mayo, B Joya, E Herchera, DL Brady (2005): Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioural and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behavioural Brain Res*; 156: 251–261.
- Koepp UM S, LF Andersen, K Dahl-Joergensen, H Stigum, O Nass, W Nystad (2012): Maternal pre-pregnant body mass index, maternal weight change and offspring birthweight. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 91(2):243-9.
- Kondo T, J Zakany, J Innis, D Duboule (1997): Of fingers, toes and penises. *Nature*; 390:29.
- Kostovic I, M Judas (2002): Correlation between the sequential in-growth of afferents and transient patterns of cortical lamination in preterm infants. *Anat Recor*; 267(1): 1-6.
- Kostović I, N Jovanov-Milošević (2006): The development of cerebral connections during the first 20–45 weeks' gestation. *Semin Fetal Neonatal Med*; 11: 415–422.
- Krout RE (2007): Music listening to facilitate relaxation and promote wellness: Integrated aspects of our neurophysiological responses to music. *The Arts in Psychotherapy*; 34(2):134-141.
- Kulkarni L, J Dolev, ZN Kain (2002): Music and preoperative anxiety: a randomized, controlled study. *Anesth Analg*; 94:1489-1494.
- Kwekkeboom KL (2003): Music versus distraction for procedural pain and anxiety in patients with cancer. *Oncol Nurs Forum*; 30 (3): 433—440.
- Lagercrantz H (2009): The birth of consciousness. *Early Hum Develop*; 85(10 Suppl):S57-8.
- Laplante DP, A Brunet, N Schmitz, A Ciampi, S King (2008): Project Ice Storm: Prenatal Maternal Stress Affects Cognitive and Linguistic Functioning in 5,5-Year-Old Children. *J Am Acad Child Adolesc Psychi*; 47:9 1063-1072.
- Lecanuet JP, B Gautheron, A Locatelli, B Schaal, AY Jacquet, MC Busnel (1998): What sounds reach fetuses: biological and non-biological modeling of the transmission of pure tones. *Develop Psychobiol*; 33:203–19.
- Lee T, JJ Kim (2004): Differential effects of cerebellar, amygdalar, and hippocampal lesions on classical eyeblink conditioning in rats. *J Neurosci*; 24:3242–3250.
- Leithner K, A Maar, M Fisher-Kern, E Hilger, HL Ffler-Stastka, E Ponocny-Seliger (2004): Affective state of women following a prenatal diagnosis: predictors of a negative psychological outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 23: 240–246
- Levine S (1957): Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science*; 126(3270): 405.
- Levine S (2000): Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol*; 405:149-60
- Lightman SL, WS Young (1989): Influence of steroids on the hypothalamic corticotrophin releasing factor and preproenkephalin mRNA responses to stress. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86(11): 4306–4310.
- Lilley T, T Laaksonen, O Huitu, S Helle (2010): Maternal corticosterone but not testosterone level is associated with the ratio of second-to-fourth digit length (2D:4D) in field vole offspring (*Microtus agrestis*). *Physiology & Behavior*; 99: 433–437.
- Livingston JC (1979): Music for the childbearing family. *J Obstetric, Gynecologic and Neonatal Nursing*; 8: 363–367.
- Lockwood CJ (1999): Stress-associated preterm delivery: The role of corticotrophin releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol*; 180:S264-6.



- Loehlin JC, D McFadden, SE Medland, NG Martin (2006): Population Differences in Finger-Length Ratios: Ethnicity or Latitude? *Arch Sexual Behavior*; 35(6):739-742.
- Lokuge S, BN Frey, JA Foster, CN Soares, M Steiner (2011): Depression in women: windows of vulnerability and new insights into the link between estrogen and serotonin. *J Clin Psychiatry*; 72(11):e1563-9.
- Loomans EM, O van der Stelt, M van Eijsden, RJ Gemke, T Vrijkotte, BR den Bergh (2011): Antenatal maternal anxiety is associated with problem behaviour at age five. *Early Hum Develop*; 87(8):565-70.
- Loomba RS, R Arora, PH Shah, S Chandrasekar, J Molnar (2012): Effects of music on systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and heart rate: a meta-analysis. *Indian Heart J*; 64(3):309-13.
- Lopes P.N.; Ponciano, E.; Pereira, A.M.S.; Medeiros, J.A.S. & Kleinknecht, R.A (2002): Cross Validation of a portuguese version of the dental fear survey. In Proceedings of The 16th Conference of the European Health Psychology Society (abstracts), 2 a 5 de Outubro, Lisboa, pp.205-211.
- Lopes PN, E Ponciano, A Pereira, J Medeiros, CD Spielberger (2004): Ansiedade dentária em estudantes do ensino superior: Características psicométricas do STAI-Y de Spielberger. In Ribeiro, J. & Leal, I. (ed.) (2004). *Actas do 5 Congresso de Psicologia da Saúde*, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, ISPA edições, pp. 169-176
- Lopez-Duran NL, M Kovacs, CJ George (2009): Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in depressed children and adolescents: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*; 34:1272-1283.
- Lordi B, V Patin, P Protais, D Mellier, J Caston (2000): Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate, anxiety, and memory capabilities of the offspring. *Inter J Psychophysiol*; 37:195–205.
- Lou HC, D Hansen, M Nordentoft, O Pryds, F Jensen, J Nim, R Hemmingsen (1994): Prenatal Stressors of Human Life Affect Fetal Brain Development. *Develop Med Child Neurol*; 36: 826-32.
- Luger A, PA Deuster, SB Kyle, WT Gallucci, LC Montgomery, PW Gold, DL Loriaux, GP Chrousos (1987): Acute hypothalamic-pituitary-adrenal responses to the stress of treadmill exercise. Physiologic adaptations to physical training. *N Engl J Med*; 316:1309–15.
- Lund I, Yu L-C, K Uvnas-Moberg, J C Wang, Yu, M Kurosawa, et al. (2002): Repeated massage-like stimulation induces long-term effects on nociception: contribution of oxytocinergic mechanisms. *Eur J Neurosci*; 16:330–8.
- Lunn SF, R Recio, K Morris, HM Fraser (1994): Blockade of the neonatal rise in testosterone by a gonadotrophin-releasing hormone antagonist: effects on timing of puberty and sexual behaviour in the male marmoset monkey. *J Endocrinology*; 141:439-447.
- Lupien SJ, S King, MJ Meaney, BS McEwen (2001): Can poverty get under your skin? Basal cortisol levels and cognitive function in children from high and low socioeconomic status. *Develop Psychopath*; 13:653–676.
- Lutchmaya S, S Baron-Cohen, P Raggat, R Knickmeyer, JT Manning (2004): 2<sup>nd</sup> to 4<sup>th</sup> digit ratios, fetal testosterone and estradiol. *Early Hum Develop*; 77:23-28.
- Mac Connie SE, Barkan A, Lampman RM, Schork MA, Beitins IZ (1986): Decreased hypothalamic gonadotropin releasing hormone secretion in male marathon runners. *N Engl J Med*; 315: 411–17.
- Maharana S, HR, Nagendra, R Nagarathna, V Padmalatha (2009): Effect Of Integrated Yoga On Stress And Heart Rate Variability In Pregnant Women. *Inter J Gynecol Obstet*; 104(3): 218-222.
- Main KM, J Toppari, NE Skakkebaek (2006): Gonadal development and reproductive hormones in infant boys. *Eur J Endocrinol*; 155:S51-7.
- Mairesse J, J Lesage, C Breton, B Breant, T Hahn, M Darnaudery, SL Dickson, J Seckl, B Blondeau, D Vieau, S Maccari, O Viltart (2007): Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 292: E1526—E1533.
- Majzoub JA, JA MacGregor, CJ Lockwood, R Smith, MS Taggart, J Schulkin (1999): A Central theory of preterm and term labor: Putative role for corticotrophin-releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol*; 180: S232-41.

- Malas MA, S Dogan, EH Evcil, K Desdicioglu (2006): Fetal development of the hand, digits and digits ratio (2D:4D). *Early Hum Develop*; 82(7):469-75.
- Mann DR, HM Fraser (1996): The neonatal period: a critical interval in male primate development. *J Endocrinology*; 149:191-197.
- Manning JT, D Scutt, G Wilson, DI Lewis-Jones (1998): The ratio of 2nd to 4th digit length: a predictor of sperm numbers and concentrations of testosterone, luteinizing hormone and oestrogen. *Hum Reprod*; 13: 3000-04.
- Manning JT, PE Bubbred (2000a): The ratio of 2nd to 4th digit length: a new predictor of disease predisposition? *Medical Hypothesis*; 54: 855-57.
- Manning JT, L Barley, J Walton, DI Lewis-Jones, RL Trivers, D Singh, R Thornhill, P Rohde, T Bereczkei, P Henzi, M Soler, A Szwed (2000b): The 2nd:4th digit ratio, sexual dimorphism, population differences, and reproductive success. Evidence for sexually antagonistic genes? *Evol Hum Behav*; 21:163–83.
- Manning JT, RL Trivers, D Singh, R Thornhill (2000c): 2nd to 4th digit ratio and hand preference. *Laterality*; 5:121-132.
- Manning JT, S Baron-Cohen, S Wheelwright, G Sanders (2001a): The 2nd to 4th digit ratio and autism. *Dev Med Child Neurol*; 43:160–4.
- Manning JT, PE Bundred (2001b): The ratio of 2nd to 4th digit length and age at first myocardial infarction in men: a link with testosterone? *Br J Cardiol*; 12: 720-23.
- Manning JT, RP Taylor (2001c): 2nd to 4th digit ratio and male ability in sport: implications for sexual selection in humans. *Evol Hum Behav*; 22: 61-69.
- Manning JT, S Leinster (2001d): The ratio of 2nd to 4th digit length and age at presentation of breast cancer: a link with prenatal oestrogen? *Breast*; 10:355-7.
- Manning JT (2002a): *Digit Ratio: a Pointer to Fertility, Behavior and Health*. Rutgers University Press, NJ.
- Manning JT, PE Bundred, BF Flanagan (2002b): The ratio of 2nd to 4th digit length: a proxy for transactivation activity of the androgen receptor gene? *Medical Hypotheses*; 59 (3): 334-336.
- Manning JT, S Martin, RL Trivers, M Soler (2002c): 2nd to 4th digit ratio and offspring sex ratio. *J Theor Biol*; 217(1): 93-5.
- Manning JT, PE Bubbred, DJ Newton, BF Flanagan (2003a): The second to fourth digit ratio and variation in the androgen receptor. *Evol Hum Behav*; 24: 399-405.
- Manning JT, SJ Robinson (2003b): 2nd to 4th digit ratio and a universal mean for prenatal testosterone in homosexual men. *Medical Hypotheses*; 61(2):303-306.
- Manning JT, M Callow, PE Bundred (2003c): Finger and toe ratios in humans and mice: implications for the aetiology of diseases influenced by HOX genes. *Medical Hypotheses*; 60:340–3.
- Manning JT, A Stewart, PE Bundred, RL Trivers (2004): Sex and ethnic differences in 2nd to 4th digit ratio of children. *Early Hum Develop*; 80:161-168.
- Manning JT, B Fink, N Neave, A Szwed (2006): The second to fourth digit ratio and asymmetry. *Ann Hum Biol*; 33:480-92.
- Manning JT, L Morris, N Caswell (2007): Endurance Running and Digit Ratio (2D:4D): Implications for Fetal Testosterone Effects on Running Speed and Vascular Health. *Am J Hum Biol*; 19:416-421.
- Manning JT, AJG Churchill, M Peters (2007b): The effects of sex, ethnicity, and sexual orientation on self-measured digit ratio (2D:4D). *Arch Sex Behav*; 36:223–33.

- Manning JT, B Fink (2008): Digit ratio (2D:4D), dominance, reproductive success, asymmetry, and sociosexuality in the BBC Internet study. *Am J Hum Biol*; 20(4):451-61.
- Manning JT (2011): Resolving the role of prenatal sex steroids in the development of digit ratio. *PNAS USA*, 108(39): 16143-16144.
- Marc I, N Toureche, E Ernst, ED Hodnett, C Blanchet, S Dodin, MM Njoya (2011): Mind-body interventions during pregnancy for preventing or treating women's anxiety. *Cochrane Database Syst Rev*; (7):CD007559.
- Matchock RL (2008): Low Digit Ratio (2D:4D) is Associated with Delayed Menarche. *Am J Hum Biol*. 20:487-489.
- Matias C, E Ponciano, T Medeiros, MJ Rodrigues, R Figueirinha e C Spielberger (2006): Estrutura Factorial de uma versão experimental do STAIC de Spielberger em crianças de Portugal Continental. In Tavares J, Pereira A, Fernandes C, Monteiro S (Eds) *Ativação do desenvolvimento psicológico: actas do Simpósio Internacional – Aveiro*: Universidade de Aveiro. Departamento de Ciências da Educação. pp 151-156 ISBN 972-789-191-8
- Matthews SG (2002): Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab*; 13:373-80.
- Matthews SG, Phillips DI (2011): Minireview: transgenerational inheritance of the stress response: a new frontier in stress research. *Endocrinology*; 151:7–13.
- Matthews SG, DI Phillips (2012): Transgenerational inheritance of stress pathology. *Exp Neurol*; 233:95–101.
- McAuley MM, RA Kenny, TT Kirkwood, DD Wilkinson, JJ Jones, VM Miller (March 2009): A Mathematical Model of aging-related and cortisol induced hippocampal dysfunction. *BMC Neurosci*; 10 (1): 26.
- McEwen BS (1998): Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med*; 338:171–179.
- McEwen BS (1999): Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*; 22: 105–122.
- McEwen BS (2000): The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*; 886: 172-189.
- McFadden D, E Shubel (2002): Relative lengths of finger and toes in human males and females. *Hormones and Behaviour*; 42 (4):492-500.
- McFadden D, JC Loehlin, SM Breedlove, RA Lippa, JT Manning, Q Rahman (2005): A Reanalysis of Five Studies on Sexual Orientation and the Relative Length of the 2nd and 4th Fingers (the 2D:4D Ratio). *Arch Sexual Behavior*; 34(3): 341-356.
- McIntyre MH, PT Ellison, DE Lieberman, E Demerath, B Towne (2005): The development of sex differences in digital formula from infancy in the Fels Longitudinal Study. *Proc R Soc B* 272:1473-1479.
- McIntyre MH (2006): The use of digit ratios as markers for perinatal androgen action. *Reprod Bio and Endoc*; 4:10
- McIntyre MH, JF Chapman, SF Lipson, PT Ellison (2007): Index-to-ring finger length ratio (2D:4D) predicts levels of salivary estradiol, but not progesterone, over the menstrual cycle. *Am J Hum Biol*; 19 (3):434-436.
- McIntyre MH, GM Alexander. (2011): Sex differences in the fingers of 3 to 5 month old infants do not predict concurrent salivary testosterone levels. *Early Hum Develop*; 87:349-51.
- McLean M, A Bisits, J Davies, R Woods, P Lowry, R Smith (1995): A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nature Med*; 1:460-3.
- McPhaul MJ, M Young (2001): Complexities of androgen action. *J Am Acad Dermatol*; 45 (3 Suppl): S87–94.
- McTernan CL, N Draper, H Nicholson, SM Chalder, P Driver, M Hewison, MD Kilby, PM Stewart (2001): Reduced placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA levels in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction: an analysis of possible mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 4979-4983.

- Medeiros J, MAS Pereira, P Lopes, A Melo, A Vaz, E Decq Motta, A Pereira (2004): Avaliação das qualidades psicométricas da ansiedade na endoscopia digestiva alta. In C Machado e tal (org.), *Actas da X Conferência Internacional de Avaliação Psicológica: Formas e Contextos (15-18 Setembro)*. Braga: Psiquilíbrios Edições, pp47-49
- Medeiros T, E Ponciano, C Matias, MJ Rodrigues, R Figueirinha e C Spielberger (2006): Estrutura Factorial de uma versão experimental do STAIC de Spielberger em crianças da Região Autónoma dos Açores. In Tavares J, Pereira A, Fernandes C, Monteiro S (Eds) *Ativação do desenvolvimento psicológico: actas do Simpósio Internacional – Aveiro*: Universidade de Aveiro. Departamento de Ciências da Educação. pp 157-161 ISBN 972-789-191-8
- Meek LR, KM Schulz, CA Keith (2006): Effects of prenatal stress on sexual partner preference in mice. *Physiology and Behavior*; 89: 133–138.
- Meinhardt U, PE Mullis (2002): The essential role of the aromatase/p450 arom. *Semin Reprod Med*; 20 (3): 277–84.
- Mellor C (1992): Dermatoglyphic evidence of fluctuating asymmetry in schizophrenia. *The British J Psychiatry*; 160: 467-472.
- Meston CM (1997): Aging and sexuality. In: *Successful Aging. West J Med*; 167:285-90.
- Michaud K, H Forget, H Cohen (2009): Chronic glucocorticoid hypersecretion in Cushing's syndrome exacerbates cognitive aging. *Brain and Cognition*; 71:1-8.
- Mitchell LA, RA MacDonald (2006): An experimental investigation of the effects of preferred and relaxing music listening on pain perception. *J Music Therapy*; 43:295-316.
- Migeon CJ, AB Wisniewski (1998): Review – sexual differentiation: from genes to gender. *Horm Res*; 50: 245-251.
- Miluk-Kolasa B, Z Obmink, R Stupnicki, L Golec (1994): Effects of music treatment on salivary cortisol in patients exposed to pre-surgical stress. *Exp Clin Endocrinol*; 102: 118-120.
- Mitchell LA, RA MacDonald (2006): An experimental investigation of the effects of preferred and relaxing music listening on pain perception. *J Music Therapy*; 43: 295–316.
- Moberg KU (2000): *The oxytocin factor: tapping the hormone of calm, love and healing*. Da Capo Press, USA.
- Moberg KU, G Bruzelius, P Alster, T Lundberg (1993): The antinociceptive effect of non-noxious sensory stimulation is mediated partly through oxytocinergic mechanisms. *Acta Physiol Scand*;149:199-2–4.
- Monk C, WP Fifer, MM Myers, RP Sloan, L Trien, A Hurtado (2000): Maternal stress responses and anxiety during pregnancy: effects on fetal heart rate. *Dev Psychobiol*;36(1):67–77.
- Monk C, MM Myers, RP Sloan, LM Ellman, WP Fifer (2003): Effects of women's stress-elicited physiological activity and chronic anxiety on fetal heart rate. *J Dev Behav Pediatr*;24(1):32–8.
- Mooradian AD, JE Morley, SG Korenman (1987): Biological actions of androgens. *Endocr Rev*; 8 (1): 1–28.
- Morgan CP, TL Bale (2011): Early Prenatal Stress Epigenetically Programs Dysmasculinization in Second-Generation Offspring via the Paternal Lineage. *The J Neurosci*; 31(33):11748 –11755.
- Morken N-H, K Kallen, B Jacobsson (2006): Fetal growth and onset of delivery: A nationwide population-based study of preterm infants. *Am J Obst Gynecol*; 195: 154-61.
- Morokuma S, V Doria, A Ierullo, N Kinukawa, K Fukushima, H Nakano, S Arulkumaran, AT Papageorghiou (2008): Developmental change in fetal response to repeated low-intensity sound. *Developmental Science*; 11: (1) 47–52.
- Murcia CQ, S Bongard, G Kreutz (2009): Emotional and Neurohumoral Responses to Dancing Tango Argentino - The Effects of Music and Partner. *Music and Medicine*; 1 (1): 14–21.
- Nagami M, PG McDonough, JO Ellegood, VB Mahesh (1979): Maternal and amniotic fluid steroids throughout human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 134: 674–680.

- Narendran S, R Nagarathna, V Narendran, S Gunasheela, HR Nagendra (2005): Efficacy of yoga on pregnancy outcome. *J Altern Complement Med*; 11(2): 237-44.
- Newell-Morris LL, CE Fahrenbruch, GP Sackett (1989): Prenatal psychological stress, dermatoglyphic asymmetry and pregnancy outcome in the pigtailed macaque (*Macaca nemestrina*). *Biol Neonate*; 56(2): 61-75.
- Ng CC, FM Lai, GS Yeo (2004): Assessment of maternal anxiety levels before and after amniocentesis. *Singapore Med J*; 45(8): 370-374.
- Nugent BM, JM Schwarz, MM McCarthy (2011): Hormonally mediated epigenetic changes to steroid receptors in the developing brain: implications for sexual differentiation. *Hormones and Behaviour*; 59(3):338-44.
- Obel C (2003): *Stress during pregnancy and fetal brain development*. PhD Thesis, Faculty of Health Sciences, University of Aarhus.
- Obel C, M Hedegaard, TB Henriksen, NJ Secher, J Olsen, S Levine (2005): Stress and salivary cortisol during pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*; 30(7): 647–656.
- Obel C, TB Henriksen, NJ Secher, B Eskenazi, M Hedegaard (2007): Psychological distress during early gestation and offspring sex ratio. *Hum Reproduction*; 22, 3009–3012.
- O'Connor T, J Heron, V Glover (2002a) : Antenatal Anxiety Predicts Child Behavioural/Emotional Problems Independently of Postnatal Depression. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*; 41:12, 1470-1477.
- O'Connor TG, J Heron, J Golding, M Beveridge, V Glover (2002b): Maternal antenatal anxiety and children's behavioural/emotional problems at 4 years. Report from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *British J Psychiatry*; 180:502–508.
- O'Connor TG, J Heron, J Golding, V Glover (2003): Maternal antenatal anxiety and behavioural / emotional problems in children: a test of a programming hypothesis. *J Child Psychol Psychiatry*; 44, 1025–1036.
- O'Connor TG, Y Ben-Shlomo, J Heron, J Golding, D Adams, V Glover (2005): Prenatal anxiety predicts individual differences in cortisol in pre-adolescent children. *Biol Psychiatry*; 58:211-217.
- O'Connor TG, P Caprariello, ER Blackmore, AM Gregory, V Glover, P Fleming (2007): Prenatal mood disturbance predicts sleep problems in infancy and toddlerhood. *Early Hum Develop*; 83:451-458.
- O'Donnell K, V Glover (2008): New insights into prenatal stress: immediate and long-term effects on the fetus and their timing. in *Neonatal Pain- Suffering, Pain and the Risk of Brain Damage in the Fetus and Newborn*. Buonocore G and Bellieni CV (Eds). Springer-Verlag: Milan.
- O'Donnell K, TG O'Connor, V Glover (2009): Prenatal Stress and Neurodevelopment of the Child: Focus on the HPA Axis and Role of the Placenta. *Dev Neurosci*; 31(4):285-92.
- O'Donnell KJ, AB Jensen, L Freeman, N Khalife, TG O'Connor, V Glover (2012): Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11b-HSD2. *Psychoneuroendocrinology*; 37: 818-826.
- Ohana E, M Mazor, W Chaim, J Levy, Y Sharoni, JR Leiberman, M Glezerman (1996): Maternal plasma and amniotic fluid cortisol and progesterone concentrations between women with and without term labor. A comparison. *J Reproductive Medicine*; 41:80–86.
- Okado N, S Kakimi, T Kojima (1979): Synaptogenesis in the cervical cord of the human embryo: Sequence of synapse formation in a spinal reflex pathway. *J Comp Neurol*; 184(3): 491-517.
- Ökten A, M Kalyoncu, N Yaris (2002): The ratio of second- and fourth digit lengths and congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Early Hum Develop*; 70:47-54.
- Olson SL (1998): Bedside musical care: applications in pregnancy, childbirth and neonatal care. *J Obstet Gynecol Neonatal Nursing*; 27(5): 569–575.
- Osinski PA (1960): Steroid 11beta-ol dehydrogenase in human placenta. *Nature*;187, 777.

- Oskis A, C Loveday, F Hucklebridge, L Thorn, A Clow (2009): Diurnal patterns of salivary cortisol across the adolescent period in healthy females. *Psychoneuroendocrinology*; 34:307-316.
- Painter RC, C Osmond, P Gluckman, M Hanson, DI Phillips, TJ Roseboom (2008): Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG*; 115: 1243–1249.
- Panicker H, S Wadhwa, TS Roy (2002): Effect of prenatal sound stimulation on medio-rostral neostriatum /hyperstriatum ventrale region of chick forebrain: a morphometric and immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat*; 24:127–35.
- Pariante CM, SL Lightman (2008): The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends in Neuroscis*; 31:464-468.
- Paus T, I Nawazkhan, G Leonard, M Perron, GB Pike, A Pitiot, L Richer, S Veillette, Z Pausova (2008): Corpus callosum in adolescent offspring exposed prenatally to maternal cigarette smoking. *NeuroImage*; 40:435–441.
- Pawluski JL, TD Charlier, M Fillet, V Houbart, HT Crispin, HW Steinbusch, DL van den Hove (2012): Chronic fluoxetine treatment and maternal adversity differentially alter neurobehavioral outcomes in the rat dam. *Behav Brain Res*; 228(1):159-68.
- Peichel CL, B Prabhakaran, TF Vogt (1997): The mouse *Ulnaless* mutation deregulates posterior *Hoxd* gene expression and alters appendicular patterning. *Development*; 24:3481-3492.
- Pelletier CL (2004): The effect of music on decreasing arousal due to stress: a meta-analysis. *J Music Therapy*; 41 (3): 192-214.
- Pelletier CL (2004): The effect of music on decreasing arousal due to stress: A meta-analysis. *J Music Therapy*; 41 (3): 192–214.
- Peterka M, R Peterkova, Z Likovsky (2004): Chernobyl: Prenatal loss of four hundred male fetuses in the Czech Republic. *Reproductive Toxicology*; 18:75–79.
- Peterson B, B Vohr, LH Staib, CJ Cannistraci, A Dolberg, KC Schneider, KH Katz, M Westerveld, et al (2000): Regional brain volume abnormalities and long-term cognitive outcome in preterm infants. *J Am Med Assoc*; 284:1939–1947.
- Petraglia F, PE Sawchenko, J Rivier, W Vale (1987): Evidence for local stimulation of ACTH secretion by corticotrophin releasing factor in human placenta. *Nature*; 328: 717–719.
- Petraglia F, MC Hatch, R Lapinski, M Stomati, FM Reis, L Cobellis, GS Berkowitz (2001): Lack of effect of psychosocial stress on maternal corticotropin-releasing factor and catecholamine levels at 28 weeks gestation. *J Soc Gynecol Invest*; 8: 83–88.
- Phelps VR (1952): Relative index finger length as a sex-influenced trait in man. *Am J Hum Genet*; 4(2):72-89.
- Phoenix CH, RW Goy, AA Gerall, WC Young (1959): Organizational action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*; 65:369-382.
- Phillips DIW (2007): Programming of the stress response: a fundamental mechanism underlying the long-term effects of the fetal environment? *J Int Med*; 261: 453–460.
- Pinel JPJ (2006): *Biopsychology- Beyond the brain & behavior* (6th ed.), Pearson, Boston, Mass..
- Poland M, P Giblin, C Lucas, R Sokol (1986): Psychobiological determinants of pregnancy-induced hypertension. *J Psychosomat Obstetr Gynaecol*;5:85-92.
- Ponciano E, L Loureiro, AMS Pereira, C Spielberger (2005a): Características Psicométricas e Estrutura Fatorial do TAI de Sipelberger em Estudantes Universitários. In A Pereira & E. Motta (Eds), *Ação Social e Aconselhamento Psicológico no Ensino Superior: Investigação e Intervenção. Actas do Congresso Nacional*. Coimbra: SASUC Edições, 315-322.
- Ponciano E, I Cardoso, AMS Pereira (2005b): Adaptação de uma Versão Experimental em Língua Portuguesa do *Beck Depression Inventory - Second Edition* (BDI-II) em Estudantes do Ensino Superior. In A. Pereira & E. Motta (Eds),

*Ação Social e Aconselhamento Psicológico no Ensino Superior: Investigação e Intervenção. Actas do Congresso Nacional.* Coimbra: SASUC Edições, pp. 329-338.

Powell LH, WR Lovallo, KA Matthews, P Meyer, AR Midgley, A Baum, , AA Stone, L Underwood, JJ McCann, HK Janikula, MG Ory (2002): Physiologic markers of chronic stress in premenopausal, middle-aged women. *Psychosom Med*; 64: 502–509.

Prince FP (2001): The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *J Endocrinology*; 168:213–216.

Prince FP, DR Mann, HM Fraser (1998): Blockade of the hypothalamic–pituitary testicular axis with a GnRH antagonist in the neonatal marmoset monkey: changes in Leydig cell ultrastructure. *Tissue and Cell*; 30:651–661.

Prince FP (2001): The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *J Endocrinology*; 168:213–216.

Pruessner JC, OT Wolf, DH Hellhammer, A Buske-Kirschbaum, K von Auer, S Jobst, F Kaspers, C Kirschbaum (1997): Free cortisol levels after awakening: a reliable biological marker for the assessment of adrenocortical activity. *Life Sci*; 61:2539–2549.

Pryce CA, Y Aubert, C Maier, PC Pearce, E Fuchs (2011): The developmental impact of prenatal stress, prenatal dexamethasone and postnatal social stress on physiology, behaviour and neuroanatomy of primate offspring: studies in rhesus macaque and common marmoset. *Psychopharmacology*; 214(1):33–53.

Querleu D, X Renard, F Versyp, L Paris-Delrue, G Crepin (1988): Fetal hearing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 28:191–212.

Querleu D, X Renard, C Boutteville, G Crepin (1989): Hearing by the human fetus? *Semin Perinatol*; 13(5):409–20.

Rabin D, PW Gold, AN Margioris, GP Chrousos (1988): Stress and reproduction: physiologic and pathophysiologic interactions between the stress and reproductive axes. *Adv Exp Med Biol*; 245:377–387.

Rabinowicz T, GM de Courten-Meyers, JM Petetot, G Xi, E de los Reyes (1996): Human cortex development: estimates of neuronal numbers indicate major loss late during gestation. *J Neuropathol Exp Neurol*; 55(3): 320–8.

Rapaport JL, FX Castellanos, N Gogate, K Janson, S Kohler, P Nelson (2001): Imaging normal and abnormal brain development: new perspectives for child psychiatry. *Austral N Z J Psych*; 35(3): 272–281.

Rasmussen T, B Milner (1977): The role of early left-brain injury in determining lateralization of cerebral speech functions. *Ann N Y Acad Sci*; 299:355–69.

Reckelhoff JF, LL Yanes, R Iliescu, LA Fortepiani, JP Granger (2005): Testosterone supplementation in aging men and women: possible impact on cardiovascular-renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*; 289:F941–8.

Reyes FI, RS Boroditsky, JSD Winter, C Faiman (1974): Studies on human sexual development. II. Fetal and maternal serum gonadotropin and sex steroid concentrations. *J Clin Endoc Metab*; 38:612–617.

Rhy Y, JL Malisch, RM Hannon, PL Hurd, Jr T Garland (2008): Selective breeding for a behavioral trait changes digit ratio. *PLoS One*;3(9):e3216

Rice F, GT Harold, J Boivin, M van den Bree, DF Hay, A Thapar (2010): The links between prenatal stress and offspring development and psychopathology: Disentangling environmental and inherited influences. *Psychological Medicine*; 40:335–345.

Rich-Edwards JW, A Tarayn, BS Grizzard (2005): Psychosocial stress and neuroendocrine mechanisms in preterm delivery. *Am J Obst Gynec*; 192: S30–5.

Rivier C, S Rivest (1991): Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary- gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod*; 45: 523–532.

- Roberts RL, AS Zullo, CS Carter (1997): Sexual differentiation in prairie voles: the effects of corticosterone and testosterone. *Physiol Behav*; 62:1379-83.
- Robinson JD, HL Judd, PE Young, DW Jones, SSC Ye (1977): Amniotic fluid androgens and estrogens in midgestation. *J Clin Endocrinol*; 45: 755–761.
- Robinson SJ, JT Manning (2000): The ratio of 2nd to 4th digit length and male homosexuality. *Evolution and Hum Behavior*; 21:333-345.
- Rodrigues MJ, E Ponciano, C Matias, T Medeiros, R Figueirinha, C Spielberg (2006): Estrutura Factorial de uma versão experimental do STAIC de Spielberg em crianças da Região Autónoma da Madeira. In Tavares J, Pereira A, Fernandes C, Monteiro S (Eds) *Ativação do desenvolvimento psicológico: actas do Simpósio Internacional – Aveiro*: Universidade de Aveiro. Departamento de Ciências da Educação. pp 162-166 ISBN 972-789-191-8
- Rodriguez A, M Kaakinen, I Moilanen, A Taanila, JJ McGough, S Loo, MR Järvelin (2010): Mixed-handedness is linked to mental health problems in children and adolescents. *Pediatrics*; 125:340-348.
- Ronald G, DIW Phillips, KM Godfrey, JT Manning (2002): The ratio of second to fourth digit lengths: a marker of impaired fetal growth? *Early Hum Develop*; 68:21-6.
- Roos A, F Robertson, C Lochner, B Vythilingum, DJ Stein (2011): Altered prefrontal cortical function during processing of fear-relevant stimuli in pregnancy. *Behavioural Brain Res*; 222:200-205.
- Roos A, C Lochner, M Kidd, J van Honk, B Vythilingum, DJ Stein (2012): Selective attention to fearful faces during pregnancy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 37(1):76-80.
- Rosmalen JG, AJ Oldehinkel, J Ormel, AF de Winter, JK Buitelaar, FC Verhulst (2005): Determinants of salivary cortisol levels in 10–12 year old children; a population-based study of individual differences. *Psychoneuroendocrinology*; 30:483-495.
- Rothenberger SE, F Resch, N Dospod, E Moehler (2011): Prenatal stress and infant affective reactivity at five months of age. *Early Hum Develop*; 87:129–136
- Rutter M, J Silberg (2002): Gene–environment interplay in relation to emotional and behavioral disturbance. *Annual Review of Psychology*; 53: 463–490.
- Ryan BC, JG Vandenberg (2002): Intrauterine position effects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*; 26:665-678.
- Salaria S, G Chana, F Caldara, E Feltrin, M Altieri, F Faggioni, E Domenici, E Merlo-Pich, IP Everall (2006): Microarray analysis of cultured human brain aggregates following cortisol exposure: Implications for cellular functions relevant to mood disorders. *Neurobiol Dis*; 23:630–636.
- Sanchez MM, CO Ladd, PM Plotsky (2001): Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev Psychopathol*; 13:419–449.
- Sanders G, M Sjodin, M Chastelaine (2002): On the Elusive Nature of Sex Differences in Cognition: Hormonal Influences Contributing to Within-Sex Variation. *Arch Sexual Behavior*; Vol. 31, No. 1, 145–152.
- Sandman CA, PD Wadhwa, WP Hetrick, M Porto, HVS Peeke (1997): Human fetal heart rate dishabituation between 30–32 weeks gestation. *Child Development*; 68:1031-1040.
- Sandman CA (2010): Human Fetal Heart Rate: a Unique Opportunity to Assess the Fetal Programming Hypothesis. *Inf Child Develop* ; 19: 76-79.
- Sarkar S, SW Tsai, TT Nguyen, M Plevyak, JF Padbury, LP Rubin (2001): Inhibition of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by catecholamines via alpha-adrenergic signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 281(6): R1966-74.
- Sarkar P, K Bergman, NM Fisk, V Glover (2006): Maternal anxiety at amniocentesis and plasma cortisol. *Prenat Diagn*; 26: 505–509.



- Sarkar P, K Bergman, NM Fisk, TG O'Connor, V Glover (2007a): Amniotic fluid testosterone: relationship with cortisol and gestational age. *Clinical Endocrinology*; 67:743–747.
- Sarkar P, K Bergman, NM Fisk, TG O'Connor, V Glover (2007b): Ontogeny of foetal exposure to maternal cortisol using midtrimester amniotic fluid as a biomarker. *Clinical Endocrinology (Oxford)*; 66(5):636–640.
- Sarkar P, K Bergman, TG O'Connor, V Glover (2008): Maternal Antenatal Anxiety and Amniotic Fluid Cortisol and Testosterone: Possible Implications for Foetal Programming. *J Neuroendocrinology*; 20 (4): 489–496.
- Schlottz W, Phillips DI (2009): Fetal origins of mental health: evidence and mechanisms. *Brain Behav Immun*; 23(7):905-16.
- Schmidt-Reinwald A, JC Pruessner, DH Hellhammer, I Federenko, N Rohleder, TH Schurmeyer, C Kirschbaum (1999): The cortisol response to awakening in relation to different challenge tests and a 12-hour cortisol rhythm. *Life Sci*; 64:1653–1660.
- Schneck DJ, DS Berger (2006): *The Music Effect: Music Physiology and Clinical Applications*. Jessica Kingsley Publishers, London.
- Schneider ML, CL Coe, GR Lubach (1992): Endocrine activation mimics the adverse effects of prenatal stress on the neuromotor development of the infant primate. *Dev Psychobiol*; 25:427-439.
- Schoof E, M Girstl, W Frobenius, M Kirschbaum, R Repp, I Knerr, W Rascher, J Dotsch (2001): Course of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase mRNA expression during human gestation. *Eur J Endocrinol*; 145:187-192.
- Schopper H, R Palme, T Ruf, S Huber (2012): Effects of prenatal stress on hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis function over two generations of guinea pigs (*Cavia aperea f. porcellus*). *Gen Comp Endocrinol*; 1;176(1):18-27.
- Seale JV, SA Wood, HC Atkinson, MS Harbuz, SL Lightman (2004): Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *J Neuroendocrinol*; 16: 989–998.
- Seckl JR, MJ Meaney (2006): Glucocorticoid “Programming” and PTSD Risk. *Ann NY Acad Sci*; 1071: 351–378.
- Seckl JR, MC Holmes (2007): Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal programming of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*; 3:479–488.
- Selten J, Y van der Graaf, R Duursen, CCG Weid, RS Kahn (1999): Psychotic illness after prenatal exposure to 1953 Dutch Flood Disaster. *Schizophr Res*; 35: 243-45.
- Selye H (1936): A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*; 138: 32.
- Sidorenko VN (2000): Clinical application of medical resonance therapy music in high-risk pregnancies. *Integr Physiol Behav Sci*; 35, 199–207.
- Siedliecki SL, M Good (2006): Effect of music on power, pain, depression and disability. *J Adv Nurs*; 54, 553–562.
- Siedliecki SL, M Good (2006): Effect of music on power, pain, depression and disability. *J Adv Nurs*; 54: 553–562.
- Sigal JJ, VF DiNicola, M Buonvino (1988): Grandchildren of survivors: can negative effects of prolonged exposure to excessive stress be observed two generations later? *Can. J. Psychiatry*; 33: 207–212.
- Silva DR, R Campos (1999): Alguns dados normativos do Inventário de Estado-Traço de Ansiedade – Forma Y (STAI-Y) de Spielberger para a população portuguesa. *Revista Portuguesa de Psicologia*; 33: 71-89.
- Sinclair AH, P Berta, MS Palmer, JR Hawkins, BL Griffiths, MJ Smith, JW Foster, AM Frischauf, R Lovell-Badge, PN Goodfellow (1990): A gene for the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*; 346: 240-244.
- Smith CA, CT Collins, AM Cyna, CA Crowther (2006): Complementary and alternative therapies for pain management in labour. *Cochrane database of systematic reviews*; 18;(4):CD003521.
- Sontag LW (1941): The significance of fetal environmental differences. *Am J Obstet Gynecol*; 42: 996-1003.

- Sobrian SK, VT Vaughn, WK Ashe, B Markovic, V Djuric, BD Jankovic (1997): Gestational exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. *Environ Res*; 73:227–41.
- Sokal RR and FJ Rohlf. 1995 (3<sup>rd</sup> Ed). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. Freeman and Company, NY, US.
- Sontag LW (1941): The significance of fetal environmental differences. *Am J Obstet and Gynaecol*; 42: 996-1003.
- Sontag LW (1944): Differences in modifiability of fetal behaviour and physiology. *Psychosom Med*; 6:151-4.
- Speroff L, MA Fritz (2005): (7<sup>th</sup> Ed). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Lippincot Williams and Wilkins.
- Spielberger CD, RL Gorsuch, RE Lushene (1970): Manual for the State-Trait Anxiety Inventory. Consulting Psychologists Press, Palo Alto, CA.
- Spielberger CD (1976): *The nature and measurement of anxiety*. In *Cross-Cultural Anxiety* (Spielberger CD & Diaz-Guerrero R eds). Hemisphere, Washington, pp. 3–12.
- Spielberger CDGI, Lushene RE (1983): *Manual for the State–Trait Anxiety Inventory*. Palo Alto, CA: Consulting Psychologists Press.
- Spielberger CD, RL Gorsuch, RE Lushene (1070): *The State-Trait anxiety inventory: Test manual Form X*. Palo Alto, CA: Consulting Psychologists Press.
- Spielberger CD (1983). *State-Trait anxiety inventory: STAI (Form Y)*. Palo Alto CA: Consulting Psychologists Press
- Stein CE, CHD Fall, K Kumaran, C Osmond, V Cox, DJ P Barker (1996): Fetal growth and coronary heart disease in South India. *Lancet*; 348: 1269–73.
- Stott DN (1973): Follow-up study from birth of the effects of prenatal stresses. *Dev Med Child Neurol*; 15: 770-87.
- Stott GH (1981): What is Animal Stress and How is it Measured? *J Anim Sci*; 52:150-153.
- Sun K, K Yang, JRG Challis (1997): Differential expression of 11 hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human placenta and fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab*; 82:300-305.
- Swaab DF, AG-Falgueras (2009): Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation. *Funct Neurol*; 24 (1): 17–28.
- Swerdloff RS, C Wang, S Bhasin (1992): Developments in the control of testicular function. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*; 6 (2): 451–83).
- Talge NM, C Neal, V Glover and the Early Stress, Translational Research and Prevention Science Network Fetal and Neonatal Experience on Child and Adolescent Mental Health (2007): Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J Child Psychol and Psychi*; 48(3-4):245-61.
- Teixeira JMA, NM Fisk, V Glover (1999): Association between maternal anxiety in pregnancy and increased uterine artery resistance index: cohort based study. *BMJ*; 318: 153-157.
- Teixeira J, D Martin, O Prendiville, V Glover (2005): The effects of acute relaxation on indices of anxiety during pregnancy. *J Psychosom Obstet Gynecol*; 26(4): 271-276.
- Teixeira J, J Branco, M AlWturi, S Mohinuddin, O Prendiville, P Steer (2011): Maternal plasma noradrenaline levels at 29 weeks and gestational age at birth. *Arch Gynecol Obstet*; 284(6):1399-402.
- Thaut MH (2005): The future of music in therapy and medicine. *Ann N Y Acad Sci*; 1060:303-308.
- Thompson WR (1957): Influence of prenatal maternal anxiety on emotionality in young rats. *Science*; 125:698-99.
- Tollenaar MS, R Beijers, J Jansen, JMA Riksen-Walraven, C de Weerth (2011): Maternal prenatal stress and cortisol reactivity to stressors in human infants. *Stress*; 14(1):53-65.

- Tomlinson JW, EA Walker, IJ Bujalska, N Draper, GG Lavery, MS Cooper, M Hewison, PM Stewart (2004): 11 - Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1: A Tissue-Specific Regulator of Glucocorticoid Response. *Endocrine Reviews*; 25 (5): 831–866.
- Toricelli M, C Voltolini, L Galleri, G Biliotti, A Giovannelli, M De Bonis, F De Pascalis, G Centini, F Petraglia (2009): Amniotic fluid urocortin, CRF, oestriol, dehydroepiandrosterone sulfate and cortisol concentrations at mid trimester: putative relationship with preterm delivery. *Europ J Obstet Gynec Reprod Biol*;146: 169-173.
- Tortorice JL (2002): Written on the body: Butch/femme lesbian gender identity and biological correlates. PhD Thesis, Rutgers University.
- Trappe HJ (2012): Role of music in intensive care medicine. *Int J Crit Illn Inj Sci*; 2(1):27-31.
- Trivers R, J Manning, A Jacobson (2006): A longitudinal study of digit ratio (2D:4D) and other finger ratios in Jamaican children. *Hormones and Behaviour*; 49:150-6.
- Tsigos C, GP Chrousos (2002): Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosomatic Res*; 53: 865-871.
- Tsivian M, P Qi, M Kimura, VH Chen, SH Chen, TJ Gan, TJ Polascik (2012): The effect of noise-cancelling headphones or music on pain perception and anxiety in men undergoing transrectal prostate biopsy. *Urology*; 79(1):32-6.
- Tucci D (1996): Deafness and disorders of central auditory processing. In: Berg BO (Ed), *Principles of Child Neurology*. McGraw-Hill Companies, Inc, New York, pp 155– 188.
- Turner EH, JAH Wass (2009): (2nd Ed). *Oxford Handbook of Endocrinology and Diabetes*. Oxford University Press.
- Uedo NI, H Ishikawa, K Morimoto, R Ishihara, H Narahara, I Akedo, T Ioka, I Kaji, S Fukuda (2004): Reduction in salivary cortisol level by music therapy during colonoscopic examination. *Hepato-gastroenterology*; 51 (56): 451–453.
- Valeria M, MP Carmine, N Serena, A Monica, DA Alessandro, DF Marta, H Rowena, H Nilay, M Tiago Reis, T Heather, SP Andrew, JA Katherine, MM Robin, D Paola (2010): Higher cortisol levels are associated with smaller left hippocampal volume in first-episode psychosis. *Schizophrenia Res*; 119:75-78.
- van Anders SM (2012): Testosterone and Sexual Desire in Healthy Women and Men. *Arch Sex Behav*; DOI 10.1007/s10508-012-9946-2.
- Van Dongen S, CMA Ten Broek, F Galis, LCD Wijnaendts (2009): No association between fluctuating asymmetry in highly stabilized traits and second to fourth digit ratio (2D:4D) in human fetuses. *Early Hum Develop*; 85(6):393-8.
- Van den Bergh BR, Marcoen A (2004): High antenatal maternal anxiety is related to ADHD symptoms, externalizing problems, and anxiety in 8- and 9-year-olds. *Child Develop*; 75:1085-1097.
- Van den Bergh BRH, Mulder EJH, Mennes M, Glover V (2005): Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review. *Neurosci Biobehav Rev*; 29:237-258.
- Van den Bergh BRH, Van Calster B, Smits T, Van Huffel S, Lagae L (2008): Antenatal Maternal Anxiety is Related to HPA-Axis Dysregulation and Self-Reported Depressive Symptoms in Adolescence: A Prospective Study on the Fetal Origins of Depressed Mood. *Neuropsychopharmacology*; 33(3):536-545.
- Vanderak SD and D Ely (1993): Cortisol, biochemical, and galvanic skin responses to music stimuli of different preference values by college students in Biology and Music. *Perceptual and Motor Skills*; 77: 227-234.
- Veldhuis JD, A Iranmanesh, G Lizarralde, ML Johnson (1989): Amplitude modulation of a burstlike mode of cortisol secretion subserves the circadian glucocorticoid rhythm. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 257: E6-E14.
- Ventura T, Neto MT, Simões M (2009): Efeitos do stress durante a gravidez na morfologia cerebral do feto e da criança - uma revisão. *Progr Diag Trat Prenat*; 21(2):77-84.

- Ventura T, Gomes MC (2010): Análise Descritiva de Parturientes e Recém-Nascidos na Maternidade Hospital Dona Estefânia entre 2005 e 2008. *Acta Med Port*; 23:793-802.
- Ventura T, Gomes MC, Carreira T (2012): Cortisol and anxiety response to a relaxing intervention on pregnant women awaiting amniocentesis. *Psychoneuroendocrinology*; 37(1):148-56.
- Ventura, T (2012): Acção do stress na mulher grávida e sua relação com prematuridade e baixo peso ao nascer, in: Sá, E. (Ed) *Psicologia da Gravidez, do Feto e do Bebê*. Almedina, Coimbra, Portugal (in press).
- Ventura T, MC Gomes, Ana Pita, MT Neto, A Taylor (2013a): Digit ratio (2D:4D) in Newborns and their mothers: influences of prenatal testosterone and maternal environment. *Early Hum Develop*; 89(2):107-12.
- Ventura T, MC Gomes, MT Neto (2013b): Health benefits for the mother and child from music intervention in pregnancy, in "Music: Social Impacts, Health Benefits and Perspectives", Nova Science Publishers, Inc. (Ed), New York (in press).
- Vermeersch H, G T'Sjoen, JM Kaufman, J Vincke (2008): 2d:4d, sex steroid hormones and human psychological sex differences. *Hormones and Behavior*; 54:340-346.
- Viau V (2002): Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *J Neuroendocrinol*; 14: 506-513.
- Voracek M, SG Dressler (2007): Digit ratio (2D:4D) in twins: Heritability estimates and evidence for a masculinized trait expression in women from opposite sex pairs. *Psychological Reports*; 100:115-126.
- Vreeburg SA, WJG Hoogendijk, J van Pelt, RH DeRijk, JCM Verhagen, R van Dyck, JH Smit, FG Zitman, BWJH Penninx (2009): Major Depressive Disorder and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity: Results From a Large Cohort Study. *Arch Gen Psychiatry*; 66:617-626.
- Wachter R, L Masarik, M Burzle, A Mallik, U von Mandach (2009): Differential expression and activity of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase in human placenta and fetal membranes from pregnancies with intrauterine growth restriction. *Fetal Diagn Therapy*; 25:328-335.
- Wadhwa PD, CA Sandman, M Porto, C Dunkel-Schetter, TG Garite (1993): The association between prenatal stress and infant birth weight and gestational age at birth: A prospective investigation. *Am J Obstet Gynecol*; 169:858-65.
- Wadhwa PD, M Porto, TJ Garite, A Chicz-DeMet, CA Sandman (1998): Maternal corticotropin-releasing hormone levels in the early third trimester predict length of gestation in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 179:1079-1085.
- Wadhwa PD, JG Thomas, M Porto, L Glynn, A Chicz-DeMet, C Dunkel-Schetter, CA Sandman (2004): Placental corticotropin-releasing hormone (CRH), spontaneous preterm birth, and fetal growth restriction: A prospective investigation. *Am J Obstet Gynecol*; 191:1063-9.
- Ward IL, J Weisz (1984): Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology*; 114:1635-44.
- Ward IL, KE Stehm (1991): Prenatal stress feminizes juvenile play patterns in male rats. *Physiology and Behavior*; 50:601-605.
- Watkins GR (1997): Music therapy: proposed physiological mechanisms and clinical implications. *Clinical Nurse Specialist*; 11:43-50.
- Watson S, P Gallagher, JC Ritchie, IN Ferrier, AH Young (2004): Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with bipolar disorder. *The British J Psychiatry*; 184:496-502.
- Weinstein DD, D Diforio, J Schiffman, E Walker, R Bonsall (1999): Minor physical anomalies, dermatoglyphic asymmetries, and cortisol levels in adolescents with schizotypal personality disorder. *Am J Psychiatry*; 156:617-623.
- Weinstock M, E Matlina, GI Maor, H Rosen, BS McEwen (1992): Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in the female rat. *Brain Res*; 595, 195-200.

- Weinstock M (1997): Does prenatal stress impair coping and regulation of the hypothalamic-pituitary -adrenal axis? *Neurosci Biobehav Rev*; 21:1-10.
- Weinstock, M (2001): Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Progress in Neurobiology*; 65: 427-51.
- Weinstock M (2005): The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immunity*; 19:296-308.
- Weinstock M (2007): Gender Differences in the Effects of Prenatal Stress on Brain Development and Behaviour. *Neurochem Res*; 32:1730-1740.
- Weinstock M (2008): The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosc and Biobehav Rev*; 32:1073-1086.
- Weiss G (2000): Endocrinology of Parturition. *J Clin Endoc Metab*; 85 (12):4421-25.
- Weitzman ED, D Fukushima, C Nogueira, H Roffwarg, TF Gallagher, L Hellman (1971): Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*; 33:14-22.
- Welberg LA, JR Seckl, MC Holmes (2000): Inhibition of 11betahydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *Eur J Neurosci*; 12:1047-1054.
- Werner LA (1998): Early development of the human auditory system. In: Poland RA, Fox NW, WB (Eds.), 2nd Edition. *Fetal and Neonatal Physiology*; vol 2. Saunders Company, Philadelphia, pp 2255-2276.
- WHO, 2012. *BMI classification*. Disponível em [http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html) consultado em Julho 2012.
- Wilhelm I, J Born, BM Kudielka, W Schlotz, S Wust (2007): Is the cortisol awakening rise a response to awakening? *Psychoneuroendocrinology*; 32:358-366
- Williams JH, KD Greenhalgh, JT Manning (2003): Second to fourth finger ratio and possible precursors of developmental psychopathology in preschool children. *Early Hum Develop* ; 72:57-65.
- Williams TJ, ME Pepitone, SE Christensen, BM Cooke, AD Huberman, NJ Breedlove, et al(2000): Finger-length ratios and sexual orientation. *Nature*; 404:455-6.
- Wilson G D (1983): Finger-length as an index of assertiveness in women. *Personality and Individual Differences*; 4(1):11-2.
- Winter JSD, IA Hughes, FI Reyes, C Faiman (1976): Pituitary-gonadal relations in infancy: 2. Patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to two years of age. *J Clin Endocrinol Metab*; 42:679-686.
- Yang M, L Li, H Zhu, IM Alexander, S Liu, W Zhou, X Ren (2009): Music therapy to relieve anxiety in pregnant women on bedrest: a randomized, controlled trial. *MCN Am J Matern Child Nurs*;34(5):316-23.
- Yildirim G, NH Sahin (2004): The effect of breathing and skin stimulation techniques on labour pain perception of Turkish women. *Pain Res Manage*; 9(4):183-7.
- Zar, JH. 2007 (5ª Ed). *Biostatistical Analysis*. Pearson Int Ed.
- Zarrow MO, J Philpott, V Denenberg (1970): Passage of 14C-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. *Nature*;226:1058-9.
- Zheng Z, MJ Cohn (2011). Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios. *PNAS USA*, 108, 16289-16294.
- Zevedic NMA, S Rakic, M Marin-Padilla (1999): Early development and composition of the human primordial plexiform layer: An immunohistochemical study. *J Comp Neurol*; 412(2): 241-54.
- Zhu P, F Tao, J Hao, Y Sun, X Jiang (2010): Prenatal life events stress: implications for preterm birth and infant birthweight. *Am J Obstet Gynecol*; 203(1): 34.e1-8.
- Zouboulis CC, K Degitz (2004): Androgen action on human skin -- from basic research to clinical significance. *Exp Dermatol*; 13 Suppl 4:5-10.

## **8. Apêndices**

---

---

## **Índice de Apêndices**

### Anexo I.

Tamanho da Amostra.....	179
-------------------------	-----

### Anexo II.

Procedimentos laboratoriais.....	183
----------------------------------	-----

Acordo de Transferência de Materiais (HDE/King's College).....	191
--	-----

### Anexo III.

Documentos.....	197
-----------------	-----

1. Autorizações Comissão de Ética

2. Folha de recrutamento

3. Folha de Consentimento Informado (Fases 1 e 2)

4. Folha de Registo de Dados

5. Conteúdo das Músicas

6. Registo de Inventário de Ansiedade (STAI)

7. Folhas de contagem de resultados do STAI

## ANEXO I

Metodologia para determinação do tamanho da amostra.

O tamanho mínimo da amostra para um estudo experimental, depende das perguntas do investigador e das análises que são feitas para responder a essas perguntas. Neste estudo efectuaram-se dois tipos principais de análises estatísticas:

A. Comparações entre médias. Por exemplo, no Capítulo 4 compara-se a variação média no nível de cortisol plasmático em três grupos de mulheres – as que ouviram música, as que leram revistas e as que se sentaram na sala de espera. Ao longo do estudo foram comparadas também médias de variáveis psicológicas, de níveis hormonais, etc. A comparação entre médias é em geral efectuada recorrendo a análise de variância (ANOVA), sendo o teste t-student um caso particular da ANOVA para comparar duas médias apenas.

B. Exploração de associações entre variáveis, em geral através de coeficientes de correlação bivariados ou parciais. Os primeiros são calculados directamente entre duas variáveis (o mais comum, coeficiente de correlação de Pearson) e os segundos são em geral estimados indirectamente a partir dos coeficientes de regressão de modelos de regressão múltipla.

### *Análises do tipo A – comparação entre médias*

O problema do tamanho da amostra pode formular-se nos seguintes termos: se existe diferença (D) entre as médias dos k grupos sob comparação, qual o tamanho mínimo que a amostra deve ter para se conseguir demonstrar, com probabilidade P, que existe a diferença? P é a chamada potência do teste estatístico que será efectuado. A resposta a esta pergunta depende de D, de P e do desvio-padrão da variável que está a ser avaliada. Variáveis com desvio-padrão maior requerem amostras maiores e vice-versa. A expressão matemática apropriada para determinar a amostra é (Sokal and Rohlf 1995):

$$n \geq 2 \left( \frac{\sigma}{D} \right)^2 [t_{\alpha, v} + t_{2(1-P), v}]^2 \quad [A1]$$

Onde,

n é número de réplicas a usar em cada um de k grupos cujas médias estão em comparação. O tamanho total da amostra é N= nk. A expressão pressupõe que n é aproximadamente igual em todos os grupos.

D é a diferença mínima que se pretende detectar entre duas médias, caso ela exista.

$\sigma$  é o desvio-padrão da variável que está a ser avaliada

$t_{\alpha, v}$  e  $t_{2(1-P), v}$  são valores tabelados da distribuição t-student com duas caudas para v graus de liberdade e correspondente às probabilidades  $\alpha$  e (1-P), respectivamente.

$\alpha$  é a probabilidade de rejeitar a hipótese nula ( $H_0$ : as médias são iguais) quando esta é verdadeira, também conhecida por nível de significância; adopta-se  $\alpha=0.05$ .



$P$  é a potência do teste. É a probabilidade de se detectar a diferença entre as médias sob comparação, caso essa diferença seja igual a  $D$  ou maior.

$v = k(n-1)$ , número de graus de liberdade, sendo  $k$  o número de médias sob comparação.

O valor do desvio-padrão não é conhecido à partida, mas pode ser estimado a partir de uma amostra-piloto preliminar, tomada especificamente para conseguir uma estimativa preliminar de  $\sigma$  e, usando a equação [A1], determinar o tamanho final da amostra. Neste estudo, tomou-se uma amostra piloto constituída pelas primeiras 40 mulheres que entraram no estudo. A título exemplificativo, apresenta-se na Tabela I-1 os valores médios e respectivos desvio-padrões de algumas variáveis relevantes medidas nas primeiras 40 mulheres estudadas.

Tabela I-1. Médias e desvio-padrões de algumas variáveis medidas na amostra-piloto de 40 mulheres. A 1ª medição foi efectuada antes da intervenção e a variação é a diferença entre a 2ª medição (pós-intervenção) e a 1ª medição.

	1ª medição				Variação (= Depois - Antes) do relaxamento			
	Cortisol	Testosterona	S-STAI	Pulso	Cortisol	Testosterona	S-STAI	Pulso
média	680,4	1,75	43,4	83,9	-23,9	-0,09	-6,5	-4,85
desvio-padrão	242,4	0,97	12,8	10,3	133,6	0,48	9,98	7,41

O desvio-padrão de qualquer variável na Tabela I-1 pode ser usado para estimar o tamanho da amostra,  $n$ , recorrendo à equação [A1]. Por exemplo, para determinar o tamanho da amostra que, com potência  $P$ , detecta a diferença  $D$  entre as variações de cortisol causadas por dois estímulos de relaxamento, usa-se 133.6. A Tabela I-2 apresenta o tamanho da amostra para várias combinações de potência e de  $D$  mínimo a detectar entre a média das variações de cortisol nos três grupos de relaxamento. Por exemplo, se se pretende detectar com 80% de probabilidade uma diferença na variação de cortisol entre dois grupos que seja  $D = 70$  nmol/L ou maior, o número de mulheres *em cada grupo* deve ser  $n = 58$  ou superior. Note-se que o tamanho da amostra aumenta rapidamente quando o grau de exigência ( $D$  mais pequeno) aumenta.

Tabela I-2. Tamanho da amostra (em cada grupo de intervenção) para combinações de potência ( $P$ ) e de diferença mínima ( $D$ ) que se pretende detectar entre as médias das variações de cortisol.

$P$	D (em nmol/L) a detectar com probabilidade $P$							
	30	40	50	60	70	80	90	100
75	279	157	100	70	51	39	31	25
80	315	177	113	79	58	44	35	28
85	360	203	130	90	66	51	40	32
90	422	237	152	105	77	59	47	38

A Tabela I-3 apresenta resultados equivalentes, mas para a variação no S-STAI de Spielberger.

Tabela I-3. Tamanho da amostra (em cada grupo de intervenção) para várias combinações de potência ( $P$ ) e da diferença mínima a detectar entre as médias das variações do S-STAI de Spielberger.

$P$	D (em pontos do S-STAI) a detectar						
	2	3	4	5	6	7	8
75	350	156	88	56	39	29	22
80	396	176	99	63	44	32	25
85	453	201	113	72	50	37	28
90	530	236	133	85	59	43	33

#### *Análises do tipo B - associação entre variáveis*

Em análises do tipo B, a abordagem ao problema varia consoante o objectivo é detectar um coeficiente de correlação múltipla  $R$  significativamente diferente de zero, ou se o principal objectivo é conseguir que certos coeficientes de correlação individuais ( $R_j$ ) sejam precisos, isto é, tenham intervalos de confiança estreitos. As duas abordagens só são idênticas na situação mais simples em que se investiga correlação entre a variável dependente e uma só variável independente. Em consequência desta diversidade de interesses (e suas ramificações descritas na literatura), existem muitos métodos de estimação do tamanho da amostra necessária para demonstrar associação entre variáveis, as quais variam de simples regras práticas a métodos computacionais sofisticados (Cohen 1988, Green 1991, Kelley and Maxwell 2003).

O caso mais simples é aquele em que se investiga correlação entre duas variáveis. O problema pode-se formular da seguinte forma: se no mundo real a correlação entre as variáveis  $X$  e  $Y$  é diferente de zero,  $r_{XY} \neq 0$ , qual o tamanho mínimo que uma amostra deve ter para se conseguir demonstrar, com probabilidade  $P=(1-\beta)$ , que  $r_{XY}$  é maior que uma correlação pré-especificada diferente de zero,  $|r_0|$ ? A expressão que responde a esta pergunta, para testes de duas caudas, é a seguinte (Cohen 1988, Sokal and Rohlf 1995):

$$n \geq \left( \frac{t_{2\beta, \infty} + t_{\alpha, \infty}}{\theta} \right)^2 + 3 \quad [A2]$$

Onde,

$n$  é o tamanho da amostra mínimo que deve ser usado para se calcular o coeficiente de correlação. Este  $n$  garante que, com probabilidade  $P$  (= potência) e um nível de significância  $\alpha$ , se consegue detectar um valor mínimo de correlação  $|r_0|$  como sendo estatisticamente significativo.

$t_{2\beta, \infty}$  é o valor tabelado da distribuição t-student para o nível de significância  $2\beta$  e infinitos graus de liberdade. Por exemplo, se a potência pretendida for de  $p=80\%$ , então  $2\beta=0.4$  e uma tabela do t-student indica que  $t_{0.4, \infty}=0.842$ ; se a potência

pretendida fôr de  $p=90\%$ , obtem-se  $t_{0,2,\infty}=1.282$ . Para testes de 1 cauda, usar  $t_{\beta,\infty}$  em vez de  $t_{2\beta,\infty}$ .

$t_{\alpha,\infty}$  é o valor tabelado da distribuição t-student para o nível de significância  $\alpha$  e infinitos graus de liberdade. Por exemplo, se  $\alpha=0.05$ , então  $t_{\alpha,\infty}=1.96$ .

$\theta$  é a chamada transformação de Fisher do valor mínimo da correlação que se pretende ser capaz de detectar  $|r_0|$ . Algebricamente,  $\theta = 0.5 \ln \left( \frac{1+r_0}{1-r_0} \right)$ .

A Tabela I-4 apresenta o tamanho da amostra para várias combinações de potência (entre 75 e 90%) e de valor mínimo do coeficiente de correlação que se pretende detectar. Por exemplo, se se pretende detectar um coeficiente de correlação igual ou maior que  $r_0 = 0.25$  com 80% de probabilidade, deve-se ter uma amostra com pelo menos  $n=123$  mulheres.

Tabela I-4. Tamanho da amostra para várias combinações de potência ( $P$ ) e do coeficiente de correlação mínimo que se pretende detectar, na situação em que só há uma covariável independente.

$P$	$r_0 =$ correlação mínima a detectar					
	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4
75	307	172	109	75	55	42
80	347	194	123	85	62	47
85	396	221	141	97	70	53
90	463	259	164	113	82	62

### Conclusão

Os resultados sugerem que uma amostra total com  $n=180$  deve poder detectar diferenças moderadas entre médias, com pelo menos 85% de potência, para variáveis de natureza tão díspar como o nível hormonal e a resposta a testes psicológicos. A mesma dimensão amostral aparenta também poder detectar, com potência superior a 80%, associações globais moderadas ou fortes entre as principais variáveis.

### Literatura sobre o tamanho da amostra

- Cohen J. 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2<sup>nd</sup> Ed. Hillsdale, NJ, Erlbaum.
- Green SB. 1991. How many subjects does it take to do a regression analysis? *Multivariate Behavioral Research* 26:499-510.
- Kelley K and SE Maxwell. 2003 Sample size for multiple regression: obtaining regression coefficients that are accurate, not simply significant. *Psychological Methods* 8(3):305-321.
- Sokal RR and FJ Rohlf. 1995. 3<sup>rd</sup> Ed. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. Freeman and Company, NY, US.

## ANEXO II Procedimentos laboratoriais

Descrevem-se em seguida os procedimentos levados a cabo nos laboratórios do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (DQB-FCUL) referentes à Fase I do estudo.

### 1. Colheitas

Após aplicação de soluto anti-séptico e *spray* de xilocaína a 1%, era efectuada punção com cateter intravenoso 20G Neo Delta Ven T (Delta Med<sup>®</sup>) numa veia periférica do antebraço, por forma a obter os primeiros 4,9ml de sangue colectado num tubo de polipropileno S-Monovette de 90x13 mm heparinizado (Sarstedt<sup>®</sup>) com adaptador múltiplo conectado (Sarstedt<sup>®</sup>). O adaptador ficava depois unido ao cateter e fixado com adesivo hipoalérgico ao antebraço da grávida. Em seguida eram introduzidos por seringa com adaptador de membrana (Sarstedt<sup>®</sup>), através do cateter, 1-2 ml de soro fisiológico esterilizado para limpeza do mesmo e, após conclusão do período de música/revista/sala de espera, era aspirado eventual soro fisiológico residual e obtida uma segunda colheita de sangue pelo mesmo cateter para novo tubo colector de 4,9 ml.

Para as conexões do cateter com os tubos colectores e a seringa foram utilizados respectivamente adaptador múltiplo para S-Monovette, e adaptador de membrana, ambos embalados individualmente e esterilizados (Sarstedt<sup>®</sup>).

### 2. Plasma das amostras sanguíneas

Imediatamente após as colheitas, o sangue materno em contentor heparinizado com 16 UI de heparina de lítio por ml de sangue, foi centrifugado numa centrífuga *Megafuge 2.0R*, *Heraeus Sepatech* a 3,000xg durante 10 min para separação do plasma. Este era depois dividido com pipetas descartáveis de 3,5 ml em 4 tubos de polipropileno de 1ml (Sarstedt<sup>®</sup>) e colocado em contentor de gelo a - 4º C (1 a 5 horas) até armazenamento a -80ºC para posterior processamento analítico.

### 3. Métodos bioquímicos de doseamento no plasma

A medição quantitativa no plasma dos níveis de cortisol total e de testosterona total foi feita no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (DQB-FCUL), por testes de radioimunoensaio *standard* (RIA) utilizando tubos revestidos Spectria RIA<sup>®</sup> da Orion Diagnostica (Finland), específicos para as hormonas em estudo. Em

cada ensaio clínico, o número necessário de amostras do plasma a analisar era removido da arca frigorífica e deixado atingir a temperatura ambiente, sendo esse número condicionado pela utilização completa de cada kit de cortisol ou de testosterona (22 participantes por kit).

Os testes Spectria cortisol e Spectria testosterona RIA da Orion Diagnostica, são tubos de radioimunoensaio revestidos com anticorpo (Ac) marcado, desenhados para medição quantitativa *in vitro* de concentrações respectivamente de cortisol e de testosterona no plasma humano. O procedimento Orion para ambos é uma fase sólida de RIA com um kit comercial (Orion Spectria cortisol RIA e Orion Spectria testosterona RIA) que era catalogado.

### 3.1. Radioimunoensaio

Este método utiliza isótopos radioactivos como marcadores dos antígenos (Ag) ou anticorpos no processo de imunanalise. Podem ser utilizadas duas técnicas:

1. competitiva standard - adição de reagente “limitado” com antígeno marcado
2. não competitiva (IRMA) – adição de reagente em “excesso” com anticorpo marcado

Ambos os métodos têm alta precisão, sensibilidade e estabilidade, sendo a sua principal desvantagem a curta semi-vida dos reagentes, condicionando tempos de validade muito limitados para os kits. Os limites de detecção (sensibilidade) estão condicionados pela união específica do anticorpo marcado, sua afinidade e pela execução de todo o procedimento (pipetagem e separação).

O Iodo 125 (<sup>125</sup>I) permite obter uma actividade específica muito eficaz e tem uma vida média curta, aspectos que lhe conferem vantagens sobre outros isótopos. Emite radiações gama que são medidas em contagens por minuto (CPM) no contador gama. Este é um detector de radioactividade equipado com sistema de contagem de impulsos e lê a actividade relativa resultante final do processamento das amostras. Há necessidade de uma execução técnica rigorosa e criteriosa em todos os procedimentos, de acordo com as instruções.

### 3.2. Preparação e armazenamento do reagente

Os reagentes e tubos revestidos foram fornecidos prontos para usar com plasma. O kit era guardado a 4°C e os reagentes mantinham-se estabilizados até 30 dias depois de abertos. Os tubos revestidos por anticorpos eram armazenados em sacos fechados. O kit RIA era posto à temperatura ambiente antes de usar.

### 3.3. Calibração

O calibrador é composto por uma matriz de plasma humano para a qual já foram determinadas e ajustadas as diferentes concentrações da substância a investigar e cuja curva consta no kit, para aferir qualidade. A gama de concentrações do calibrador respeita os valores fisiológicos e patológicos conhecidos para aquela substância. Tendo uma concentração conhecida, é possível traçar a curva de calibração a partir da qual se determina a concentração das amostras em investigação. A quantidade de calibrador a colocar em cada amostra é indicada pelo fabricante (25µl para a testosterona, 20µl para o cortisol). Os tubos para contagem total (“totais”) só contêm iodo radioactivo e solução de testosterona num tampão fosfato.

“Contagens totais” é o valor das leituras em contagem por minuto (CPM) do mesmo volume de solução contendo o Ag marcado (Ag\*) adicionado a cada grupo. Constitui um parâmetro de controlo de qualidade do kit, reflectindo o estado de decaimento nuclear do Ag\*.

Máximo de ligação (BO ou BM –), corresponde à leitura do calibrador zero, porque existe ausência do Ag a pesquisar e, por isso, ocorre um máximo de ligação do Ag\*. As percentagens de calibração são calculadas dividindo o valor em CPM dos calibradores, controlos e amostras por esse valor e multiplicando por 100. O resultado deve rondar os 35-40%, é um parâmetro de qualidade do kit e reflecte a eficácia da ligação Ag\*-Ac.

A validação das curvas de calibração, com a leitura dos totais e dos padrões específicos para a molécula em causa, pretende verificar se existe concordância entre o valor esperado e o valor obtido, sendo o primeiro passo em qualquer leitura amostral. Segue-se-lhe a leitura das amostras das pacientes, com valores desconhecidos. Todas as leituras são feitas em duplicado, procurando respeitar coeficientes de variação (CV) que não ultrapassem os 4,5% entre as réplicas. Caso os CV ultrapassem esse valor, deve ser reavaliado todo o processo (pipetagem, decantação, etc) e os ensaios repetidos com novas condições ajustadas.

### 3.4. Sequência de procedimentos

1º colocar amostras e kit à temperatura ambiente

2º numerar os tubos (revestidos com anticorpos policlonais de coelho para o cortisol ou para a testosterona) “totais”, os tubos calibradores, os tubos para as amostras em estudo

3º pipetar a quantidade de calibrador (matriz de plasma humano com quantidades conhecidas de produto a analisar) e de amostras das pacientes (25µl para a testosterona, 20µl para o cortisol) dentro dos tubos respectivos; os tubos “totais” permanecem vazios

4º adicionar 500 µl de tracer, que contém anticorpo marcado, (vermelho cortisol, amarelo testosterona) a todos os tubos

5º agitar brevemente cada tubo num misturador vortex

6º cobrir os tubos, colocados num suporte, com parafilme e incubar (cortisol 2 horas, testosterona 1 hora) num banho de água a 37ºC

7º decantar todos os tubos excepto os totais e escorrer completamente o restante batendo em papel absorvente

8º lavar uma vez com 1 ml de água destilada. A decantação seguida de lavagem tem por objectivo separar a fracção ligada da fracção livre.

9º abanar e decantar novamente todos os tubos, excepto os “totais”. Bater firmemente contra papel absorvente e deixar 5 min invertidos sobre o papel para não ficarem resíduos de água

10º colocar os tubos em suportes do contador gama (*Berthold LB2111*) de acordo com as numerações e fazer a contagem durante cerca de um min para cada tabuleiro ou até se terem acumulado 10000 contagens por tubo

11º imprimir os resultados



Figura II-1. Laboratórios do DQB-FCUL. Topo-fundo e esquerda-direita: tubos com amostras catalogadas, pipetagens das amostras e do tracer, junto ao aparelho de RIA, aparelho de RIA.

### 3.5. Controlo de qualidade

O controlo de qualidade em todos os ensaios foi assegurado pelos engenheiros da ARIUM Diagnóstico Lda, empresa fornecedora dos tubos revestidos Spectria cortisol RIA® da Orion Diagnostica (Finland).

Para cada série de amostras foi executada uma curva de calibração a fim de se eliminarem factores impossíveis de controlar e que influenciam a referida curva e os resultados que dela resultam em cada uma das suas execuções: estado de decaimento do isótopo radioactivo, temperatura ambiente, tempo de reacção, estado imunológico dos reagentes.

As medições neste tipo de ensaios são medições estatísticas. Por isso, e para assegurar uma maior proximidade possível com a realidade, as curvas de calibração, controlos e amostras foram sempre executadas em duplicado, possibilitando que os seus valores tenham significado estatístico. O cálculo dos valores dos coeficientes de variação (CV) entre replicas, ajudam na avaliação do equipamento e do executante, assegurando um elevado nível de confiança e qualidade nos resultados produzidos. Os CV mantiveram-se dentro de limites recomendados e foram repetidos doseamentos pontualmente quando tal não aconteceu. Foram sempre respeitados os prazos de validade, utilizadas pipetas de precisão pré-calibradas e foi assegurado o descongelamento integral das amostras e sua homogeneização para evitar diferenças de concentração no produto a dosear.

Os protocolos de execução preconizados pela Orion Diagnostica foram sempre rigorosamente cumpridos.

### 3.6 Cortisol

Os kits contêm 100 tubos revestidos com menos de 5.5 microcuries de anticorpos de coelho policlonais anti-cortisol, marcados com Iodo 125 radioactivo. Os testes baseiam-se nos princípios de competitividade dos ensaios de radioimunodiagnóstico: uma quantidade conhecida de cortisol marcado com o isótopo e uma quantidade desconhecida de cortisol não marcado (antigénio) na amostra de plasma da paciente competem para o numero limitado de locais de ligação aos anticorpos que revestem os tubos Spectria. O Iodo dos anticorpos do tubo compete durante um tempo fixo (2 horas a 37°C) com o cortisol na amostra da paciente. Depois de lavar com água destilada os antigénios restantes não ligados ao revestimento do tubo, a quantidade de cortisol marcado no tubo é inversamente proporcional à quantidade de cortisol na amostra. Uma vez que o cortisol está imobilizado na parede do tubo de polipropileno, decantar o sobrenadante é suficiente para terminar a competição, e para isolar a fracção de ligação ao anticorpo do cortisol radioactivo marcado. Contar o tubo numa câmara



de contagens de raios gama, resulta num número que se converte por uma curva de calibração de radioactividade *versus* concentrações standard, a uma medida do componente na amostra da paciente. A curva standard, obtida para cada kit, relaciona uma determinada quantidade de radioactividade medida em amostras “conhecidas” com a concentração previamente determinada nessas amostras da substância em causa. A curva de calibração é obtida a partir das amostras “conhecidas” com quantidades crescentes do antigénio em causa, que contêm a radioactividade em quantidades escolhidas para expandir a gama das concentrações esperadas nas amostras das pacientes, ou seja, a diferença entre o valor maior e o mais pequeno (totais, 0, 20, 75, 500 e 2000 nmol/l em soro humano). As concentrações nas amostras desconhecidas (das participantes a serem estudadas) são obtidas a partir dessa curva de calibração (Ver 3.5. Calibração).

A curva standard era obtida colocando a quantidade da amostra (eixo das ordenadas) *versus* a concentração (eixo das abcissas). Esta curva era depois usada para determinar as concentrações de cortisol nas amostras das pacientes. Os resultados (em nanomoles) de cortisol por 1000 ml (nmol/L) eram lidos directamente da curva do calibrador.

Os requerimentos básicos para um sistema de radioimunoensaio são, pois, um antisoro para o cortisol nas amostras das doentes, presença de cortisol radioactivo marcado e um método onde o marcador ligado aos anticorpos possa ser separado do marcador não ligado.

O antisoro do cortisol usado pelo Spectria cortisol é altamente específico para o cortisol, com muito baixa reactividade cruzada para outros componentes. A solução de cortisol iodado também contém agentes bloqueadores para as proteínas de ligação aos esteroides, e assim o método mede o cortisol total na amostra. Proteínas, bilirrubina ( $\leq 385 \mu\text{mol/l}$ ) e hemólise ( $\text{Hb} \leq 6 \text{ g/l}$ ), não têm nenhum efeito significativo no teste.

Em resumo, esta técnica oferece elevada confiança devido à metodologia do tubo revestido. Além disso, o teste é realizado mais rapidamente do que com métodos mais tradicionais, devido ao facto de os tubos poderem ser decantados sem perda do material de ligação aos anticorpos.

#### Literatura específica dos métodos laboratoriais para cortisol

Grosling J et al. 1993. Standardization of hapten immunoprocudures: total cortisol. *Scand J Clin Lab Inv*, 53. Suppl 216: 3-41

Moore A et al. 1985. Cortisol assays: guidelines for the provision of a clinical biochemistry service. *Ann. Clin. Biochem.* 22: 435-54

Pescovitz O et al. 1990. Synthesis and secretion of corticosteroides. In: Becker K (Ed) *Principals and practice of endocrinology and metabolism*. JB Lippincott Company, New York, 579:91

Solbergh H. 1983. IFCC 1983/85: The theory of reference values. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 21, 749-60

### 3.7 Testosterona

Os kits contêm 100 tubos revestidos com menos de 5.5 microcuries de anticorpos policlonais de coelho anti-testosterona marcados com Iodo 125 radioactivo. Os princípios dos testes de competitividade das análises por radioimunoensaio já descritos para o cortisol, são igualmente aplicados para a testosterona. Apenas algumas diferenças se realçam:

O iodo dos anticorpos do tubo compete durante 1 hora a 37°C com a testosterona na amostra da paciente. A curva de calibração é obtida a partir das amostras “conhecidas” com valores adequados à expansão da gama normal e patológica (totais, 0, 0.5, 1.5, 5, 15 e 50 nmol/l em soro humano), que contêm a radioactividade com quantidades crescentes do antigénio conhecido para a testosterona. O antisoro da testosterona usado pelo Spectria testosterona RIA é altamente específico para a testosterona, com baixa reactividade cruzada para outros componentes. A solução de testosterona iodada também contém agentes bloqueadores para as proteínas de ligação aos androgénios, pelo que o método mede a testosterona total na amostra. Proteínas, bilirrubina ( $\leq 340 \mu\text{mol/l}$ ) e hemólise ( $\text{Hb} \leq 2 \text{ g/l}$ ), também não têm nenhum efeito significativo no teste.

#### Literatura específica dos métodos laboratoriais para testosterona

Karp L et al. 1973. Diagnosis and Treatment of Hirsutism in Women. *Obstet Gynecol* 41:283-94

Osborn RH et al. 1973. Plasma androgens in the normal and androgenic female: A review. *Obstet Gynec* 26:195-228

Vermeulen A. 1977. Transport and Distribution of androgens at different ages. In: L Martini and M Motta (Eds) *Androgens and antiandrogens*. Raven Press, New York. 53

Carstrom K et al. 1988. *Assay of reproductive hormones, when and how*. IFCC and Farnos Diagnostica, Turku 2<sup>nd</sup> edition, ISBN 951-99839-6-2, 28-34

Kailajarvi M et al. 2000. Alterations in laboratory test results during adjuvant breast cancer treatment. *Clin Chem Lab Med* 38:443-51

### 4. Doseamentos no Líquido Amniótico (LA)

Na FCUL foram tentados os métodos de extracção no LA com diclorometano e dietiléter, respectivamente para o cortisol e para a testosterona, de acordo com protocolo gentilmente cedido por Diana Adams, do *Fetal and Neonatal Stress Research Group*, do Imperial College, Londres. No entanto, dada a exigente complexidade da técnica e os laboratórios disponíveis serem usados por alunos e nunca nos ser atribuído o mesmo, não foi possível reunir as condições para a realização desta técnica. Assim, foi efectuado um protocolo entre o HDE e o King's College, assinado entre as partes no dia 7 de Março de 2011 (vêr final de procedimentos laboratoriais), e todos os doseamentos no LA foram feitos na *School of Biomedical Sciences*

*King's College*, em Londres. Para medir a concentração de cortisol e testosterona extraídos de amostras de LA, usou-se cromatografia líquida de ultra pressão e espectrometria de massa, de acordo com um procedimento recente, descrito por Kulle et al (2010).

Segue-se descrição do método tal como nos foi enviado pelos executantes.

#### *Method*

Ultra-pressure LC-MS/MS was used to measure the concentration of cortisol and testosterone extracted from the amniotic fluid samples.

Calibrants and amniotic fluid samples were transferred into microcentrifuge tubes, 20  $\mu$ l internal standards and 500  $\mu$ l samples were added to each test tube. All samples were diluted with 500  $\mu$ l of 5 % phosphoric acid and centrifuged for 5 minutes at 14,000 rotations per min (ambient temperature). The Oasis HLB 1cc (30 $\mu$ g) extraction cartridges were conditioned using 1 ml methanol and made sure all the extraction cartridges were dried out when placed in the pressure machine; equilibrated with 1 ml water and pressure was applied again to make sure all the extraction cartridges were completely dried out. Samples of 1 ml were loaded into the extraction cartridges; followed with 1 ml of 10 % of ammonia and 1 ml of 10 % methanol for wash. Elution of analytes was done using 500  $\mu$ l isopropanol; this process was repeated. The extracts were dried under nitrogen in the drying tubes for 30 minutes in a water bath at 40  $^{\circ}$ C. The extracts in the drying tubes were kept in a cold room at 4  $^{\circ}$ C until reconstitution. The dried extracts were reconstituted in 100  $\mu$ l of 0.1 % formic acid in 50 % methanol and transferred into injection vials.

Accuracy studies were assessed by spiked recovery: samples were spiked at different concentrations (0.5 ng/ml for testosterone and 2 ng/ml for cortisol).

#### *Reference:*

Kulle AE, Riepe FG, Melchior D, Hiort O, Holterhus PM (2010): A Novel Ultrapressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Androstenedione, Testosterone, and Dihydrotestosterone in Pediatric Blood Samples: Age- and Sex-Specific Reference Data. *J Clin Endocrinol Metab*;95(5):2399-2409.

## MATERIALS SUPPLY AND USE AGREEMENT

Ethical Approval Number:

This Agreement is made on the 7<sup>th</sup> day of March 2011.

### BETWEEN

- (1) **Dona Estefania Hospital**, Rua Jacinta Marto, 1169-045, Lisboa, Portugal ("the Hospital")
- (2) **KING'S COLLEGE LONDON**, whose principal place of business is situated at London, WC2R 2LS, England ("the Institution").

In respect of the following Material:

- (3) Frozen amniotic samples in 1ml aliquots.

### WHEREAS

- (A) The hospital, through its employee Dr. Teresa Ventura, Consultant Obstetrician (the "Supplier's Scientist"), has obtained and developed the Material.
- (B) The Institution and more specifically the Recipient named below wishes to obtain the Material for the purposes of collaborative academic research (the "Programme") only.
- (C) The Hospital agrees to provide the Material on the terms set out below.

### NOW IT IS HEREBY AGREED AS FOLLOWS

#### 1. DEFINITIONS AND INTERPRETATION

- 1.1 In this agreement the following words and phrases shall have the following meanings unless the context requires otherwise:

"Effective Date" means the date first above written.

"Institution" means the Institution wishing to access the Material.

"Material" means any and all tissue, sera, plasma and DNA, any progeny, subunits, derivatives, modifications or improvements thereof and includes, but not limited to, any and all clinical information associated with the Materials and any and all data supplied by The Hospital to the Institution and/ or the Recipient as specified in Schedule 1.

"Programme" means the specific research set out in Schedule 2.

“Recipient” means Dr. Alyx Taylor-Vieira.

## **2. ACCESS TO AND USE OF MATERIALS**

- 2.1 The Recipient at the Institution wishes to undertake research as specified in the Programme in Schedule 2.
- 2.2 The Hospital agrees to supply the Material as specified in Schedule 1 and the Recipient at the Institution shall use the Material solely within the Recipient’s laboratory for the Programme and not for any commercial purpose or commercially-sponsored research or other research purpose, even if those purposes are being pursued in the Recipient’s laboratory, without the prior written consent of The Hospital.

For the avoidance of doubt the use of the Material shall be subject to the provisions of this Agreement and shall be in compliance with all applicable laws, governmental regulations and guidelines relating to research with the Material in force in the country where the Material is used. For the United Kingdom, all such laws, regulations and guidelines includes, but is not limited to, the Human Tissue Act 2004 (<http://www.opsi.gov.uk/acts/acts2004/20040030.htm>), as amended or re-enacted, in force from time to time and the MRC Guidelines on Use of Human Tissue and Biological Samples for use in Research (<http://www.mrc.ac.uk/PolicyGuidance/EthicsAndGovernance/UseofHumanTissue/index.htm>).

- 2.3 The Material shall at all times remain the property of The Hospital and will not be removed from the Institution’s address. No licence under any The Hospital’s intellectual property is granted or implied by this Agreement.

2.4 In the event that the Recipient makes or observes any new discovery, improvement or invention (“Invention”) relating to the Material or as a direct result of the Programme then the Institution shall notify The Hospital within forty five (45) days of making or observing such Invention and The Hospital shall treat such information as confidential to the Institution. In addition, the Institution will provide to The Hospital at monthly intervals reports detailing the results of the Programme and all and any information that the Institution holds concerning the Material. All such Inventions and results of the Programme shall be the property of the Institution. The Institution hereby grants to The Hospital the non-exclusive, royalty-free fully paid up licence to use Inventions for its internal non-commercial research purposes.

2.5 If any commercial revenues result from the Recipient’s use of the Material, The Hospital shall be entitled to a fair and reasonable share of any such revenues that accrue to the Institution or the Recipient.

2.6 The Institution shall ensure the Recipient keeps the Material secure within the Recipient’s laboratory at the Institution’s premises and ensure that access to the Material is restricted to the Recipient and authorised co-workers who have entered into legally binding obligations with the Institution on terms equivalent to those set out in this Agreement.

- 
- 2.7 The Institution shall not supply the Material to any third party, including any person within the Institution other than the Recipient and those under his/her direct supervision.
- 2.8 The Institution and the Recipient shall not attempt to trace, contact or identify any individual whose Material is supplied or to recruit any such individual to take part in any other study or survey.
- 2.9 This Agreement shall not be interpreted to prevent or delay publication of research findings resulting from the use of the Material, provided that the Institution agrees to provide a copy of any such manuscript or abstract at least thirty (30) days prior to submission for publication to give The Hospital the opportunity of requesting the removal of any information that may be proprietary or confidential to The Hospital. The Recipient and Institution agree to provide appropriate acknowledgement of the source of the Material in all publications, and to provide a copy of any reports or publication to The Hospital, and The Hospital shall be entitled to use all such reports and publications.
- 2.10 Notwithstanding anything to the contrary in this Agreement, the terms and conditions set out herein are supplemental to any legal or regulatory requirements governing the handling, use and disposal of Material that may be in force from time to time, which legal or regulatory requirements will take precedence over any term of this Agreement. Should any term of this Agreement conflict with any applicable law or prove invalid, illegal or unenforceable, such term shall be deemed omitted from the Agreement and the remainder of the Agreement shall continue in full force and effect.

### **3. CONFIDENTIALITY**

- 3.1 Each party agrees not to use or refer to this Agreement in any promotional activity, or use the names or marks of the other party without its express written permission.
- 3.2 Confidential information in any form whatsoever which is supplied, including, but not limited to, data supplied, results of genotyping or other bioassays generated from individual or pooled samples, made available or comes into the possession of either party and which relates to the business affairs or finances or other confidential matters of the other party shall only be used for the purpose for which it is disclosed, shall only be disclosed to those of the receiving party's officers and employees on a strict "need to know" basis after informing them of their obligations under this clause, and shall be kept secret and confidential, and shall not be disclosed or permitted to be disclosed to any third party for any reason without the prior written permission of the other party.
- 3.3 The obligations of confidence referred to in this Clause 3 shall not extend to any information which:
- (a) is or becomes generally available to the public otherwise than by reason of a breach by the receiving party of any provision of this Clause 3; or
  - (b) is known to the receiving party and is at its free disposal prior to its receipt from the other, as evidenced by written record; or

- (c) is subsequently disclosed to the receiving party without obligations of confidence by a third party owing no such obligations to the disclosing party in respect thereof, as evidenced by written record; or
- (d) is required to be disclosed in accordance with applicable law or by appropriate regulatory authorities.

#### 4. WARRANTIES/LIABILITIES

4.1 Any material delivered pursuant to this Agreement is understood to be experimental in nature and may have hazardous properties. THE HOSPITAL MAKES NO REPRESENTATIONS AND EXTENDS NO WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED. THERE ARE NO EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR THAT THE USE OF THE MATERIAL WILL NOT INFRINGE ANY PATENT, COPYRIGHT, TRADEMARK, OR OTHER PROPRIETARY RIGHTS. THE HOSPITAL DOES NOT WARRANT THAT THE MATERIAL IS FREE OF EXTRANEOUS AGENTS, OR BIOLOGICALLY ACTIVE CONTAMINANTS (for example, but not limited to, TSE'S) WHICH MAY HAVE BEEN PRESENT IN DONOR SAMPLES.

4.2. The Hospital shall have no liability to the Institution, whether in contract, tort or otherwise, in relation to the supply of the Materials to the Institution or their use or keeping by the Institution or by any other person, or the consequences of their use, to the maximum extent permitted under applicable law. The Institution shall indemnify and hold harmless the Indemnified Parties from and against all Claims and Losses arising from such supply, use or keeping, including without limitation Claims and Losses arising from:

- (i) injury to the Institution's employees and third parties;
- (ii) infringement of third party intellectual property rights; and
- (iii) use of the Materials within or outside the scope of this Agreement.

4.3 For the purposes of this Agreement:

- (i) **“Indemnified Parties”** shall mean The Hospital and its directors, officers, employees, representatives and associated undertakings;
- (ii) **“Claims”** shall mean all demands, claims, proceedings, penalties, fines and liability (whether criminal or civil, in contract, tort or otherwise); and
- (iii) **“Losses”** shall mean all losses including without limitation financial losses, damages, legal costs and other expenses of any nature whatsoever.

#### 5. TERM AND TERMINATION

5.1 The Hospital is willing to provide the Material for use by the Institution for a period of two years from the Effective Date (the “Term”) on the terms set out herein.

- 5.2 The Term may be extended with the written agreement of The Hospital. Permission to extend this Agreement must be sought by the Institution three (3) months before the expiry of the Term.
- 5.3 The Material and any copies thereof made by or in the possession of or under the control of the Institution pursuant to this Agreement shall remain the property of The Hospital and shall be immediately returned or, if The Hospital so requires, destroyed:
- 5.3.1 On termination of this Agreement; or
- 5.3.2 In the event that the Institution is in breach of any of the conditions of this Agreement; or
- 5.3.3 At any other time on request of The Hospital.
- 5.4 The obligations in Clauses 2, 3 and 4 shall survive termination of this Agreement.

## 6. GOVERNING LAW AND JURISDICTION

The validity, construction and performance of this Agreement shall be governed by Portuguese law and the jurisdiction of the Portuguese courts.

## 7. MISCELLANEOUS

- 7.1 The Institution and Recipient will not assign or transfer any interest in this Agreement, in whole or in part, without prior written consent of The Hospital.
- 7.2 No party other than a party to this Agreement shall have any rights to enforce any term of this Agreement.
- 7.2 This Agreement contains the entire agreement between the parties with respect to the subject matter of this Agreement and supersedes all prior discussions and agreements and no provision in this Agreement may be amended unless in writing and signed by the parties.

**AGREED** by the parties through their authorised signatories:

Signed..... Date...7-03-2011  
 (For and on behalf of **The Supplier**)(**The Hospital**)  
 Name: Dra Luisa Monteiro

Title: Directora adjunta do CHLC, EPE

Signed..... Date...7-03-2011  
 (For and on behalf of **Recipient**)

Name: Professor Tom Sanders.....

Title: Professor of Nutrition & Dietetics, Head of Division

Signed..... Date...7-03-2011



(by the **Investigator**)

Name Dr. Alyx Taylor-Vieira.....

Title: Senior Lecturer in Biomedical Sciences



Hospitais Cívicos de Lisboa

Hospital Dona Estefânia

Comissão de Ética do HDE

Presidente  
Dra. Maria do Carmo Vale

Vice Presidente  
Dr. Francisco Abecasis

R. Jacinta Marto  
1169-045 Lisboa

Contactos  
Tel.: 213 126 925  
Fax:

Endereço Electrónico



Ministério da Saúde

Para : Conselho de Administração

*Handwritten signatures and date:*  
Ao C.A. / *[Signature]* / *[Signature]* / *[Signature]*  
J. Rosado Pinto / Director Clínico / 30/6/2006

Assunto : Projecto de Investigação " Sentimentos e emoções do feto "

A Comissão de Ética reunida a 01/06/2006, em fase dos esclarecimentos obtidos pela investigadora principal, deliberou autorizar o projecto de investigação em epígrafe.

Com os melhores cumprimentos,

HDE, 01 de Junho de 2006

A Comissão de Ética  
*[Handwritten signature]*

29 JUN. 2006 *[Handwritten note:]* Dr. de Teresa Veuhra / C. Ética / Dr. António Delgado



## CENTRO HOSPITALAR DE LISBOA CENTRAL, EPE

## APRECIÇÃO DO ESTUDO CLÍNICO

Projecto:

Ref<sup>o</sup> 23/2010 Especialidade: Ginecologia / Obstetria Investigador: D. M. Teodoro Ventura

Decisão do Conselho de Administração / Director Clínico

Aprovado Não aprovada 

Obs.:

Parecer da Comissão de Ética

Favorável Não Favorável 

Recomendações:

Obs.:

Parecer do Centro de Investigação Não avaliadoFavorável Não Favorável 


Recomendações:

Obs.:

Data 13 SET 2010

O Conselho de Administração

O Director Clínico

  
 Eduardo Gomes da Silva  
 Director Clínico



## **Stress antenatal – Investigação: recrutamento de doentes**

- Abordagem – informação sobre o tema
  
- Integra critérios de exclusão:
  - Medicação psiquiátrica
  - Feto anómalo
  - FIV/ PMA
  - Patologia médica de risco (grávida de AR)
  - Amostra contaminada
  
- Não participou no estudo por recusa:
  - Não deu razão
  - Restrições de tempo
  - Não está interessada
  - Parceiro não concorda
  - Faltou à consulta
  
- Não participou no estudo por:
  - Mostrou-se interessada mas não foi incluída
  - Não se considera totalmente informada



## Trabalho de Investigação

### Acção de um estímulo relaxante nos valores de cortisol e testosterona no sangue da grávida e no líquido amniótico

Através de estudos científicos em animais e também no ser humano, sabemos que a ansiedade e o *stress* durante a gravidez podem interferir nas hormonas da grávida e do feto, modificando os seus valores. O efeito de estímulos relaxantes sobre os níveis hormonais, contudo, é muito menos conhecido.

Queremos saber se o relaxamento pode ajudar a melhorar o bem estar da grávida e do bebé e, por isso, decidimos realizar este trabalho. Pretendemos avaliar a acção de um estímulo relaxante (audição de um CD com música durante 30 minutos) sobre os valores de cortisol e da testosterona no sangue da grávida e no líquido amniótico.

Para sabermos se o relaxamento através da música é eficaz, um grupo de grávidas irá ouvir musica (escolhe um tipo de musica de entre 4 possibilidades) na sala ou por auscultadores, antes da amniocentese. Outro grupo não ouve música, irá aguardar lendo uma revista no gabinete, ou irá 30 minutos para a sala de espera, de acordo com uma sequencia previamente estabelecida. A todas as grávidas será canalizada uma veia no antebraço e serão colhidos 4 mililitros de sangue antes e depois (total 8 ml) da audição da música ou do período de espera.

Do líquido amniótico habitualmente retirado em qualquer amniocentese, serão separados 3 ml que se destinam à avaliação das hormonas.

Além dos riscos habituais de uma amniocentese, não há nenhuma consequência ou risco acrescido para a grávida ou para o feto nem são previsíveis efeitos secundários.

Em qualquer altura até à data da execução da amniocentese, pode reconsiderar e revogar a decisão de participar, não sendo de forma alguma penalizada por isso.

Eu,.....com  
o processo nº....., tomei conhecimento e aceito participar no trabalho de  
investigação em curso que me foi proposto.

Nome (maiúsculas).....

Assinatura: .....

Data:.....

Assinatura do Médico:.....



## Trabalho de Investigação (2ª fase)

### Rácio digital 2D4D no Recém Nascido e correlação com os valores de cortisol e testosterona no líquido amniótico na altura da amniocentese

Se está a ser contactada é porque acabou de ser mãe (parabéns!) e porque participou na primeira parte desta investigação. Agradecer a sua participação é fundamental, pois ela é essencial ao sucesso deste trabalho.

A diferença no tamanho dos dedos do ser humano (e também dos animais) tem sido estudada desde há muito tempo. Já no século XIX um antropólogo fez notar que os dedos dos homens têm características diferentes dos das mulheres.

Sabe-se que as hormonas actuam durante o desenvolvimento do feto, podendo os seus efeitos ser notados de forma obvia, como o sexo, ou de forma discreta, como a forma da face ou o tamanho dos dedos.

Gostaríamos de saber se o tamanho dos dedos à nascença tem mais influência genética ou hormonal. Para isso, precisamos de medir os dedos do seu bebé e os seus. Os do seu bebé serão medidos pelo Pediatra colocando a mãozinha em cima de uma placa e utilizando uma régua digital. Para medir os seus vamos precisar de tirar uma fotocópia às suas mãos, pois esse tem sido o método mais utilizado e permite rever os resultados muitas vezes.

Os resultados encontrados serão comparados com os dados que já temos da altura em que fez a amniocentese.

A sua colaboração e a do seu bebé não envolvem nenhuma consequência ou risco, nem tão pouco qualquer efeito secundário.

Em qualquer altura, pode reconsiderar e revogar a decisão de participar, não sendo de forma alguma penalizada por isso.

Eu,.....com  
o processo n.º....., tomei conhecimento e aceito participar no trabalho de  
investigação em curso que me foi proposto.

Assinatura: .....

Data:.....

Assinatura do Médico:.....

nome
Idade

DATA

/ /

Nº
----

Critérios de exclusão	sim	não
Medicação psiquiátr		
Feto anómalo		
FIV / PMA		
Grávida de AR		

Horas:	Manhã	Tarde
Entrevista		
Catéter		
1ª colheita		
2ª colheita		
Amniocentese		

Etnia

Idade Gestacional  semanas

DPP:

Música:	Inst	Clas	Mod_voz	Jaz_voz
Revista:	SE:			

	1ª	2ª	observações		1ª	2ª
TA min						
TA máx						
Pulso						
	ST1	T1	ST2	T2		
Spielberger						
FCF						
Plasma						
Cortisol						
Testost						
LA						
Cortisol						
Testost						

Carta para MA (nome)

Amniocent (cariotipo)	M	F

2ª Fase	RN 24h 2D:4D	<i>Contacto</i>
Aceita		
Vai pensar		
Não aceita		
Observações		
Amostra contaminada		
Indicação Amniocentese		
ALTURA		
PESO		

**CONTEÚDOS dos CD****A – MÚSICA CANTADA (MÚSICA LIGEIRA COM VOZ) = 30.37 min**

1. Enya – Only Time - 3.40
2. Shaina Noll – How could anyone – 5.31
3. Vangelis – Come to me - 4.36
4. Enya – Pilgrim – 3.15
5. Shaina Noll – It's a joy to get to know you – 3.46
6. Vangelis – Italian song (so long ago, so clear) – 2.49
7. Shaina Noll – Deep peace – 5.43
8. Enya – Fallen Ember – 2.33

**B – MÚSICA INSTRUMENTAL = 31.04 min**

1. Vangelis – Voices . Echoes – 8.24
2. Govi – Havana Sunset . This precious moment – 8.24
3. Vangelis – Portraits . La petite fille de la mer – 5.36
4. Vangelis – Voices . Prelude – 4.25
5. Vangelis – Voices . PS – 2.06
6. Diana Arkenstons – Across the sounds of time – 4.26

**C – MÚSICA CLÁSSICA = 31.03 min**

1. Faixa 4 AI - 4.04
2. Johan Sebastian Bach – Baroque Favourites – Air on the G string – Stuttgard Kammeraorchester, Karl Muchinger – 3.48
3. Albinoni – Wind Concerts – Concerto in G Major, 1º andamento- The King's Consort, Robert King – 3.42
4. Claude Debussy – The most relaxing classical album – Clair de lune for piano (suite Bergamosque nº 3) – Dame Moura Lympany – 4.53
5. Boccherini – Wind Concerts – Minuet – The King's Consort, Robert King – 3.43
6. Camille Saint-Saens – My Classic Collection – The Swan – Richard Clayderman – 3.04
7. Franz Shubert – Wedding Music, Instrumental – Ave Maria – Andre Rieu – 4.36
8. W A Mozart – Mozart duette for flute and oboe – Die Zauberflote – W Shultz, H Schellenberger – 2.53

**D – MÚSICA JAZZ COM VOZ = 28.70 min**

1. Norah Jones – Don't know why – 3.07
2. Julie London – Cry me a river – 2.46
3. Chet Bakes – Autumn leaves – 4.32
4. Anne Ducros – You've got a friend – 4.36
5. Norah Jones – Come away with me – 3.19
6. Louis Armstrong e Ella Fitzgerald – Can anyone explain – 3.10
7. Nat King Cole – For sentimental reasons – 2.52
8. Judy Garland – Over the rainbow – 2.52



9. Ella Fitzgerald – Sentimental journey – 3.16

**CD Demonstração**

1º. MUSICA MODERNA COM VOZ

Shaina Noll – How could anyone

Vangelis – Italian song

Vangelis – Come to me

Enya – Only time

2º. MUSICA MODERNA INSTRUMENTAL

Vangelis – Echoes

Govi – This precious moment

Vangelis- La petite fille de la mer

Vangelis – Prelude

3º. MUSICA CLASSICA

Bach

Mozart

Bocherini

Shubert

4º. MUSICA JAZZ COM VOZ

Norah Jones – Don't know why

Anne Dumas – you've got a friend

Judy Garland – Over the rainbow

Ella Fitzgerald – Sentimental journey

## QUESTIONÁRIO DE AUTOAVALIAÇÃO

CD Spielberger – Versão adaptada por E Ponciano

### STAI Y1 (ST1)

Encontram-se em baixo expressões que as pessoas usam para se descreverem a si próprias. Leia as expressões apresentadas e assinale com um círculo o que melhor corresponde ao que SENTE AGORA, isto é, NESTE PRECISO MOMENTO. Não há respostas certas ou erradas. Não gaste muito tempo em cada pergunta.

		Não	Um pouco	Moderadamente	Muito
1	Sinto-me calma	1	2	3	4
2	Sinto-me segura	1	2	3	4
3	Estou tensa	1	2	3	4
4	Sinto-me sob pressão	1	2	3	4
5	Sinto-me à vontade	1	2	3	4
6	Estou preocupada com possíveis contratempos	1	2	3	4
7	Sinto-me satisfeita	1	2	3	4
8	Sinto-me com medo	1	2	3	4
9	Sinto-me confortável	1	2	3	4
10	Sinto-me uma pilha de nervos	1	2	3	4
11	Estou descontraída	1	2	3	4
12	Sinto-me contente	1	2	3	4
13	Estou preocupada	1	2	3	4
14	Sinto-me confusa	1	2	3	4
15	Sinto-me serena	1	2	3	4
16	Sinto-me assustada	1	2	3	4
17	Sinto-me inquieta	1	2	3	4
18	Sinto-me perturbada	1	2	3	4
19	Estou relaxada	1	2	3	4
20	Estou tranquila	1	2	3	4

## QUESTIONÁRIO DE AUTO-AVALIAÇÃO

CD Spielberger – Versão adaptada por E Ponciano

### STAI Y2 (T2)

Encontram-se em baixo expressões que as pessoas usam para se descreverem a si próprias. Leia as expressões apresentadas e assinale com um círculo o que melhor corresponde ao que SENTE HABITUALMENTE. Não há respostas certas ou erradas. Não gaste muito tempo em cada pergunta.

		Quase nunca	Algumas vezes	Frequentemente	Quase sempre
21	Sinto-me bem disposta	1	2	3	4
22	Sinto-me nervosa e agitada	1	2	3	4
23	Sinto-me satisfeita comigo mesma	1	2	3	4
24	Gostava de poder ser tão feliz como os outros parecem ser	1	2	3	4
25	Sinto-me uma falhada	1	2	3	4
26	Sinto-me descansada	1	2	3	4
27	Sou calma, indiferente e serena	1	2	3	4
28	Sinto que as dificuldades se amontoam de maneira que não consigo ultrapassá-las	1	2	3	4
29	Preocupo-me com coisas que na realidade não têm importância	1	2	3	4
30	Sou feliz	1	2	3	4
31	Tenho pensamentos que me perturbam	1	2	3	4
32	Tenho falta de confiança em mim própria	1	2	3	4
33	Sinto-me segura	1	2	3	4
34	Tomo facilmente decisões	1	2	3	4
35	Sinto-me incapaz	1	2	3	4
36	Estou satisfeita	1	2	3	4
37	Alguns pensamentos sem importância passam pela minha cabeça e aborrecem-me	1	2	3	4
38	Tomo as contrariedades tão a sério que não consigo deixar de pensar nelas	1	2	3	4
39	Sou uma pessoa estável	1	2	3	4
40	Quando penso nos assuntos que tenho entre mãos fico tensa e a ferver por dentro	1	2	3	4

**QUESTIONÁRIO DE AUTO-AVALIAÇÃO**  
de Charles D. Spielberger  
com a colaboração de  
R.L. Gorsuch, R. Lushene, P.R. Vagg e G. A. Jacobs  
**STAI Forma Y-1**

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ S \_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: M \_\_\_\_\_ F \_\_\_\_\_

T \_\_\_\_\_

**INSTRUÇÕES:** Encontram-se em baixo um certo número de expressões que as pessoas usam para se descreverem a si próprias. Leia cada uma delas e a seguir assinale o círculo apropriado à direita indicando como se sente *agora*, isto é, *neste preciso momento*. Não há respostas certas ou erradas. Não gaste demasiado tempo em cada pergunta, dê a resposta que lhe parece descrever melhor a maneira como actualmente se sente.

		MODERADAMENTE UM POUCO NÃO	MODERADAMENTE MUITO	MUITO
1. Sinto-me calmo(a) .....	4	3	2	1
2. Sinto-me seguro(a) .....	4	3	2	1
3. Estou tenso(a) .....	1	2	3	4
4. Sinto-me sob pressão .....	1	2	3	4
5. Sinto-me à vontade .....	4	3	2	1
6. Estou preocupado(a) com possíveis contratempos .....	1	2	3	4
7. Sinto-me satisfeito(a) .....	4	3	2	1
8. Sinto-me com medo .....	1	2	3	4
9. Sinto-me confortável .....	4	3	2	1
10. Sinto-me uma pilha de nervos .....	1	2	3	4
11. Estou desconfiado(a) .....	4	3	2	1
12. Sinto-me contente .....	4	3	2	1
13. Estou preocupado(a) .....	1	2	3	4
14. Sinto-me confuso(a) .....	1	2	3	4
15. Sinto-me sereno(a) .....	4	3	2	1
16. Sinto-me assustado(a) .....	1	2	3	4
17. Sinto-me inquieto(a) .....	1	2	3	4
18. Sinto-me perturbado(a) .....	1	2	3	4
19. Estou relaxado(a) .....	4	3	2	1
20. Estou tranquilo(a) .....	4	3	2	1

© Charles D. Spielberger. Tradução e adaptação de Emanuel Ponciano com permissão do autor para utilização exclusiva em investigação académica. Reprodução proibida sem autorização do autor.

QUESTIONÁRIO DE AUTO-AVALIAÇÃO

STAI Forma Y-2

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

INSTRUÇÕES: Encontram-se em baixo um certo número de expressões que as pessoas usam para se descreverem a si próprias. Leia cada uma delas e a seguir assinale o círculo apropriado à direita indicando como *habitualmente* se sente. Não há respostas certas ou erradas. Não gaste demasiado tempo em cada pergunta, dê a resposta que lhe parece descrever melhor a maneira como habitualmente se sente.

	QUASE NUNCA	ALGUMAS VEZES	FREQUENTEMENTE	QUASE SEMPRE
21. Sinto-me bem disposto(a) . . . . .	4	3	2	1
22. Sinto-me nervoso(a) e agitado(a) . . . . .	1	2	3	4
23. Sinto-me satisfeito(a) comigo mesmo . . . . .	4	3	2	1
24. Gostava de poder ser tão feliz como os outros parecem ser . . . . .	1	2	3	4
25. Sinto-me um "falhado(a)" . . . . .	1	2	3	4
26. Sinto-me descansado(a) . . . . .	4	3	2	1
27. Sou "calmo(a), indiferente e sereno(a)" . . . . .	4	3	2	1
28. Sinto que as dificuldades se amontoam de maneira que não consigo ultrapassá-las . . . . .	1	2	3	4
29. Preocupo-me com coisas que na realidade não têm importância . . . . .	1	2	3	4
30. Sou feliz . . . . .	4	3	2	1
31. Tenho pensamentos que me perturbam . . . . .	1	2	3	4
32. Tenho falta de confiança em mim próprio(a) . . . . .	1	2	3	4
33. Sinto-me seguro(a) . . . . .	4	3	2	1
34. Tomo facilmente decisões . . . . .	4	3	2	1
35. Sinto-me incapaz . . . . .	1	2	3	4
36. Estou satisfeito(a) . . . . .	4	3	2	1
37. Alguns pensamentos sem importância passam pela minha cabeça e aborrecem-me . . . . .	1	2	3	4
38. Tomo as contrariedades tão a sério que não consigo deixar de pensar nelas . . . . .	1	2	3	4
39. Sou uma pessoa estável . . . . .	4	3	2	1
40. Quando penso nos assuntos que tenho entre mãos fico tenso e a "ferver por dentro" . . . . .	1	2	3	4

© Charles D. Spielberger. Tradução e adaptação de Emanuel Ponciano com permissão do autor para utilização exclusiva em investigação académica. Reprodução proibida sem autorização do autor.