

ARTIGO DE PESQUISA

VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO CORTISOL SALIVAR DO PREMATURO EM RESPOSTA À PUNÇÃO DE CALCÂNEO PARA O TESTE DE TRIAGEM NEONATAL EM POSIÇÃO CANGURU MATERNA

Variation in salivary cortisol level in preterm infant in response to a heel lance procedure for neonatal screening test while in kangaroo care

Variación de la concentración de cortisol salival del prematuro en respuesta a la punción del calcáneo para la prueba de cribado neonatal en posición canguro maternal

Thaíla Corrêa Castral¹, Mariana Firmino Daré², Laiane Medeiros Ribeiro³, Sonir Roberto Rauber Antonini⁴, Carmen Gracinda Silvan Scochi⁵

Resumo

Objetivo: Mensurar a concentração do cortisol salivar do prematuro antes (basal) e após a punção de calcâneo (resposta) para o teste de triagem neonatal em situação de posição canguro materna. **Metodologia:** Trata-se de um estudo piloto, experimento não-controlado, com 15 prematuros, realizado em uma unidade neonatal de um hospital universitário de Ribeirão Preto. **Resultados:** Não houve alteração da concentração média de cortisol neonatal resposta em relação ao basal ($p=0.638$). **Conclusão:** A posição canguro pode ter prevenido a elevação da concentração do cortisol salivar nos RN que participaram do estudo.

Descritores: Enfermagem Neonatal; Prematuro; Dor; Cortisol salivar; Posição canguro

Abstract

Objective: To measure preterm salivary cortisol level before (baseline) and after heel lance (response) for neonatal screening test while in maternal kangaroo care. **Methods:** Non-controlled experimental pilot study with 15 preterm infants carried out in a neonatal unit at a university hospital in the city of Ribeirão Preto, state of São Paulo, Brazil. **Results:** There was no alteration in preterm response salivary cortisol level in relation to baseline ($p=0.638$) level. **Conclusion:** Kangaroo position may have prevented the elevation of salivary cortisol levels in preterm infants who participated in this study.

Keywords: Neonatal nursing; Premature infant; Pain; Salivary cortisol; Kangaroo care

Resumen

Objetivo: Medir la concentración de cortisol salival de bebés prematuros antes (basal) y después de la punción del calcáneo (respuesta) para la prueba de cribado neonatal en situación de posición canguro materna. **Metodología:** Estudio piloto, experimento no controlado, con 15 recién nacidos prematuros, realizado en una unidad neonatal de un hospital universitario en la ciudad de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, Brasil. **Resultados:** No hubo cambios en la concentración promedio de cortisol neonatal respuesta en relación a la basal ($p=0.638$). **Conclusión:** La posición canguro puede haber prevenido la elevación de la concentración de cortisol salival en recién nacidos prematuros que participaron del estudio.

Descriptores: Enfermería Neonatal; Prematuro; Dolor; Cortisol Salival; Posición Canguro

¹ Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto (SP), Brasil. e-mail: thaccastral@gmail.com

² Aluna de graduação da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto (SP), Brasil. Bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

³ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto (SP), Brasil. Bolsista CAPES/DS.

⁴ Professor Doutor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁵ Professora Titular da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto (SP), Brasil. Bolsista Produtividade em Pesquisa do CNPq A2.

INTRODUÇÃO

Estamos vivendo em uma era em que não mais se acredita que os recém-nascidos (RN) não possam sentir dor. Diversos estudos possibilitaram um melhor entendimento no conhecimento científico do processamento anatômico e fisiológico da dor neonatal, o desenvolvimento de indicadores específicos para sua avaliação; e a determinação da efetividade e segurança de medidas para seu tratamento⁽¹⁾. Em paralelo, constata-se um número crescente de RN que sobrevivem em avançadas unidades de terapia intensiva neonatais, sendo continuamente expostos a diversos procedimentos dolorosos sem o uso de qualquer medida para alívio da dor⁽²⁻³⁾.

Cabe assinalar que a dor é definida como uma sensação ou experiência emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano. Em 2001, a International Association for the Study of Pain (IASP)⁽⁴⁻⁵⁾ acrescentou que a incapacidade do indivíduo comunicar verbalmente a dor não o impossibilita de senti-la nem exclui que esteja precisando de alguma intervenção visando a seu alívio. O conceito de estresse também tem se modificado, sendo mais recentemente concebido como a resposta do corpo, por meio de multisistemas, a qualquer desafio que sobrecarregue ou tenha potencial para sobrecarregar os mecanismos seletivos de resposta da homeostase⁽⁶⁾. Assim, não há uma distinção entre o limiar de dor e estresse, mas, considera-se que todo evento doloroso é estressante.

De acordo com a teoria sináptica proposta por Als et al. (1982)⁽⁷⁾, os RN pré-termo sofrem uma instabilidade em múltiplos sistemas, quando são expostos a situações estressantes e dolorosas, podendo resultar em alterações imediatas da mímica facial⁽⁸⁾, movimentação corporal⁽⁹⁾, choro⁽¹⁰⁾, saturação de oxigênio (SaO₂), frequência cardíaca (FC)⁽¹¹⁾ e concentração do cortisol⁽¹²⁾.

A mímica facial é considerada o indicador mais específico de dor; no entanto, existem variações significativas de acordo com a idade gestacional (IG)^(11,13), visto que RN mais imaturos (< 32 semanas de IG) demoram o dobro do tempo para apresentar alterações na mímica facial logo após a punção do calcâneo⁽¹⁴⁾. Abrir os dedos em leque e fechar as mãos em punho, por exemplo, constituem indicadores corporais relevantes no RN pré-

termo⁽¹⁵⁾. O choro tem a função de alertar e chamar a atenção do cuidador, sendo descrito um choro estridente imediatamente, após o evento doloroso seguido por um choro contínuo semelhante ao som de uma sirena⁽¹⁰⁾. A instabilidade fisiológica dos RN, sobretudo daqueles mais imaturos, e a existência de outras comorbidades podem limitar o uso da FC e da SaO₂ como indicadores de dor. Os RN mais imaturos (< 32 semanas IG) apresentam uma resposta à dor mais acentuada dos parâmetros fisiológicos (aumento da FC e queda da SaO₂) em comparação aos mais maduros⁽¹¹⁾.

Particularmente em relação ao cortisol, este é considerado um marcador biológico do estresse em RN a termo e pré-termo, sendo sua secreção regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e detectada desde a primeira semana de vida⁽¹⁶⁾. Há evidências do aparecimento de um ritmo circadiano do cortisol, a partir da 8ª a 10ª semanas pós-natal⁽¹⁷⁻¹⁸⁾. O cortisol é encontrado na corrente sanguínea em sua forma livre (biologicamente ativa) e ligado a proteínas transportadoras, sendo também mensurado, sob forma livre, na saliva e urina^(19,12,20). A dosagem do cortisol por meio da saliva constitui-se em uma técnica menos invasiva em comparação à coleta de sangue para dosagem das concentrações plasmáticas, sendo estabelecida uma correlação moderada entre ambas^(21,16). Uma revisão sistemática da literatura identificou que em 80% dos estudos analisados houve uma elevação na concentração do cortisol salivar neonatal em resposta a um estímulo doloroso⁽²²⁾.

Diante da existência de diferenças individuais entre os neonatos na resposta à dor e ao estresse⁽²³⁾, faz-se necessária a inclusão tanto de indicadores comportamentais como biofisiológicos em sua avaliação, assim como a consideração de fatores contextuais como, IG, severidade de doença, exposição prévia à esteroides e a procedimentos invasivos, tipo de procedimento doloroso e presença dos pais⁽²⁴⁻²⁶⁾, fatores estes que podem atuar como confundidores.

Pensando na assistência humanizada, na filosofia de cuidado atraumático e desenvolvimental, a identificação da dor nos RN é uma ação de grande relevância para restabelecimento da saúde desses bebês. A enfermagem é o grupo de profissionais da saúde com contato contínuo com os pacientes, torna-se fundamental que

essa equipe esteja adequadamente capacitada a identificar, avaliar e tratar a dor nessas crianças⁽²⁷⁾.

Diversas medidas medicamentosas e não medicamentosas para alívio da dor aguda neonatal têm sido investigadas, tal como a sacarose ou glicose⁽²⁸⁻²⁹⁾, amamentação materna⁽³⁰⁻³¹⁾, sucção não-nutritiva⁽³²⁾ e posição canguru ou contato materno pele a pele⁽³³⁻³⁴⁾. Nosso grupo de pesquisa (Grupo de Pesquisa em Enfermagem no Cuidado à Criança e ao Adolescente) tem tido particular interesse na investigação de medidas que envolvam a participação materna, com a preocupação de assegurar um cuidado desenvolvimental e humanizado.

No presente estudo, elegemos a posição canguru como medida não medicamentosa para alívio da dor durante a punção de calcâneo para o teste de triagem neonatal, por ter sua efetividade comprovada no alívio da dor relacionada a um único procedimento de dor aguda em RN pré-termo e a termo estáveis, quando utilizada, pelo menos, 10 minutos antes do procedimento doloroso, sendo mantida durante e após o mesmo⁽³⁴⁾.

Em um estudo de revisão sistemática, foram analisados 12 estudos que investigaram o efeito calmante da posição canguru em RN. Destes estudos, cinco utilizaram indicadores comportamentais e/ou fisiológicos independentes para mensurar a dor neonatal, tal como mímica facial, estado de sono, vigília e choro, FC, variabilidade da FC e SaO₂. Sete estudos fizeram uso de escalas multidimensionais como a NIPS (*Neonatal Infant Pain Score*) e a PIPP (*Premature Infant Pain Profile*). Nestes estudos, a efetividade da posição canguru foi comprovada pela redução da mímica facial de dor e menor tempo de choro. No entanto, houve inconsistência nos achados com relação à FC, e foi maior em um estudo, menor em dois e não diferente estatisticamente em quatro estudos⁽³⁴⁾.

Com base nas evidências disponíveis, identificamos que ainda existem lacunas nos achados sobre os efeitos da posição canguru no alívio da dor neonatal, o que nos motivou a realizar o presente estudo. Deste modo, nosso objetivo é mensurar o cortisol salivar do RN pré-termo antes (basal) e após (resposta) a punção de calcâneo para o teste de triagem neonatal em situação de posição canguru materno. Temos como hipótese que a concentração do cortisol salivar dos RN pré-termo não apresentará alteração ao compararmos os valores antes (basal) e após (resposta),

ao exame de triagem neonatal em situação de posição canguru materna. Esperamos que os resultados deste estudo fortaleçam as evidências sobre o efeito da posição canguru no alívio da dor aguda em RN.

METODOLOGIA

Trata-se de um experimento não controlado, sem características de randomização e/ou de grupo de controle, típicas dos experimentos verdadeiros⁽³⁵⁻³⁶⁾, constituindo-se em uma base potencial para estudos experimentais futuros⁽³⁶⁾.

O estudo foi realizado na Unidade de Cuidado Intermediário Neonatal (UCIN) de um hospital universitário de Ribeirão Preto, que é de referência terciária na atenção perinatal. O presente estudo piloto está vinculado a uma tese de doutorado que teve como objetivo investigar a associação entre os fatores maternos (comportamento, estado emocional e humor e estresse) e a resposta à dor e ao estresse de prematuros submetidos à punção de calcâneo para exame de triagem neonatal em posição canguru (processo FAPESP nº 2007/05051-1), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do hospital (processo nº 7999/2007). Atendendo aos aspectos éticos previstos na Resolução 196/96 37⁽³⁷⁾, foi mantido o anonimato dos participantes e solicitada assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pela mãe do prematuro, antes de cada coleta dos dados. Em caso de mãe adolescente, também se solicitou a autorização e assinatura do responsável.

Todos os RN que participaram do estudo foram submetidos ao exame de triagem neonatal em posição canguru com a mãe, visto que não há dúvidas de que os neonatos são capazes de sentir dor e existem medidas efetivas disponíveis para aliviá-la. Além disso, o direito da criança não sentir dor quando existem meios para evitá-la está garantido pela Resolução 41/95 dos Direitos da Criança e do Adolescente Hospitalizados⁽³⁸⁾ e Declaração Universal de Direitos para o Bebê Prematuro⁽³⁹⁾. Cabe assinalar ainda que a posição canguru ainda não está implementada no protocolo de coleta do exame de triagem neonatal no serviço de saúde onde o estudo foi realizado.

A amostra foi composta de 15 RN, recrutados de março a julho de 2008, conforme os seguintes critérios de

inclusão: IG $\leq$ 36 semanas e 6 dias; Apgar $\geq$ 7 no 5º minuto; estar agendado para coleta do exame de triagem neonatal; apresentar estabilidade clínica mantendo parâmetros fisiológicos nas faixas de normalidade antes do início da coleta; tempo mínimo de 1 hora da última mamada; desejo materno de participar da pesquisa e realizar contato pele a pele. Foram excluídos do estudo os RN que: estavam em assistência ventilatória assistida; apresentavam hemorragia intraventricular grau III ou IV ou subsequente leucomalácia; apresentavam doença congênita do sistema nervoso, malformação ou prejuízos neurológicos e renais; faziam uso de opioides e corticoesteroides ou outras drogas que interferissem nas respostas à nocicepção; tivessem doença renal.

Todas as coletas de saliva neonatal foram feitas no período entre 7h e 9h da manhã, pela pesquisadora responsável ou por uma assistente de pesquisa treinada. Inicialmente, foram instiladas duas gotas de ácido cítrico a 5% na cavidade oral dos RN, 5 minutos antes da coleta para estimulação da produção salivar. Sendo coletado de 0,5 a 1ml de saliva pela aspiração do assoalho bucal, utilizando-se escalpe número 21 estéril desprovido da agulha, conectado a uma seringa estéril de 10 ml, proporcionando pressão negativa para a sucção da saliva, segundo técnica desenvolvida por Santiago, Jorge e Moreira (1996)⁽¹⁷⁾.

No presente estudo, foram realizadas duas coletas da saliva neonatal atendendo à recomendação de estudo anterior⁽⁴⁰⁾. A primeira amostra de saliva neonatal foi coletada imediatamente, antes do início do basal (10 minutos), com o RN ainda na incubadora ou berço aquecido (**cortisol basal**). Após o basal, o RN foi colocado em posição canguru com a mãe durante 15 minutos (tratamento), em posição prona com cabeça lateralizada e vestido apenas com uma fralda, sendo mantido nesta posição até o final da coleta.

Após o tratamento, uma enfermeira treinada da unidade neonatal realizou o exame de triagem neonatal, conforme protocolo do serviço. Ao término do exame, o RN permaneceu em posição canguru durante mais 10 minutos (recuperação). Em seguida, o RN foi retirado da posição canguru e transferido à incubadora ou berço aquecido onde permaneceu sem manipulação por mais 10 minutos, sendo após coletada a segunda amostra da

saliva neonatal (**cortisol resposta** - 20 minutos após o término do exame, que reflete o pico da concentração do cortisol salivar decorrente do evento doloroso).

O material coletado foi armazenado e dosado em duplicata no Laboratório de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Médica do hospital. Utilizou-se o método de radioimunoensaio, segundo técnica descrita por Vieira et al. (1984)⁽⁴¹⁾. O coeficiente intra- e interensaio foram de 1,1% e 10,2%, respectivamente. Considerou-se uma variação na concentração do cortisol salivar neonatal (resposta – basal), quando esta foi três vezes maior de que o coeficiente interensaio. Para análise estatística, após testar a normalidade das variáveis, utilizou-se o teste t-student para duas amostras pareadas para comparar as concentrações de cortisol salivar neonatal basal e resposta

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao nascimento, a IG média dos RN foi de 233,27 (DP=13,16) dias, peso médio de 1413,33g (DP=451,98), Apgar médio no 5º minuto de 9,8 (DP=0,6). A maioria era do sexo feminino (60,0%), nasceu de parto cesárea (73,3%), não era gemelar (60,0%) e a mãe recebeu corticosteroide na gestação (53,3%). No dia da coleta, a idade corrigida média foi de 253,87 (DP=10,61) dias. O desconforto respiratório precoce (73,3%), a icterícia neonatal tardia (40,%) e a sepse (33,3%) foram os diagnósticos mais frequentes apresentados pelos RN.

A variação da concentração de cortisol salivar dos RN em resposta ao estímulo doloroso foi bastante variável, sendo classificada em três grupos: aumentou (n=4), diminuiu (n=4) e não houve variação (n=6). A concentração média de cortisol salivar neonatal foi de 1,36mcg/dL (DP=0,76) no basal e de 1,53mcg/dL (DP=0,90) na resposta, conforme ilustrado nos dados da Figura 1. Não houve diferença estatisticamente significativa ao compararmos as concentrações de cortisol neonatal basal e resposta ($p=0,501$).

Em nosso estudo, a concentração média do cortisol salivar basal encontra-se mais elevada do que as concentrações obtidas em outras investigações realizadas com RN a termo e pré-termo, cuja variabilidade foi de 0,6

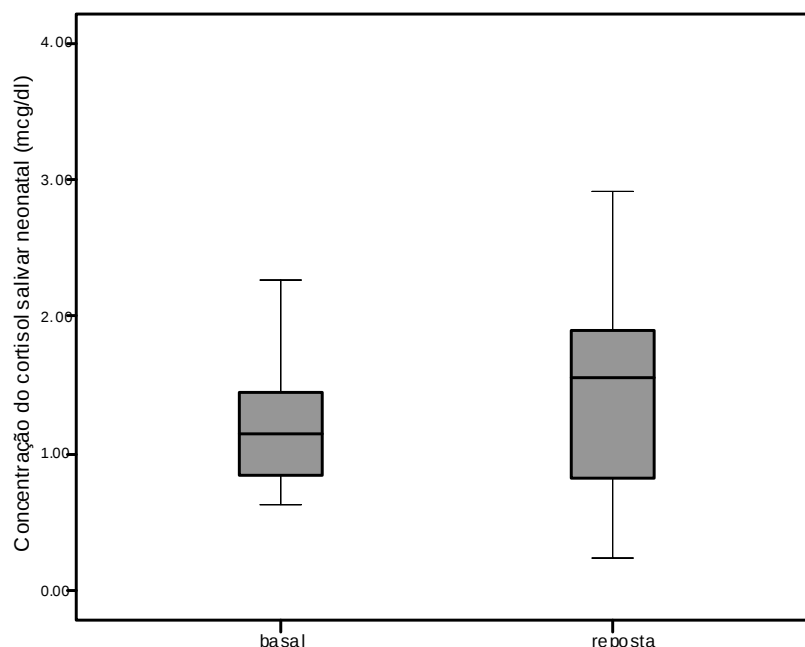


Figura 1 - Valores medianos, mínimos e máximos das concentrações de cortisol salivar dos prematuros no basal e resposta.

a 1,2 mcg,dL^(12,42-43). Diversos fatores podem ter influenciado tais resultados, como as técnicas empregadas para a obtenção da saliva neonatal, os tipos de ensaio, a maturidade dos RN, assim como a exposição destes RN a depressão e/ou ansiedade materna no período gravídico-puerperal.

Segundo a literatura atual, após 20 a 35 minutos de realização da punção de calcâneo, observa-se uma elevação da concentração de cortisol salivar neonatal, atingindo um valor médio de 1,2 mcg/dL⁽²²⁾. No entanto, no presente estudo isto não ocorreu.

Dois outros estudos mensuraram a concentração do cortisol salivar neonatal em posição canguru materna⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾, porém, só um incluiu a dor neonatal. No primeiro estudo, mensurou-se o cortisol salivar de 17 binômios mãe-filho prematuro antes (basal), durante e 30 minutos, após (resposta) a primeira e a quarta sessão de contato pele a pele e não encontraram diferença estatística entre as concentrações de cortisol salivar neonatal na comparação entre os períodos e entre as sessões⁽⁴⁵⁾. Em nossa pesquisa, à semelhança do encontrado pelos autores, as concentrações de cortisol salivar dos prematuros também não diferiram entre os períodos da coleta (basal e resposta).

Em estudo piloto caso-controle mais recente com RN

pré-termos (30-32 semanas IG, 2-9 dias após o nascimento), durante a punção de calcâneo em posição canguru materna, foram mensuradas as concentrações de cortisol salivar (basal e recuperação) e o cortisol sérico (durante punção calcâneo)⁽⁴⁴⁾. O estudo foi dividido em dois momentos: no estudo 1 (n=18), os autores testaram o efeito de 80 minutos da posição canguru antes e durante a punção de calcâneo *versus* o cuidado na incubadora; e no estudo 2 (n=10), os autores testaram o efeito de 30 minutos da posição canguru antes e durante a punção de calcâneo *versus* o cuidado na incubadora. Os estudos foram divididos em quatro fases: basal (20min) aquecimento do calcâneo (5min), punção e ordenha (15s a 10min) e recuperação (20min). No estudo 1, não houve diferença nas concentrações de cortisol entre as condições canguru e o cuidado na incubadora antes, durante ou após a punção de calcâneo, porém, no estudo 2, a concentração do cortisol salivar na recuperação foi menor que no basal ($p=0,025$), e a concentração do cortisol sérico foi menor durante a punção na condição da posição canguru ($p=0,046$) em relação à incubadora⁽⁴⁴⁾. Esses achados, em adição aos resultados de nosso estudo, permitem hipotetizar que a posição canguru pode contribuir positivamente para manter a regulação do eixo

hipotálamo-hipófise-adrenal do prematuro ao prevenir a elevação da concentração do cortisol salivar.

CONCLUSÃO

O presente estudo apresenta resultados preliminares que indicam uma ausência da resposta hormonal biológica de prematuros, conforme mensurado pela concentração do cortisol salivar, quando submetidos à punção de calcâneo para coleta do exame de triagem neonatal em posição canguru materna, constituindo-se em um dos poucos estudos em dor a mensurar a concentração do

cortisol salivar neonatal na condição da posição canguru. Dados referentes ao cortisol salivar neonatal podem ajudar a elucidar os efeitos da posição canguru e fornecer elementos adicionais para implementação no alívio da dor aguda em unidades neonatais, trazendo evidências de pesquisas inéditas em saúde e Enfermagem.

Dentre as limitações do presente estudo piloto, destacam-se a ausência de um grupo controle que não tenha sido submetido à posição canguru, o número reduzido da amostra e a falta de controle de possíveis fatores de confusão. Pesquisas futuras que atendam a tais limitações são necessárias.

REFERÊNCIAS

1. Stevens BJ, Anand KJS, McGrath PJ. An overview of pain in neonates and infants. In: Anand KJS, Stevens BJ, McGrath PJ. Pain in Neonates and Infants. Elsevier: Philadelphia. 2007:1-9.
2. Carbajal R, Rousset A, Danan C, et al. Epidemiology and treatment of painful procedures in neonates in intensive care units. JAMA. 2008; 300(1):60-70.
3. Prestes ACY, Guinsburg R, Balda RCX, et al. Frequência do emprego de analgésicos em unidades de terapia intensiva neonatal universitárias. Jornal de Pediatria. 2005; 81(5):405-10.
4. IASP (Internacional Association for the Study of Pain) IASP Pain Terminology. 1979. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Definitions&Template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=1728> Acesso em: 04 jan. 2007.
5. IASP (Internacional Association for the Study of Pain) IASP Pain Terminology. 2001. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/terms-p.html#Pain>> Acesso em: 21 mar. 2006.
6. Day TA. Defining stress as a prelude to mapping its neurocircuitry: no help from allostasis. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2005; 29(8):1195-200.
7. Als H, Lester BM, Tronick EZ, Brazelton B. Toward a research instrument for the Assessment of preterm infant's behavior (APIB). In: Fitzgerald HE, Lester BM, Yogman MW. Theory and research in behavioral pediatrics. New York: Plenum Press. 1982; 1, p. 287.
8. Grunau RV, Johnston CC, Craig KD. Neonatal facial and cry responses to invasive and non-invasive procedures. Pain. 1990; 42(3):295-305.
9. Warnock F, Sandrin D. Comprehensive description of newborn distress behavior in response to acute pain (newborn male circumcision). Pain. 2004; 107(3):242-255.
10. Bellieni CV, Sisto R, Cordelli DM, Buonocore G. Cry features reflect pain intensity in term newborns: an alarm threshold. Pediatr Res. 2004; 55(1):142-6.
11. Johnston CC, Stevens BJ. Experience in a neonatal intensive care unit affects pain response. Pediatrics. 1996; 98(5):925-30.
12. Herrington CJ, Olomu IN, Geller SM. Salivary cortisol as indicators of pain in preterm infants. Clinical Nursing Research. 2004; 13(1):53-68.

13. Gibbins S, Stevens B, Beyene J, Chan PC, Bagg M, Asztalos E. Pain behaviours in Extremely Low Gestational Age infants. *Early Hum Dev.* 2008; 84(7):451-458.
14. Slater R, Cantarella A, Yoxen J, et al. Latency to facial expression change following noxious stimulation in infants is dependent on postmenstrual age. *Pain.* 2009; 146(1-2):177-182.
15. Holsti L, Grunau RE, Oberlander TF, Osiovich H.. Is it painful or not? Discriminant validity of the Behavioral Indicators of Infant Pain (BIIP) scale. *Clin J Pain.* 2008; 24(1):83-88.
16. Calixto C, Martinez FE, Jorge SM, Moreira AC, Martinelli CE Jr. Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. *Journal of Pediatrics.* 2002; 140(1):116-8.
17. Santiago LB, Jorge SM, Moreira AC. Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol rhythm in infancy. *Clinical Endocrinology.* 1996; 44:157-162.
18. Antonini SR, Jorge SM, Moreira AC. The emergence of salivary cortisol circadian rhythm and its relationship to sleep activity in preterm infants. *Clinical Endocrinology.* 2000; 52(4):423-6.
19. Grunau RE, Holsti L, Haley DW, et al. Neonatal procedural pain exposure predicts lower cortisol and behavioral reactivity in preterm infants in the NICU. *Pain.* 2005; 113(3):293-300.
20. Castro M, Moreira AC. Análise crítica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2003; 47:358-67.
21. Nelson N, Arbring K, Theodorsson E. Neonatal salivary cortisol in response to heelstick: method modifications enable analysis of low concentrations and small sample volumes. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation.* 2001.
22. Jansen J, Beijers R, Riksen-Walraven M, de Weerth C. Does maternal care-giving behavior modulate the cortisol response to an acute stressor in 5-week-old human infants? *Stress.* 2010; 13(6):491-7.
23. Barr RG. Reflections on measuring pain in infants: dissociation in responsive systems and “honest signaling”. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998; 79:152-56.
24. Grunau RE, Oberlander TF, Whitfield MF, Fitzgerald C, Lee SK. Demographic and Therapeutic determinants of pain reactivity in very low birth weight neonates at 32 weeks’ postconceptional age. *Pediatrics.* 2001; 107(1):105-12.
25. Anand KJ. Pain assessment in preterm neonates. *Pediatrics.* 2007; 119(3):605-7.
26. Pillai RR, Stevens BJ, Cohen LL, Flora DB, Greenberg S. et al. Predicting maternal and behavioral measures of infant pain: The relative contribution of maternal factors. *Pain.* 2007; 133(1-3):138-49.
27. Pereira MG. *Epidemiologia: Teoria e Prática.* 2002. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.
28. Storm H, Freeming, A. Food intake and oral sucrose in preterm prior to heel prick. *Acta paediatrica.* 2002; 91(5):555-60.
29. Stevens B, Yamada J, Ohlsson A. Sucrose for analgesia in newborn infants undergoing painful procedures. *Cochrane Database systematic reviews.* 2010 Jan; 20;(1):CD001069.
30. Leite AM, Linhares MB, Lander J, Castral TC, dos Santos CB, Silvan Scochi CG. Effects of breastfeeding on pain relief in full-term newborns. *The Clinical Journal of Pain.* 2009; 25(9):827-32.
31. Shah OS, Aliwalas LI, Shah V. Breastfeeding or breast milk for procedural pain in neonates. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2006; (3).
32. Blass EM, Watt LB. Suckling- and sucrose- induced analgesia in human newborns. *Pain.* 1999; 83(3):611-23.

33. Castral TC, Warnock F, Leite AM, Haas VJ, Scochi CGS. The effects of skin-to-skin contact during acute pain in pre-term newborns. *European Journal of Pain*. 2008; 12(4):464-71.
34. Warnock FF, Castral TC, Brant R, Sekilian M, Leite AM, Owens Sde L, Scochi CG. Brief Report: Maternal Kangaroo Care for Neonatal Pain Relief: A Systematic Narrative Review. *Journal of Pediatric Psychology*. 2010; 35(9):975-84.
35. Polit DF, Hungler BP. Fundamentos de pesquisa em enfermagem: métodos, avaliação e utilização. Tradução Regina Machado Garcez. 2004; Porto Alegre: Art Med.
36. Lobiondo-Wood G, Haber J. Pesquisa em Enfermagem: Métodos, Avaliação Crítica e Utilização. 2001; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 330 p.
37. Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Resolução n. 196/1996. Dispõe sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília-DF: Ministério da Saúde. 1996; 4(2):5-25.
38. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução n. 41/95. Direitos da Criança e do Adolescente Hospitalizados. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1995.
39. Tavares L. Uma declaração universal de direitos para o bebê prematuro. 2009. Rio de Janeiro: Diagraphic.
40. Keenan K, Grace D, Gunthorp D. Examining stress reactivity in neonates: relation between cortisol and behavior. *Child Development*. 2003; 74(6):190-2.
41. Vieira JGH; Noguti KO; Hidal JT; Russo EM; Maciel RM. .Ensaio do cortisol na saliva como um método para avaliação da fração livre sérica. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 1984; 28(1):p. 8-10.
42. Harrison D, Johnstonb L, Spencec K, Gilliesd D, Nagyet S. Salivary cortisol measurements in sick infants: A feasible and objective method of measuring stress? *Journal of Neonatal Nursing*. 2005; 11(1):10-7.
43. Schäffer L, Luzi F, Burkhardt T, Rauh M, Beinder E. Antenatal betamethasone administration alters stress physiology in healthy neonates. *Obstetrics and Gynecology*. 2009; 113(5):1082-8.
44. Cong X, Ludington-Hoe SM, Walsh S. Randomized crossover trial of kangaroo care to reduce biobehavioral pain responses in preterm infants: a pilot study. *Biol Res Nurs*. 2011; 13(2):204-16.
45. Morelius E, Theodorsson E, Nelson N. Salivary cortisol and mood and pain profiles during skin-to-skin care for an unselected group of mothers and infants in neonatal intensive care. *Pediatrics*. 2005; 116(5):1105-13.