

ESTIMULAÇÃO NATURAL DA OCITOCINA E REGULAÇÃO DO AFETO: UMA INVESTIGAÇÃO EM MULHERES DE MEIA-IDADE NA CIDADE DE SÃO PAULO (BRASIL) ¹ RESULTADOS PRELIMINARES

Vale EAN2; Verreschi ITN 3; Silveira DX 4

RESUMO

Foram estudados comparativamente dois grupos de mulheres urbanas de meia-idade quanto à regulação afetiva e fisiológica, por meio de exames bioquímicos, escalas psicológicas e entrevistas, antes e após a intervenção experimental, constituída por estimulação tátil-cinestésica (ETC), também conhecida como massagem terapêutica, em relação à situação de controle: repouso sobre a maca de massagem. No presente trabalho serão discutidos os resultados comparativos obtidos entre os dois grupos, referentes às variáveis afetos positivos e negativos, antes e após a intervenção experimental e a situação de controle, tais como mensurados por escalas selecionadas a partir do teste The PANAS – X (Positive and Negative Affect Schedule – Expanded Form) (1). Resultados preliminares indicaram que os sujeitos do Grupo Experimental apresentaram rebaixamento na intensidade de afetos positivos e negativos após a intervenção experimental, com significância estatística moderada ($p \leq 0.01$) para os afetos negativos e ($p \leq 0.05$) para os positivos. Em comparação, os sujeitos do Grupo Controle apresentaram aumento na intensidade de afetos positivos e rebaixamento na intensidade de afetos negativos após a situação de controle, porém, sem significância estatística (Tabelas I e II). O rebaixamento geral de afetos observado no Grupo Experimental, embora com significância estatística moderada, sugere o efeito de embotamento ou entorpecimento dos mesmos, (blunting) tipicamente observado em situação de liberação

¹ Esta Pesquisa Piloto é parte do Projeto de Doutorado da primeira autora.

² Psicóloga, neuropsicanalista, Mestre em Psicologia Clínica: **Universidade de São Paulo**, Doutoranda em Psiquiatria e Psicologia Médica: **Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo**, Membro da **Associação Internacional de Neuropsicanálise**, Membro do **Grupo de Controle da Dor: Anestesiologia – Instituto Central do Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**.

³ Departamento de Endocrinologia, Laboratório de Esteróides, Departamento de Medicina, **Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo**.

⁴ Programa de Orientação e Atendimento a Dependentes do Departamento de Psiquiatria, **Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo**.

de ocitocina pelo organismo, e pode ser indicativo da mesma. O desenvolvimento de tabela específica para confirmar estes dados seria valioso para o estudo de regulação afetiva por meio de ETC.

ABSTRACT

Two groups with middle-aged urban women were compared in terms of affective and physiological regulation through the assessment of biochemical analysis, psychological scales and interviews, before and after experimental intervention, consisting of tactile-kinesthetic stimulation (TKS) or therapeutic massage, as compared to the control situation, resting over the massage table. This paper will focus on the results concerning positive and negative affects variables, as observed before and after the experimental intervention in comparison to the control situation, such as assessed by scales selected from The PANAS – X (Positive and Negative Affects Schedule – Expanded Form) (1). Preliminary results showed that subjects in the Experimental Group presented a lowering of both positive and negative affects after the experimental intervention, with moderate statistical significance ($p \leq 0.01$) for negative affects and ($p \leq 0.05$) for positive ones. In comparison, subjects in the Control Group presented a rise in positive affects and a lowering of negative affects after the control situation, but without statistical significance. The general lowering of affects observed in the Experimental Group, although reaching a modest statistical significance, suggests the typical effect of blunting of affects observed in situations of oxytocin release by the organism, and may be indicative of it. The development of a specific scale to confirm these data would be valuable in the study of affective regulation with use of TKS.

INTRODUÇÃO

A ocitocina (OT) é um nonapeptídeo produzido principalmente no hipotálamo, com distribuição central e periférica. Na distribuição periférica, tem função de neurohormônio, ligado às contrações do parto e à descida do leite. Na distribuição central, tem função de neuromodulador e neurotransmissor (2). A liberação de quantidades muito pequenas de OT é suficiente para produzir efeitos hormonais e comportamentais importantes, e, contrariamente à regra hormonal, sua produção é regulada por feed-back positivo (3). A liberação central de OT parece estar relacionada, entre outras, a respostas de bem-estar, de interação social, de desenvolvimento do

apego, de crescimento e regeneração do organismo, e à atenuação das respostas de estresse (4).

Em mamíferos, a produção de OT está intimamente ligada à amamentação e cuidados com a prole (5). Por meio dos cuidados de maternagem se desenvolvem nos filhotes a capacidade de regulação de funções afetivas (6) e equilíbrio alostático (7), os quais, quando bem-sucedidos, favorecerão no organismo flexibilidade afetivo-emocional e orgânica para se adaptar a novas situações (8). O processo de alostase, no caso específico da OT, consistiria numa regulação dinâmica entre os hormônios do sistema ocitocinérgico e os hormônios do estresse, produzidos pelo sistema hipotalâmico-pituitário-adrenal, ou HPA, de tal modo que, ao ativar-se um dos sistemas, o outro se desativaria. Após situações de enfrentamento, desafio, e ameaças, que podem exigir a produção de grande quantidade de hormônios de estresse, com grande dispêndio de energia, o organismo necessitaria se recuperar e regenerar, o que ocorreria por meio da ação da OT. Alguns estudos sugerem que a ação da OT se daria de forma conjugada com a ação inibitória do nervo vago (9).

Os comportamentos de maternagem ativados pela OT consistem principalmente na aproximação e no contato físico, sob a forma de amamentar, lambe (alisamento rítmico da pele ou pelo), deitar-se sobre a cria (calor, pressão, contenção), manuseio [handling] e carregar [holding] os filhotes. Esses comportamentos eliciariam nos filhotes respostas comportamentais de conforto e sedação, sob a forma de aquietamento do animal, da cessação de vocalizações e do fechamento dos olhos (10). No nível fisiológico, uma quantidade adequada de “grooming” favoreceria a regulação permanente do eixo HPA e da produção de cortisol (11). No nível afetivo, parecem ocorrer, em decorrência dos cuidados maternos, emoções de calma e bem-estar (12). Em oposição à resposta de conforto, quando prematuramente separado da mãe e colocado em isolamento, o animal reagiria com ataques de pânico, caracterizados comportamentalmente por intensas vocalizações de desconforto [distress] e agitação motora (13).

A escolha pela massagem ou estimulação tátil-cinestésica (ETC) como intervenção experimental no Projeto Piloto considerou que a massagem, além de reconhecida técnica terapêutica desde a Antiguidade, reproduz vários estímulos táteis análogos aos estímulos sensoriais maternos (toque, alisamento rítmico da pele, pressão,

calor, contenção), e baseou-se em dados experimentais que sugerem que essa técnica natural de contato pelo toque, além de induzir à liberação de ocitocina plasmática, em geral acalma e conforta (14). Há ainda evidências de que a massagem pode reorganizar o sistema neuroendócrino da pele, e reduzir os níveis de cortisol do organismo (15; 16). Nas pesquisas coordenadas por Tiffany Field nos Touch Research Institutes, ligados à Escola de Medicina de Miami, FLA, uma ampla gama de populações de todas as idades, saudáveis ou com problemas de dor, depressão, ansiedade, doenças autoimunes e PTSD, foram submetidas a massagem e comparadas a grupos de controle; em sua maioria, os resultados melhoraram a condição do paciente, tais como medidos por meio de instrumentos psicológicos e análises bioquímicas (17; 18).

Para alguns autores, na regulação afetiva o objeto de regulação seria o próprio afeto/emoção, e o processo pelo qual a criança se deslocaria de um estado de correção (no contato com a mãe) para um estado de autorregulação. Tal regulação se referiria à capacidade de controlar e modular as próprias respostas afetivas (19). De modo geral, os autores do desenvolvimento, em especial os ligados à psicanálise, associam o aparecimento e desenvolvimento da regulação afetiva ao processo de apego entre mãe e bebê por meio de trocas sociais. Ela ocorreria por via afetivo-emocional e por meio do desenvolvimento de estruturas cerebrais, principalmente nos dois primeiros anos de vida (cf., por ex., (6) e (19)).

Nossa hipótese é de que a estimulação tátil-cinestésica seria um elemento mais precoce do que as trocas faciais e verbais no desenvolvimento da regulação afetiva, e que poderia, per se, contribuir para esse processo regulatório. Propomos ainda que regulação afetiva e fisiológica não passam de aspectos constituintes de um mesmo funcionamento global do organismo.

OBJETIVOS

Avaliação de sensações de bem-estar/ mal-estar, tais como expressas semanticamente por afetos positivos e negativos, decorrentes da aplicação de ETC.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento

Experimento clínico não-randomizado e cego, com Grupo Experimental [GE] e Grupo Controle [GC], aprovado pelo Conselho de Ética da Universidade Federal de S.

Paulo – Escola Paulista de Medicina. Os resultados quantitativos foram organizados em banco de dados e analisados com auxílio do software SPSS. As voluntárias, após assinar o Termo de Consentimento, foram sorteadas entre dois grupos. O GE foi submetido a ETC protocolada, realizada por massagista profissional, durante cinquenta minutos. O GE permaneceu em repouso sobre a maca de massagem pelo mesmo tempo. Pediu-se à massagista e voluntárias que evitassem falar durante os procedimentos, para minimizar os efeitos do estímulo social nos resultados.

Amostra, Critérios de Inclusão e Exclusão

Selecionou-se de forma não-randômica 19 voluntárias saudáveis, urbanas, na pós-menopausa, que tivessem pelo menos educação escolar básica, (critérios de inclusão); sem reposição hormonal nem ingestão de antidepressivos e ansiolíticos nos últimos seis meses (critérios de exclusão), com GE (N=10) e GC (N = 7), após duas exclusões no último. Cada voluntária sorteou uma senha numérica, pela qual os respectivos protocolos foram identificados, para cegamento do estudo. Apesar da seleção não-randômica, houve grande variabilidade quanto a estado civil, profissões, e qualidade de vida. Houve maior homogeneidade quanto à educação escolar, mais alta do que a da média da população.

Justificativa para o Estudo

A escolha de mulheres urbanas de meia-idade como sujeitos do estudo considerou que, em uma cidade como São Paulo, há um enorme contingente de mulheres sozinhas, e, quanto mais idosas, maior a prevalência de solidão, seja por separação, viuvez ou celibato; esse contingente tende a crescer, conforme tendência observada mundialmente (20). Pressupondo que tal população tenda a sofrer de déficit de contato e toque físico, além de submetidas ao estresse urbano, levantamos a hipótese de que poderiam se beneficiar dos estímulos sensoriais da massagem, em termos de regulação afetiva e fisiológica. Taylor SE et al (2006) levantaram a hipótese de que mulheres na pós-menopausa teriam maior vulnerabilidade ao estresse por perderem a proteção oferecida pelo estrógeno, e sugeriram que a OT plasmática elevada estaria ligada a relações estressoras, e associadas a cortisol elevado (21); essa questão foi considerada em nosso estudo, mas será detalhada em outra ocasião.

Instrumentos

Embora a literatura científica seja bastante extensa no que se refere à investigação de estados negativos, é ainda escassa quanto a estados positivos. Além disso, a investigação dos estados positivos, em oposição aos negativos, coloca algumas dificuldades: os afetos negativos têm um importante papel de sobrevivência, pois se manifestam sempre que algum estímulo ameaça o organismo, sob a forma de estados de dor ou de mal-estar que se instalam subitamente no organismo, gerando respostas rápidas e automáticas, e/ou, no caso humano, reações cognitivas que visem a restaurar o equilíbrio. Por outro lado, quando a pessoa se encontra em equilíbrio alostático, a consciência de si tende a diminuir – o corpo fica “silencioso”. Geralmente, os estados de bem-estar, quando não caracterizam hipomania ou mania, são sutis e discretos em comparação à exuberância dos estados de mal-estar.

Não se encontrou, na literatura, instrumentos de avaliação para estados de bem-estar, calma, conforto e relaxamento que fossem indicativos da ativação do sistema ocitocinérgico nos sujeitos; a não-existência de escalas específicas para avaliar tais estados após a massagem foi confirmada por Tiffany Field (22). Outra dificuldade confundidora seria o fato de que a liberação de vários outros hormônios e neurotransmissores também pode causar sentimentos de bem-estar: serotonina, dopamina, tiroxina, opióides e até hormônios do estresse em níveis moderados, por exemplo. Assim, considerou-se que, neste caso, o bem-estar deveria estar necessariamente relacionado a calma, conforto e relaxamento. A partir dessas considerações, procurou-se na literatura brasileira escalas e inventários que pudessem, de forma aproximada, traduzir semanticamente o conjunto desses estados.

A escala que mais pareceu se adequar ao nosso objetivo foi The PANAS – X (Positive and Negative Affect Schedule – Expanded Form) (1), de Watson e Clark (1991), traduzida e validada para o português por Peluso (2003) (23); pelos seguintes motivos: 1) foi validada para uma ampla variedade de populações brasileiras, psiquiátricas e não-psiquiátricas; 2) foi validada para ser respondida tanto em relação ao momento presente quanto para diferentes intervalos de tempo, podendo mensurar afetos tanto como traço quanto como estado; 3) os autores indicam que os investigadores com restrição de tempo podem selecionar e avaliar apenas as escalas relevantes ao seu estudo; 4) é autoaplicável.

Foram selecionadas as escalas que pareciam se aproximar mais (afetos positivos) ou se afastar mais (afetos negativos) dos estados acima mencionados, a saber:

Das “Escalas de Emoções Negativas Básicas”, o medo e a hostilidade, e seus subitens, que provavelmente traduziriam estados corporais de estresse, com ativação do eixo HPA [hipotalâmico – pituitário - adrenal], antagonísticos, portanto, ao estado de calma, relaxamento e bem-estar:

Medo: com medo, assustada, receosa, nervosa, tensa, abalada.

Hostilidade: zangada, hostil, irritada, desdenhosa, repugnada, com raiva.

Das “Escalas de Emoções Positivas Básicas”, selecionou-se a de autoconfiança, e seus subitens, por tratar-se de estado também atribuído à liberação de ocitocina (24), e que ontogeneticamente equivaleria a estar junto da mãe:

Autoconfiança: orgulhosa, forte, confiante, destemida, arrojada, sem medo.

Da categoria “Outros Estados Afetivos”, selecionou-se a escala de serenidade, e seus subitens:

Serenidade: calma, relaxada, com bem-estar.

Para avaliar os afetos positivos e negativos, empregamos as 21 escalas selecionadas, apresentadas como escalas do tipo Likert, com cinco intervalos de intensidade. As escalas foram autoaplicadas pelas voluntárias imediatamente antes e após a intervenção experimental e a situação controle, após o que foram encorajadas a falar livremente sobre a experiência vivida.

RESULTADOS

Conforme resultados do Teste de Comparação de Amostras Pareadas do SPSS (Tabela II), após a intervenção experimental os resultados do GE acusaram rebaixamento na intensidade dos Afetos Positivos e Negativos, com significância estatística para Afetos Negativos, ao nível $p \leq 0.01$, e para Afetos Positivos ao nível $p \leq 0.05$, mas não ao nível $p \leq 0.001$. Os resultados no Grupo Controle revelaram elevação na intensidade dos Afetos Positivos e rebaixamento na intensidade dos Afetos Negativos, mas sem significância estatística (Tabelas I e II).

DISCUSSÃO

A não-existência de Escala Psicológica específica para avaliar os efeitos afetivos da possível produção de OT durante a ETC foi uma das dificuldades enfrentadas neste estudo. Outra dificuldade deveu-se ao fato de que referir uma sensação pressupõe que o sujeito tenha a condição de identificar em si essa sensação, e que a saiba nomear, o que no caso dos afetos positivos deve ser mais difícil do que no dos negativos. Além disso, a verbalização das sensações de afetos positivos e negativos dependeria do estado de consciência de si, que talvez fique embotado após a massagem. O uso das PANAS – X selecionadas, além de constituir uma seleção por aproximações, apresentou vários problemas: 1) algumas voluntárias manifestaram certa confusão diante das escalas “com medo” e “sem medo”; 2) outras (com menor nível de instrução?) demonstraram dificuldade na compreensão dos conceitos “audaciosa”, “ousada”, “cheia de desprezo” e “hostil”; 3) algumas voluntárias tiveram dificuldade visual para preencher as escalas (o que poderia ser sanado com o auxílio de uma régua); 4) algumas voluntárias demonstraram estranheza com relação à escala “orgulhosa”, querendo saber em qual sentido ela estava sendo usada; talvez porque esse termo, na cultura brasileira, costume ter conotação pejorativa; 5) de modo geral, apesar do bom nível de escolaridade da amostra, observou-se razoável nível de dificuldade de compreensão dos constructos; 5) é preciso considerar que a validação da escala para a língua portuguesa foi feita a partir de situações de extremo cansaço físico (27), opostas, portanto, às nossas.

Após a situação experimental e de controle, quando se fez uma estimulação à livre expressão sobre a experiência vivida pelas voluntárias, foram registradas muitas associações espontâneas sobre sensações agradáveis e desagradáveis, que poderão servir futuramente como base para a construção de uma Escala de Bem-Estar/ Mal-Estar, específica para ETC.

LIMITAÇÕES DESTE ESTUDO

Por se tratar de Pesquisa Piloto, o número de sujeitos foi pequeno, podendo afetar a validade dos dados. Em função dos altos custos, nesta pesquisa a ocitocina não foi avaliada diretamente. É possível que os sujeitos do GC possam ter-se sentido ansiosos por ficarem em repouso durante 50 minutos, embora isso não tenha aparecido na Escala de Ansiedade BAI nem nas entrevistas. A pesquisa de campo foi realizada em salas do Ambulatório de Gônadas e Desenvolvimento da Universidade Federal de São

Paulo, que por não possuírem isolamento térmico e acústico, talvez não tenham contribuído para o bem-estar dos sujeitos. Além disso, por ter-se realizado uma única sessão experimental e de controle, pode não ter havido tempo para a habituação dos sujeitos com o “setting”. Na realização da Pesquisa Propriamente Dita, será considerada a melhora dessas condições.

CONCLUSÕES

Embora as escalas selecionadas do The PANAS-X não sejam ideais para avaliar os estados afetivos estudados, ainda assim no Grupo Experimental, acusaram rebaixamento na intensidade dos afetos positivos e negativos, com significância estatística moderada para os negativos ($p \leq 0.01$) e ($p \leq 0.05$) para os positivos, em contraposição ao Grupo Controle, que não teve alterações estatisticamente significativas. Esse rebaixamento geral na intensidade dos afetos do Grupo Experimental pode indicar estado de sedação e embotamento característico da produção de ocitocina, mas seria importante a construção de escala específica que confirmasse esses dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Watson D & Clark LA:” The PANAS – X: Manual for the Positive and Negative Affect Schedule – Expanded Form.” The University of Iowa, Iowa City. © Copyright 1994, updated in 8/99. Página consultada em 02/09/2008. <http://www.psychology.uiowa.edu/faculty/Clark/PANAS-X.pdf>
2. Carter, CS: Neuroendocrine perspectives on social attachment and love. *Psychoneuroendocrinology*, 23, 8:779-818, 1998.
3. Uvnas-Moberg, K: The oxytocin factor: tapping the hormone of calm, love and healing. Cambridge, MA, Da Capo Press, 205p, 2003.
4. Uvnas-Moberg K & Petersson M: Oxytocin, a mediator of anti-stress, well-being, social interaction, growth and healing. *Psychosom Med Psychother* 51(1):57-80.
5. Insel TR & Shapiro LE: Oxytocin receptors and maternal behavior. *Ann NY Academ Sci.*, 652:122-141, 1992.

6. Schore AN: Affect regulation and the origin of the self: the neurobiology of emotional development. New Jersey, Lawrence Erlbaum Associates, 700p, 1994. .
7. Sterling P: Principles of allostasis: optimal design, predictive regulation, pathophysiology and rational therapeutics. In: Schulkin J.(Publ.) Allostasis, homeostasis and the costs of adaptation. Cambridge University Press, NY: 17-64, 2004.
8. Friedman BH: An autonomic flexibility-neurovisceral integration model of anxiety and cardiac vagal tone. *Biol Psycho* 74:185-199, 2007.
9. Porges SW: The polyvagal theory: phylogenetic substrates of a social nervous system. *Intl J Psychophysiol.* 42:123-146, 2001.
10. Panksepp, J: Affective neuroscience. N. York, Oxford Press, 97-120, 1998.
11. Dong L: Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, Sept, 277(5332):1659-1662, 1997.
12. Uvnas-Moberg, K, 2003 *op. cit.*
13. Panksepp J, 1998 *op. cit.*
14. Uvnas-Moberg, 2003, *op. cit.*
15. Slominsky A & Worstman J: Neuroendocrinology of skin. *Endocrine Reviews*, 21(5):445-487, 2000.
16. Fogaça MC, Carvalho WB & Verreschi ITN: Tactile-kinesthetic stimulation: integration between skin and endocrine system? *Rev Bras Saude Mater Infant*, 6(3),2006.
17. Field T: Touch Therapy. London, Churchill Livingstone, 2000.
18. Field T: Massage therapy research. London, Churchill Livingstone – Elsevier, 2006.
19. Fonagy P et al: Affect Regulation, mentalization and the development of self. New York, Other Press, p 65-96, 2002.
20. Berquó E: Evolução demográfica. In: Sachs I et al (Org.) Brasil: um século de transformações. S. Paulo, Cia das Letras, 14-37, 2001.
21. Taylor SE et al: Relation of oxytocin to psychological stress responses and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in older women. *Psychosom Medicine*, 68:238-245, 2006.
22. Comunicado de Tiffany Field por e-mail, em 24 de agosto de 2008.

23. Peluso, MA: Alterações de humor associadas a atividade física intensa. Tese de doutorado em psiquiatria. Universidade de S. Paulo, 231 p, 2003.
24. Kosfeld, M. et al.: Oxytocin increases trust in humans. *Nature*, **435**, 673-6, June, 2005.

TABELA I – COMPARAÇÃO ENTRE AFETOS POSITIVOS E NEGATIVOS, ANTES E APÓS A SITUAÇÃO EXPERIMENTAL E DE CONTROLE

	GRUPO EXPERIMENTAL				GRUPO CONTROLE			
	APA	APD	ANA	AND	APA	APD	ANA	AND
	27	22↓	20	12↓	11	9↓	30	12↓
	20	10↓	16	16 =	25	40↑	18	16↓
	27	24↓	17	14↓	23	37↑	18	17↓
	35	26↓	13	12↓	21	24↑	29	13↓
	32	38↑	17	13↓	19	11↓	17	14↓
	36	37↑	18	14↓	28	32↑	19	12↓
	25	25 =	16	19↓	22	25↑	28	12↓
	28	16↓	24	15↓				
	32	26↓	22	12↓				
	23	21↓	26	12↓				
MÉDIA	28,5	24,5↓	18,9	13,9↓	21,29	25,42↑	22,71	13,71↓
DP	5,19	8,46	4,04	2,28	5,38	12,04	5,94	2,06

APA = AFETO POSITIVO ANTES

ANA = AFETO NEGATIVO ANTES

APD = AFETO POSITIVO DEPOIS

AND = AFETO NEGATIVO DEPOIS

**TABELA II - TESTE DE AMOSTRAS PAREADAS – DIFERENÇAS PAREADAS
[PAIRED SAMPLES TEST – PAIRED DIFFERENCES]**

	Comparação de Pares	Média das Diferenças Pareadas	DP	Erro Médio Padrão	95% Intervalo de Confiança Inferior	95% Intervalo de Confiança Superior	t _o	df	Significância Bicaudal
GRUPO CONTROLE	Par 1 APA APD	- 4,14	8,19	3,10	-11,72	3,44	- 1,338	6	0,229
	Par 2 ANA AND	9,00	7,44	2,81	2,12	15,88	3,201	6	0,19
GRUPO EXPERIMENTAL	Par1 APA APD	4,00	5,54	1,75	3,85	7,96	2,284	9	0,048* **
	Par 2 ANA AND	5,00	5,19	1,64	1,29	8,71	3,049	9	0,014* **

Rebaixamento de Afetos Negativos após a Intervenção Experimental

com Significância Estatística a $p \leq 0,01^{***}$ e dos Positivos a $p \leq 0,05^{***}$