

**La resposta a un estrès psicosocial agut en nens i nenes:
correlats biològics, psicopatològics i afectius.**

Treball final de grau

Daniel Lliboutry Capdevila

daniellliboutry@gmail.com

Grau en Biologia

Tutora: Doctora Huguet, Gemma

gemma.huguet@udg.edu

Cotutora directora: Doctora Nadal, Roser

roser.nadal@uab.cat

Universitat Autònoma de Barcelona



2 de juliol de 2024

ÍNDEX

Resum.....	i
Resumen.....	ii
Abstract.....	iii
Reflexió ètica.....	iv
1. Introducció.....	1
1.1. L'estrès.....	1
1.2. El TSST-M.....	1
1.3. Marcadors Biològics de l'estrès.....	2
1.3.1. L'eix HPA.....	2
1.3.2. El SAM.....	3
1.4. El cicle circadiari: nivells basals d'alfa-amilasa i cortisol.....	4
1.5. L'estrès com a variable predictora de la psicopatologia.....	6
1.5.1. La psicopatia.....	6
1.5.2. L'adversitat en la infància.....	7
1.6. Diferències entre sexes.....	7
Objectives.....	8
2. Metodologia.....	9
2.1. Participants de l'estudi.....	9
2.2. Recollida de mostres en condicions basals.....	10
2.3. Procediment – El TSST-M.....	10
2.4. Dades obtingudes.....	12
2.4.1. Variables fisiològiques.....	12
2.4.2. Variables afectives.....	13
2.4.3. Variables psicopatològiques.....	13
2.5. Tècniques bioquímiques.....	14
2.5.1. Quantificació de Cortisol en saliva.....	15
2.5.2. Quantificació d'alfa-amilasa en saliva.....	15
2.6. Anàlisis estadístiques.....	15
3. Resultats.....	17
3.1. Cortisol salival durant el TSST-M.....	17
3.2. Alfa-amilasa salival durant el TSST-M.....	17
3.3. Estrès percebut durant el TSST-M.....	18
3.4. Cortisol salival en condicions basals.....	19
3.5. Alfa-amilasa salival en condicions basals.....	19
3.6. Correlacions entre variables.....	20
4. Discussió.....	22
5. Conclusions.....	24
6. Bibliografia.....	25

Resum

L'estrès pot estar associat a diversos problemes fisiològics i psicològics i el seu estudi pot servir com a variable predictora, però hi ha pocs estudis que hagin aconseguit induir la resposta a l'estrès agut i caracteritzar els seus biomarcadors en infants utilitzant procediments vàlids i estandarditzats. En aquest estudi s'ha avaluat la resposta fisiològica i afectiva a l'estrès psicosocial agut de 20 infants (10 nens i 10 nenes) de 7-8 anys utilitzant el TSST-M (Trier Social Stress Test-Modified). Durant la prova, s'han recollit 5 mostres de saliva, 2 abans del TSST-M i 3 després d'aquest, amb la finalitat d'analitzar el cortisol i l'alfa-amilasa en reactivitat, com a indicadors de l'activitat de l'eix HPA (hipotalàmic-hipofisiari-adrenal) i del SAM (Sistema Simpàtic-Medulo-Adrenal), respectivament. La resposta afectiva s'ha avaluat 6 vegades a través del SAM (Self-Assessment Manikin), 2 abans del TSST-M, 2 durant i 2 després d'aquest. Mentre els infants realitzaven el TSST-M, els i les cuidadors/es principals d'aquests van contestar qüestionaris sobre l'adversitat en la infància dels infants, que van ser utilitzats, juntament amb instruments que havien contestat amb anterioritat sobre els trets psicopàtics de personalitat i de la conducta agressiva dels infants, com a variables predictores de la resposta a l'estrès. A més, també es van recollir 5 mostres de saliva els dos dies d'un cap de setmana, 3 al despertar-se, una al migdia i un altre al vespre, per analitzar els ritmes diürns dels biomarcadors, posant el focus en el CAR (cortisol awakening response) i en el sAA-AR (salival alfa-amylase awakening response).

Els resultats obtinguts mostren que el TSST-M és un procediment adequat per activar la resposta fisiològica (cortisol i alfa-amilasa) i emocional a un estrès psicosocial agut en nens i nenes. A més, també s'ha demostrat que, en condicions basals, els infants presenten el CAR i el sAA-AR. Per una altra part, hi ha associació entre la resposta a l'estrès agut i els trets psicopàtics, així com també hi ha associació entre la resposta a l'estrès agut i l'adversitat en la infància. Finalment, s'ha evidenciat que no hi ha diferències entre sexes en les respostes fisiològiques i afectives davant aquest estrès psicosocial agut. Tampoc s'han trobat diferències entre sexes en el CAR i el sAA-AR en condicions basals ni diferències entre sexes pel que fa a la psicopatia. A més, les nenes amb puntuacions més altes en agressivitat proactiva tenen una percepció més alta de l'estrès agut que els nens. Aquests resultats destaquen la importància de l'estudi de l'estrès i mostren la relació entre l'estrès i la psicopatologia en la infància.

Resumen

El estrés puede estar asociado a diversos problemas fisiológicos y psicológicos y su estudio puede ser utilizado como variable predictora, pero hay pocos estudios que hayan conseguido inducir la respuesta al estrés agudo y caracterizar sus biomarcadores en infantes utilizando procedimientos válidos y estandarizados. En este estudio se ha evaluado la respuesta fisiológica y afectiva al estrés psicosocial agudo de 20 infantes (10 niños y 10 niñas) de 7-8 años utilizando en TSST-M (Trier Social Stress Test-Modified). Durante la prueba, se recogieron 5 muestras de saliva, 2 antes del TSST-M y 3 después de este, con la finalidad de analizar el cortisol y la alfa-amilasa en reactividad, como indicadores de la actividad del eje HPA (Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal) y del SAM (Sistema Simpático-Medulo-Adrenal), respectivamente. La respuesta afectiva se evaluó 6 veces a través del SAM (Self-Assessment Manikin), 2 antes del TSST-M, 2 durante y 2 después de este. Mientras los infantes realizaban el TSST-M, los y las cuidadores/as principales contestaron cuestionarios sobre la adversidad en la infancia de los infantes, que fueron usados, juntamente con instrumentos que habían contestado con anterioridad sobre los rasgos psicopáticos de personalidad y la conducta agresiva de los infantes, como variables predictoras de la respuesta al estrés. Además, también se recogieron 5 muestras de saliva los dos días de un fin de semana, 3 al despertarse, una al mediodía y otra por la noche, para analizar los ritmos diurnos de los biomarcadores, poniendo el foco en el CAR (cortisol awakening response) y en el SAA-AR (salival alfa-amylase awakening response).

Los resultados obtenidos muestran que el TSST-M es un procedimiento adecuado para activar la respuesta fisiológica (cortisol y alfa-amilasa) y emocional a un estrés psicosocial agudo en niños y niñas. Además, también se ha demostrado que, en condiciones basales, los infantes presentan el CAR y el SAA-AR. Por otra parte, hay asociación entre la respuesta al estrés agudo y los rasgos psicopáticos, así como entre la respuesta al estrés agudo y la adversidad en la infancia. Finalmente, se ha evidenciado que no hay diferencias entre sexos en las respuestas fisiológicas y afectivas en frente a este estrés. Tampoco se han encontrado diferencias entre sexos en el CAR y el SAA-AR en condiciones basales ni diferencias entre sexos por lo que hace a la psicopatía. Además, las niñas con puntuaciones más altas en agresividad proactiva tienen una percepción más alta del estrés agudo que los niños. Estos resultados destacan la importancia del estudio del estrés y muestran la relación entre el estrés y la psicopatología en la infancia.

Abstract

Stress can be associated with various physiological and psychological problems and its study can be used as a predictor variable. However, there are few studies that have successfully induced an acute stress response and characterized its biomarkers in children using valid and standardized procedures. In this study, the physiological and affective response to acute psychosocial stress was evaluated in 20 children (10 boys and 10 girls) aged 7-8 years, using the TSST-M (Trier Social Stress Test-Modified). During the test, 5 saliva samples were collected, 2 before the TSST-M and 3 after, in order to analyze cortisol and alpha-amylase reactivity as indicators of HPA axis (hypothalamic-pituitary-adrenal) and SAM (Sympathetic-Adrenal-Medullary system) activity, respectively. The affective response was assessed 6 times using the Self-Assessment Manikin (SAM), 2 times before the TSST-M, 2 times during, and 2 times after. While the children performed the TSST-M, their primary caregivers completed questionnaires on the children's childhood adversity, which were used along with previously completed instruments on psychopathic personality traits and aggressive behavior as predictor variables of the stress response. Additionally, 5 saliva samples were collected over two weekend days, 3 upon waking, one at midday, and another in the evening, to analyze the diurnal rhythms of the biomarkers, focusing on the cortisol awakening response (CAR) and salivary alpha-amylase awakening response (sAA-AR).

The results show that the TSST-M is an adequate procedure to activate the physiological (cortisol and alpha-amylase) and emotional response to acute psychosocial stress in boys and girls. Additionally, it has been demonstrated that, under baseline conditions, children exhibit both CAR and sAA-AR. Moreover, there is an association between the acute stress response and psychopathic traits, as well as between the acute stress response and childhood adversity. Finally, it has been shown that there are no sex differences in physiological and affective responses to this acute psychosocial stress. No sex differences were found in CAR and sAA-AR under baseline conditions, nor were there sex differences in psychopathy. Additionally, girls with higher proactive aggression scores have a higher perception of acute stress than boys. These results highlight the importance of studying stress and show the relationship between stress and psychopathology in childhood.

Reflexió ètica

Les neurociències són una disciplina que busca comprendre el comportament i la ment humana i per aconseguir-ho, es realitzen estudis que requereixen la participació activa de persones. Això pot generar controvèrsia, però la realitat és que en l'actualitat, se segueix una legislació basada en la declaració de Helsinki (World Medical Association, 2014) com a guia de principis ètics per a investigacions mèdiques, que garanteix els drets humans. En el cas de la investigació en la que he col·laborat, els i les participants estaven informats de tot el procés abans de decidir si volien participar-hi. També, en tractar amb infants, tots els col·laboradors/es de l'estudi van presentar el certificat negatiu de delictes sexuals i van firmar el document "bones pràctiques de recerca" i comptàvem amb protocols per assegurar-nos que la situació no els sobrepassava.

En la meua experiència, la gran majoria de participants de l'estudi mostrava interès i satisfacció de poder contribuir en un estudi científic.

Reflexió de sostenibilitat

La sostenibilitat en la investigació és de vital importància, ja que s'utilitza constantment grans quantitats d'aigua, materials i energies no renovables. A més, s'acostuma a generar residus químics i biològics que poden ser perjudicials per a les persones i pel medi ambient si no són manipulats de manera correcta. És per això que és important optimitzar els protocols experimentals i implementar un sistema efectiu de gestió de residus, que inclogui la separació, emmagatzemant, transport i eliminació responsable d'aquests, seguint les normes de seguretat i regulació ambiental. I per aquest motiu considero que ser un bon científic no és només fer una bona praxi del laboratori, sinó també ser coherent i sostenible en les teves accions dins i fora del laboratori.

Reflexió de perspectiva de gènere

Segons el ministeri d'Universitats, el percentatge de dones matriculades en graus universitaris de ciències de la salut l'any 2020 va ser del 70,8%, però moltes vegades aquesta xifra no es veu reflectida quan mirem els alts càrrecs del personal de salut, la qual cosa podria ser atribuïda a l'efecte Matilda. En canvi, aquest projecte, no només estava al càrrec de dues Doctores, sinó que la majoria de les col·laboradores eren dones, i crec que aquest factor ha contribuït positivament a les dinàmiques que han tingut lloc a l'aula i al laboratori. A més, aquest projecte compta amb perspectiva de gènere, ja que es treballa amb nens i nenes i un dels objectius experimentals és comparar explícitament els dos sexes, a diferència de molts estudis on la variable "sexe" és només una co-variable i no es disgreguen les mitjanes dels dos grups.

1. Introducció

1.1. L'estrès

L'estrès és una resposta fisiològica i emocional normal de l'organisme davant de situacions que es perceben com amenaçants o desafiants pel benestar de la persona (Belda et al., 2015). L'estudi de l'estrès és important perquè té un impacte significatiu en la salut física i mental dels individus, així com en la seva qualitat de vida. S'ha demostrat que quan una persona està sotmesa a nivells molt alts d'estrès o l'estrès es manté durant un període llarg de temps, el seu organisme es pot veure afectat per una resposta fisiològica contínua a l'estrès, que pot alterar les seves funcions cognitives, afectives i conductuals, així com el sistema immunitari (Armario & Nadal, 2013). Això pot repercutir en la nostra salut i provocar un ampli ventall de trastorns fisiològics i psicològics; com malalties cardiovasculars, immunològiques i digestives, depressió, ansietat i trastorns del son (Smith & Pollak, 2020).

L'estudi dels efectes de l'estrès agut en persones implica el disseny i implementació de protocols d'inducció d'estrès que garanteixin la seva manipulació com a variable independent en un context de control de les variables. A més, es necessiten procediments no invasius que generin nivells moderats d'estrès instantani i que no es manifestin a llarg termini, per poder observar els efectes sense provocar perjudicis als i les participants de l'estudi (Ferreira, 2019). Els protocols com el *Cold pressor Task* (CPT) i el *Trier Social Stress Test* (TSST) han estat dissenyats per induir estrès en persones i són altament acceptats per la comunitat científica pel seu extens ús en experiments de diverses àrees, tant en psicologia com en neurociències (Ferreira, 2019).

S'ha estudiat àmpliament l'efecte de l'estrès en adults i les diferències individuals existents, però quan busquem referències bibliogràfiques sobre aquest tipus d'estudis en infants, ens adonem que hi ha molt poca informació al respecte. Com s'ha mencionat anteriorment, l'estrès pot estar associat a diversos problemes fisiològics i psicològics i el seu estudi pot servir com a variable predictora (Revisat a Chesnut et al., 2021). En l'estudi de Hollanders et al., (2017), en el que fa una revisió sistemàtica i una metaanàlisis de la literatura existent sobre les diferències de gènere específiques en l'activitat de l'eix HPA durant la infància, es manifesta que es necessita més investigació en aquest camp per comprendre totalment les diferències individuals en l'activitat de l'eix HPA en la infància.

1.2. El TSST-M

El *Trier Social Stress Test* (TSST) és un dels mètodes mencionats anteriorment per induir la resposta a un estrès agut en un laboratori. El protocol original va ser proposat per Kirschbaum et al., (1993) i és un procediment estandarditzat que provoca respostes moderades d'estrès subjectiu i fisiològic de manera fiable. En el TSST els i les participants primer passen per un període d'aclimatació a l'ambient de laboratori d'uns 30 minuts, després són conduïts a una segona sala on realitzaran una exposició oral i una prova matemàtica davant d'un jurat entrenat que mostrarà una reacció neutra. Aquesta fase tindrà una durada d'uns 15-20 minuts.

Finalment, són traslladats a la primera sala on passaran pel procés de recuperació entre 30 i 70 minuts (Allen et al., 2017). Al llarg de les diferents fases es recullen mostres de saliva amb l'objectiu d'analitzar diferents paràmetres que serveixen com a biomarcadors de l'estrès. D'aquesta manera es pot quantificar l'activació dels sistemes fisiològics de l'estrès abans, durant i després d'un estímul estressant. Segons els paràmetres que es vulguin estudiar, les característiques dels i les participants de l'estudi i les possibilitats del projecte de recerca, les condicions del TSST poden canviar o ser adaptades.

El TSST, a part de ser un mètode fiable i àmpliament utilitzat, té validesa ecològica, és a dir, és equiparable a situacions que ens trobem tots en la vida real, com per exemple la pressió i estrès que pot generar el fet de fer un examen o haver de parlar en públic, ja sigui per una exposició oral, per una reunió de la feina, etc. (Henze et al., 2017). També permet veure diferències individuals i no només de grup i serveix per a un ampli rang d'edats, sempre que s'adapti el format del TSST (Frisch et al., 2015). En aquest estudi es farà ús d'una versió d'aquest protocol anomenat *Modified Trier Social Stress Test* (TSST-M), desenvolupada per Yim et al., (2015) i específicament adaptada per a nens i nenes de 7 a 8 anys. Els biomarcadors que s'utilitzaran per avaluar l'estrès dels participants són el cortisol i l'alfa-amilasa. L'obtenció de les mostres es pot realitzar de diferents maneres, en aquest cas s'utilitzarà l'extracció de saliva, ja que és el procediment menys invasiu en comparació a altres com el sèrum, el qual s'extreu de la sang mitjançant una punció.

1.3. Marcadors Biològics de l'estrès

Com s'ha mencionat anteriorment, l'estrès és la resposta natural del cos a un estímul i el podem avaluar segons les respostes que genera a escala emocional, cognitiva, conductual i fisiològica. En aquest estudi ens centrarem en les respostes emocionals i fisiològiques.

La resposta **afectiva** a l'estrès agut és la tensió que experimenta una persona a causa d'una situació inesperada o percebuda com a desafinat. Es caracteritza per l'aparició d'emocions intenses que poden ser tristesa, ansietat, ira, frustració i sensació d'incertesa (Lovibond & Lovibond, 1995).

La resposta **fisiològica** a l'estrès implica una gran quantitat de modificacions homeostàtiques, les més estudiades són les metabòliques i les neuroendocrines (Nadal & Armario, 2010). Entre aquestes hi ha l'activació del SAM, que dona lloc a canvis cardiovasculars i a l'alliberació de catecolamines i l'activació de l'eix HPA, responsable de l'alliberació de glucocorticoides al torrent sanguini (Armario et al., 2020). L'activació d'aquests dos sistemes està molt relacionada amb diverses patologies i per això són els més coneguts.

1.3.1. L'eix HPA

L'eix HPA és un important sistema de comunicació neuroendocrí del cos humà. S'encarrega de la resposta a l'estrès i la regulació del metabolisme i la inflamació (Armario et al., 2020). Com es veu a la **Figura 1**, davant un estímul estressant, s'activa l'amígdala, que és la regió del cervell que processa les respostes emocionals, i envia senyals, a través de vies neuronals, a les neurones

parvocel·lulars del nucli paraventricular de l'hipotàlem (PVN), que s'activen i s'indueix l'alliberació de l'hormona alliberadora de corticotropina (CRH), arginina vasopressina (AVP) i altres hormones secretores en la eminència mitjana (Belda et al., 2015a). Aquestes hormones actuen en les cèl·lules corticotropes de la pituitària anterior per estimular la síntesi i secreció d'hormona adrenocorticotropa (ACTH), que actua a la zona fasciculada del còrtex adrenal per promoure la síntesi i alliberació de glucocorticoides (corticosterona en rates i predominantment cortisol en humans i altres mamífers), que s'uneixen als receptors de mineralocorticoides (MR) i glucocorticoides (GR) per regular l'activitat de l'eix HPA (Rabasa et al., 2015). Els nivells màxims de glucocorticoides en plasma sanguini s'aconsegueixen entre 15 i 30 minuts després que actui l'agent estressant (Gjerstad et al., 2018).

El cortisol és una hormona esteroidea alliberada com a producte final de l'activació de l'eix HPA. Una vegada alliberat, activa una sèrie de respostes fisiològiques que ajuden el cos a respondre davant una situació estressant, entre elles hi ha el ràpid augment de la concentració de glucosa en sang per proporcionar energia de manera ràpida, la supressió del sistema immunitari i la modulació de la inflamació. També està involucrat en altres processos fisiològics com la son i la temperatura corporal (Armario & Nadal, 2013).

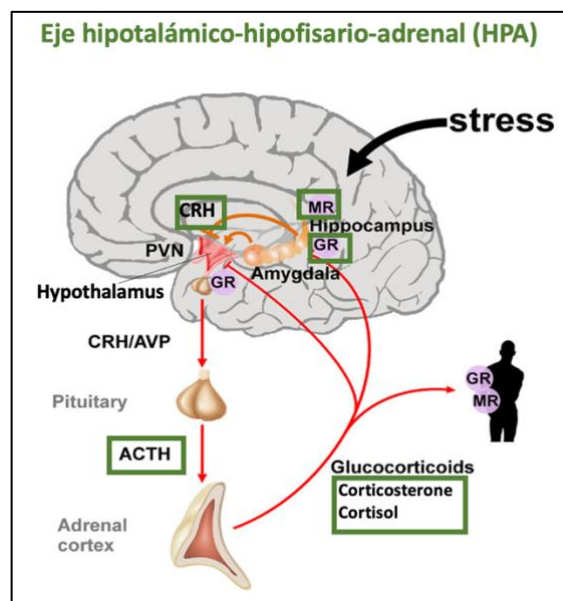


Figura 1: Esquema del funcionament de l'eix HPA. Imatge extreta de R. Nadal, 2023, Presentació en PowerPoint, Universitat Autònoma de Barcelona.

1.3.2. El SAM

El Sistema SAM és el responsable de la resposta immediata de l'organisme a l'estrès. S'activa en resposta a un estímul estressant agut a través d'un senyal enviat des de l'amígdala cap a l'hipotàlem i la part medul·lar de la glàndula adrenal, el que finalment porta a l'alliberació d'adrenalina i noradrenalina a la sang. Aquestes hormones activen el sistema nerviós simpàtic perifèric i fan que el cos es prepari per a l'acció, el que es coneix com la resposta de "lluita o fugida" (*fight or flight*). L'augment de l'activitat del SAM i l'alliberació d'adrenalina i noradrenalina donen lloc a una sèrie de canvis fisiològics que ajuden al cos a fer front a l'estrès agut. Aquests canvis, com es mostra a la **Figura 2**, inclouen l'augment de la freqüència cardíaca,

la pressió arterial, la freqüència respiratòria, la dilatació de les pupil·les per millorar la visió i la sudoració (revisat a Kvetnansky et al., 2009). A més, la noradrenalina estimula l'alliberació d'alfa-amilasa (Nater & Rohleder, 2009). La resposta del SAM és un procés ràpid i immediat que es desenvolupa en qüestió de segons després que el cos rebi l'estímul estressant i pot durar entre minuts i hores actiu (revisat a Wadsworth et al., 2019).

L'alfa-amilasa és un enzim que hidrolitza el midó i els carbohidrats en molècules més petites, com maltosa i glucosa, per la seva absorció i aprofitament. Es troba en diferents llocs del cos, com la mucosa bucal i el pàncrees i també es pot mesurar en mostres de sang o saliva per avaluar l'activitat del sistema nerviós simpàtic (Belda et al., 2015). Els nivells d'alfa amilasa en saliva poden augmentar en resposta a l'estrès, el que el converteix en un bon biomarcador per mesurar l'activitat del sistema nerviós simpàtic i la seva relació amb l'estrès del cos (Armario et al., 2020).

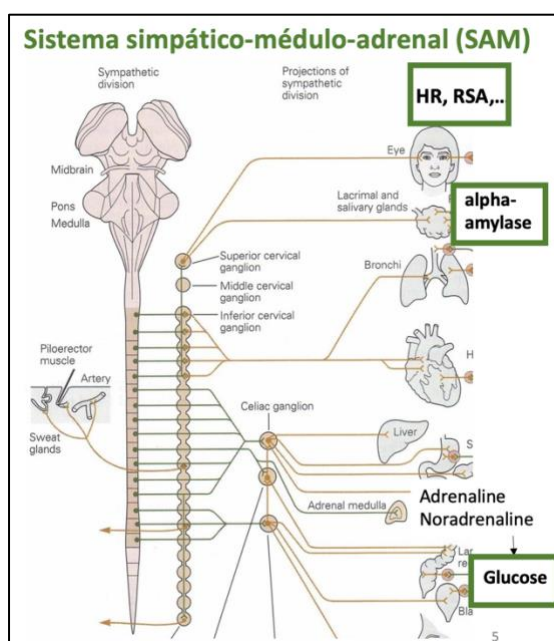


Figura 2: Esquema del funcionament del SAM. Imatge extreta de R. Nadal, 2023, Presentació en PowerPoint, Universitat Autònoma de Barcelona.

1.4. El cicle circadiari: nivells basals d'alfa-amilasa i cortisol

A més d'activar-se en situació d'estrès, els eixos HPA i SAM també estan en funcionament en situacions basals seguint un ritme circadiari. El cicle circadiari és un procés biològic que regula els ritmes fisiològics i de comportament aproximadament cada 24 hores. Està influenciat per factors externs com la llum i la foscor, i controlat per un "rellotge biològic intern", que és un conjunt de cèl·lules nervioses presents a l'hipotàlem que s'anomena nucli supraquiasmàtic (Scheer et al., 2019). Aquest és el responsable de regular la son, la temperatura corporal, la pressió arterial, la secreció de certes hormones i en certa manera, el metabolisme (revisat a Wesarg-Menzel et al., 2024).

A nivell circadiari, cal destacar l'existència del CAR (Cortisol Awakening Response), una part del patró diürn de la secreció de cortisol. És la resposta saludable de l'activació del cos després

d'haver dormit i descriu el ràpid augment dels nivells de cortisol que es dona en els primers 30-45 minuts després de despertar-se. Està controlat pel nucli supraquiasmàtic de l'hipotàlem i s'utilitza com a biomarcador del bon funcionament de l'eix HPA, tot i que no és una mesura directa de la seva reactivitat a l'estrès. Posteriorment, els nivells de cortisol van disminuint seguint una pendent fins la nit (diurnal slope) (revisat a Adam et al., 2017).

A la **figura 3**, es visualitza l'hora en la qual s'han agafat les mostres de saliva i els corresponents nivells de cortisol al llarg del dia. Les 3 primeres mostres van ser agafades just després de despertar-se, 20 minuts després de despertar-se i 40 minuts després de despertar-se, respectivament. Es pot veure el CAR, compost per les tres primeres mostres i la posterior baixada seguint una pendent (*diurnal slope*), que arriba al mínim a l'hora en què els i les participants anaven a dormir.

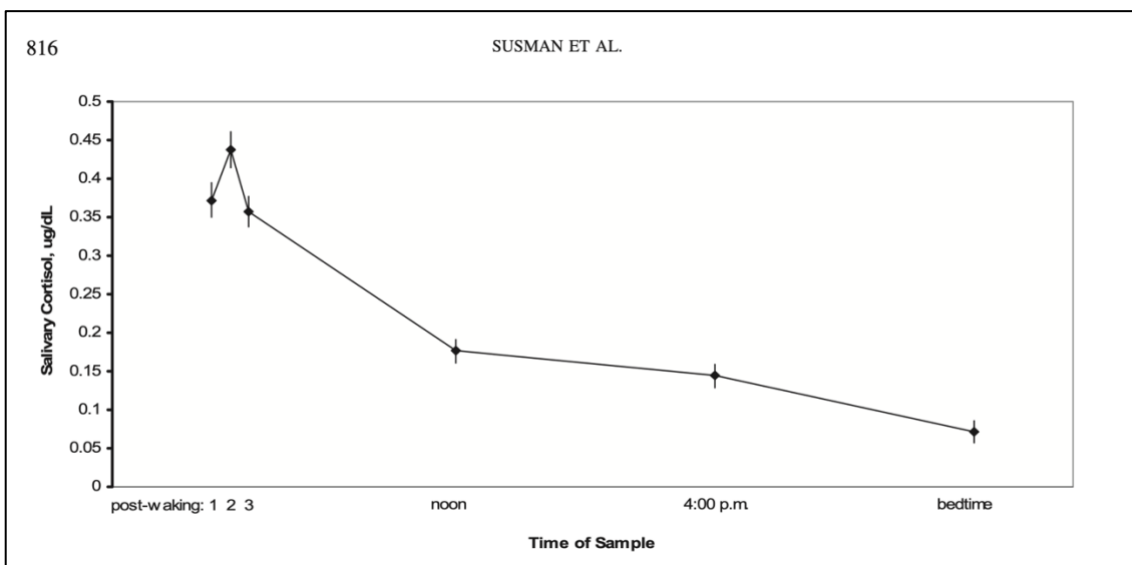


Figura 3: Mitjanes dels nivells de cortisol salival obtinguts al despertar (post-waking: 1 (immediatament), 2 (20 minuts després) i 3 (40 minuts després)), al migdia, a les 16:00h i abans d'anar a dormir (Susman et al., 2007).

Tenir un CAR atenuat o un *diurnal slope* atenuat, és a dir, una disminució de la resposta normal del cos a l'augment dels nivells de cortisol al despertar i/o al llarg del dia, pot estar associat a patologia (Stalder et al., 2022; Wesarg-Menzel et al., 2024).

En canvi, els nivells d'alfa-amilasa salival (sAA), com es veu a la **figura 4**, segueixen un patró quasi invers als del cortisol. Disminueixen lleugerament els 30 primers minuts després de despertar-se i a continuació augmenten considerablement durant les 5 primeres hores conseqüents a despertar-se. Després de les primeres 5 hores, els nivells de sAA es mantenen relativament estables la resta del dia (Nater et al., 2005). Igual que amb el cas del cortisol, la mesura de les condicions basals de l'alfa-amilasa no serveix com a indicador de la reactivitat a l'estrès. El patró que segueix l'alfa-amilasa en el moment de despertar se'l coneix com a sAA-AR.

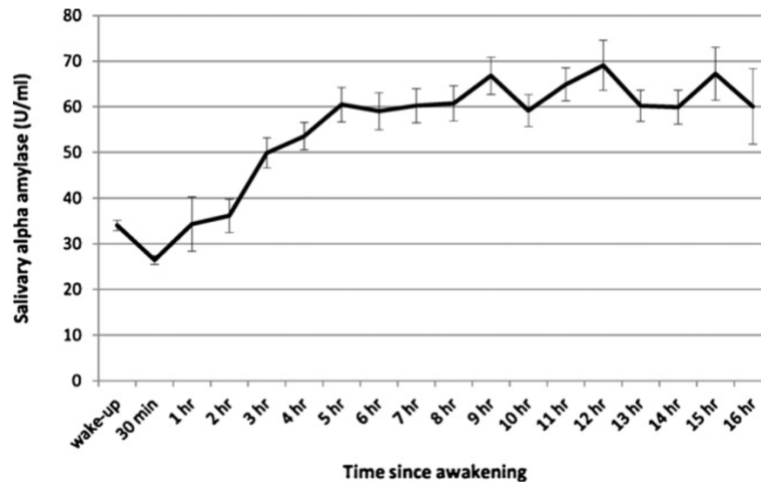


Figura 4: Mitjanes dels nivells d'alfa-amilasa salivals obtinguts al llarg del dia (Out et al., 2013).

Presentar nivells d'alfa-amilasa basals atenuats podria estar associat a una menor activitat autonòmica o, tal com passa amb el cortisol, a patologia (Revisat de Nater et al., 2005).

1.5. L'estrès com a variable predictora de la psicopatologia

1.5.1. La psicopatia

La psicopatia és un trastorn de la personalitat que es caracteritza per trets com impulsivitat, agressivitat proactiva, emocions superficials, falta d'empatia cap als altres, manipulació i molt bones habilitats socials. Aquests trets de la personalitat també poden estar presents en diferents graus en persones sanes. L'estudi de la psicopatia està principalment estudiat en homes adults (Verona & Vitale, 2006) i encara no es coneix amb exactitud la seva relació amb el cortisol i l'alfa-amilasa. En l'estudi de Borráz-León et al., (2023) es va trobar que les persones amb trets narcisistes i de grandiositat tenien una resposta hormonal i emocional atenuada a l'estrès, i que aquesta resposta estava associada a característiques psicopàtiques. Tot i així, l'estudi també assenyalava que es necessiten més investigacions amb mostres més grans i heterogènies per confirmar aquests resultats. A més, els homes amb trets psicopàtics alts, no van mostrar un augment dels nivells de cortisol induïts per un estrès psicosocial, a diferència dels homes amb baixos trets psicopàtics. Aquest efecte no va ser present en les dones participants de l'estudi (O'Leary et al., 2007). En un altre estudi (Welker et al., 2014) es va trobar que, en condicions basals, el cortisol moderava la relació entre la testosterona i la psicopatia en homes. Específicament, la relació entre la testosterona i la psicopatia era positiva quan els nivells de cortisol eren alts, però negativa quan els nivells de cortisol eren baixos. Aquests resultats suggereixen que la variabilitat no clínica en la psicopatia es pot predir pels nivells basals de cortisol i testosterona.

Pel que fa a l'alfa-amilasa, els resultats són semblants als del cortisol. En homes adults amb trets psicopàtics més alts, es va veure una reducció modesta en la reactivitat de l'alfa-amilasa salival després d'un estrès psicosocial en comparació amb aquells participants que van obtenir puntuacions més baixes de psicopatia. Aquest estudi suggereix possibles dèficits reguladors de

la resposta a l'estrès en adults masculins amb trets psicopàtics (Glenn et al., 2015). No s'ha trobat bibliografia existent sobre la relació entre els nivells d'alfa-amilasa en condicions basals en persones amb trets psicopàtics alts.

1.5.2. L'adversitat en la infància

L'adversitat en la infància són les experiències estressants o traumàtiques que els infants poden experimentar durant els primers anys de vida. És un factor de risc per l'aparició de moltes psicopatologies en l'etapa adolescent i adulta i té un impacte en el desenvolupament neurobiològic i en l'epigenètica (Chen et al., 2021). Els investigadors han documentat desregulacions de l'eix HPA en infants i adolescents que han patit estrès en la infància. Aquests infants i adolescents presenten nivells alterats de cortisol en condicions basals (Smith & Pollak, 2020). La naturalesa precisa d'aquesta desregulació és difícil de conèixer; s'han reportat tant patrons elevats com atenuats de la regulació de cortisol diürn en infants i adolescents exposats a un major estrès en la infància. Aquests resultats podrien ser deguts a canvis evolutius en la relació entre l'adversitat en la infància i el funcionament de l'eix HPA (King et al., 2017).

En l'estudi de Zhang et al., (2019) en el que 50 persones van ser sotmeses al TSST, es va trobar una correlació negativa significativa entre la intensitat de l'estrès patit en la infància i l'augment de cortisol enfront a l'estrès agut psicosocial. És a dir, els i les participants que havien patit un estrès més intens en la infància, tenien una menor reactivitat al cortisol davant l'estrès agut. La resposta afectiva no va mostrar una associació significativa amb l'estrès en la infància.

Pel que fa a l'alfa amilasa, s'han trobat dades contradictòries, però la revisió sistemàtica de Hakamata et al., (2022), que analitza un total de 27 metaanàlisis, suggereix que els infants que han patit adversitat en la infància, tendeixen a tenir nivells més baixos d'alfa-amilasa salival que aquells infants que no n'han patit, tant en condicions basals com després d'un estrès agut.

1.6. Diferències entre sexes

Les diferències entre sexes dels nivells de cortisol i alfa-amilasa salival és un camp poc estudiat. En condicions basals, en alguns articles s'ha trobat que les dones presenten nivells més alts de cortisol mentre que en altres no es troben diferències significatives (Liu et al., 2017). En cap cas s'han trobat diferències significatives pel que fa a l'alfa-amilasa en condicions basals (Maruyama et al., 2012).

En reactivitat per un estrès psicosocial, però, s'ha vist que els homes acostumen a presentar nivells més alts de cortisol, mentre que tampoc s'han trobat diferències en els nivells d'alfa-amilasa (Liu et al., 2017).

Es creu que aquestes diferències en els nivells de cortisol salival podrien estar relacionades amb les hormones sexuals, com la testosterona i els estrògens. És per això que no s'espera trobar diferències significatives en infants prepuberals.

Objectives

Stress is a multidimensional response of the body that can be used as a predictive variable for health. However, there is no reliable way to induce acute stress. This is why the main objective of this study is the validation of the study of an acute psychosocial stress in second grade children, using cortisol and alfa-amylase as a biomarker. Due to the timings of the project, I was not able to use real cortisol and alfa-amylase data, so, with the consent of the UDG thesis committee, simulated data of cortisol and alfa-amylase were used based on the results obtained from the pilot study and the pre-existing literature. Which were combined with legitimate data obtained from children's perceived stress and questionnaires answered by their main caregivers.

Below are shown the secondary goals:

1. Describe cortisol and alfa-amylase response after an acute psychosocial stressor in children.
2. Analyze the affective responses induced by an acute psychosocial stressor in children based on perceived stress.
3. Verify that cortisol and alfa-amylase correspond to the circadian cycle, focusing on the cortisol awakening response and alfa-amylase awakening response.
4. Characterize the relationship between responses to acute stress (affective and physiological) and behavioral/personalities traits in children (aggressive behavior and psychopathic traits).
5. Characterize the relationship between responses to acute stress (affective and physiological) and children's stressful life events and parent's perceived chronic stress, as a measure of early adversity.
6. Identify the possible sex differences in the previously mentioned parameters.

Before the realization of this thesis, it was hypothesized that HPA and SAM axis would react to an acute psychosocial stressor in children, as well as perceived stress. Also, that the cortisol and alpha-amylase awakening responses would be present. Another hypothesis was that aggressive behaviors and psychopathic traits would correlate with children's stress reactivity, as well as early adversity, and finally, that there would not be sex differences because of participant's age.

Taken together, this study aims to provide an overview about how the children's body reacts to an acute psychosocial stress, how children perceive this stress, see if it is related to psychopathology and understand the differences between boys and girls.

2. Metodologia

Aquest estudi, actiu en l'actualitat, el porta a terme el grup del laboratori humà de la Universitat Autònoma de Barcelona, concretament a l'Institut de Neurociències.

2.1. Participants de l'estudi

Els i les participants formen part d'una mostra comunitària procedent d'una població del Vallès, reclutada a través de les escoles. Van ser nens i nenes de segon de primària (entre 7 i 8 anys), en total N= 200, tot i que en aquest estudi ens centrarem en una mostra de N=20 (10 nens i 10 nenes) seleccionats segons les seves puntuacions en trets psicopàtics, 5 nens i 5 nenes amb puntuacions altes (≥ 2) i 5 nens i 5 nenes amb puntuacions baixes (≤ 2) d'entre els i les participants totals.

Els cuidadors/es van firmar un consentiment informat i es va sol·licitar l'assentiment oral dels nens i nenes, així com també es va proporcionar informació sobre la protecció de dades. A més, l'estudi compta amb l'aprovació del comitè d'ètica UAB i de la Generalitat de Catalunya (Departament d'Educació).

Els criteris d'exclusió per a la participació en l'estudi es mostren a continuació:

- Patir alguna patologia neurològica severa.
- Haver obtingut una puntuació inferior a 2 SD a les proves de vocabulari i matrius del WISC-V¹.
- Patir Trastorns psiquiàtrics o del neurodesenvolupament greus.
- Estar duent a terme un tractament farmacològic que afecti la secreció de cortisol.
- Malalties endocrines.
- Impediments visuals, auditius o motors severos.
- Infeccions greus en el moment de fer la prova.
- Malalties cròniques com la diabetis, problemes coronaris, càncer o malalties pulmonars.

Es va permetre la participació dels casos lleus de trastorns d'espectre autista (TEA), a excepció que la gravetat de la condició dificultés la comunicació amb l'infant. Es va indicar als i les participants que en cas d'estar prenent medicació pel Trastorn per Dèficit d'Atenció i Hiperactivitat (TDAH), aquesta no havia de ser consumida els dies de la realització de les proves.

¹ WISC-V: L'escala d'intel·ligència de Wechsler per infants (cinquena edició) serveix per avaluar les capacitats cognitives d'infants i adolescents entre 6 i 16 anys. Obtenir una puntuació inferior a 2 SD significa que l'infant té un coeficient intel·lectual inferior a 70 (Miller, 2019).

2.2. Recollida de mostres en condicions basals

Abans que els i les participants i les seves famílies vinguessin al laboratori a fer la prova, ja havien vingut un primer dia (sessió 1) amb altres objectius experimentals. Al final de la sessió 1 se'ls hi va proporcionar un "kit" de materials i instruccions detallades per a la presa de mostres de saliva a casa, juntament amb un registre on havien d'anotar les hores de la presa de mostra.

Aquestes mostres les van retornar a l'inici de la prova perquè poguessin ser analitzades i es poguessin utilitzar per a la determinació dels nivells de cortisol i alfa-amilasa basals de cada participant durant el dia.

En total cada participant va recollir 10 mostres de saliva separades en 2 dies consecutius (5 mostres al dia) seguint els horaris esmentats a la **figura 5**.

Mostra	Hora
Mostra nº1	08:00h (o al despertar-se, però mai més tard de les 08:00h)
Mostra nº2	08:30h (o 30 min després de despertar-se)
Mostra nº3	08:45h (o 45 min després de despertar-se)
Mostra nº4	13:00h, la una
Mostra nº5	20:00h, les vuit

Figura 5: Horari de les mostres de saliva que s'han de recollir a casa. Adaptat de "Manual Trier Social Stress Test (TSST)", per Grup de recerca Laboratori Humà, 2024.

També es va informar als i les participants que havien d'evitar el consum d'aliments, begudes (a excepció d'aigua) i la realització d'exercici físic intens dues hores abans de la mostra i evitar raspallar les dents 30 minuts abans d'agafar la mostra. I en cas de dubtes o accidents, anotar-ho a observacions. Per assegurar que les famílies realitzaven el mostreig correctament i poder tenir un registre de les hores en què ho feien, es va utilitzar el "Monitoring Event Medication System" (MEMS). Aquest dispositiu creat per *Aardex Group* registra electrònicament cada vegada que s'obre i es tanca el capçal (Olivieri et al., 1991). Tenir un registre de les hores en què s'ha realitzat les mostres de saliva és un punt clau per poder realitzar una correcta valoració de les respostes fisiològiques de l'estrès tant a nivell basal com a nivell reactiu, ja que el cortisol i l'alfa-amilasa tenen un ritme circadiari molt marcat on els primers 45 minuts post despertar-se són vitals per poder detectar alguna anomalia en el seu funcionament. El MEMS està configurat perquè ens envii el registre de les hores de la presa de mostres a casa amb el codi del participant i és una estratègia afegida per augmentar la fiabilitat i veracitat de les mostres.

2.3. Procediment – El TSST-M

Aquesta fase tenia una durada aproximada d'1,5 hores. Quan les famílies arribaven al laboratori, eren recollides per l'investigador A, que es presentava, els hi recullia les mostres de saliva realitzades al cap de setmana anterior i les conduïa fins a la sala 1, on es trobaven amb l'investigador B, que explicava el procediment, preguntava al cuidador sobre l'hora que s'havia

despertat l'infant, la recollida de les mostres, la presència de malalties o infeccions i la ingesta d'aliment, beguda o realització d'exercici en les dues hores prèvies a l'arribada. A continuació es prenen mesures antropomètriques de l'infant (pes, alçada, talla de cintura i talla de malucs) juntament amb la primera mostra de saliva (S1) i la primera mostra de percepció subjectiva d'estrès (SAM 1) (**figura 7**).

Després, l'investigador A conduïa al cuidador/a a la sala 2, on estaria la resta de temps contestant qüestionaris sobre ell/a mateix/a i sobre l'infant. Mentrestant, l'infant juntament amb l'investigador B, començava el període d'**habitució**, que tenia una durada de 30 minuts i tenia l'objectiu d'evitar possibles interferències entre el possible estrès ocasionat per accedir a un ambient nou i l'estrès originat pel TSST. En aquests 30 minuts l'infant havia d'estar en silenci fent una tasca de relaxació (pintar o visualitzar vídeos d'animals i naturalesa, a elecció seva).

Quan faltaven 2 minuts per haver completat els 30 minuts de relaxació, l'investigador B prenia una mostra de saliva al o la participant (S2) i en finalitzar, portava a l'infant a la sala **TSST-M**, on li explicava el procediment de la prova. Aquesta estava dividida en dues parts; la primera consistia a preparar i fer una exposició oral en la qual l'infant havia d'imaginar que arriba a una classe nova i s'ha de presentar als nous companys i explicar què li agrada, què se li dona bé, etc., amb la finalitat d'aconseguir que aquests es vulguin fer amics seus. Si l'infant es quedava en blanc més de 15 segons, un dels membres del jurat li deia que continués amb l'exposició, i si es tornava a quedar en blanc, es passava a fer una sèrie de preguntes.

A la segona part, l'infant havia de fer en veu alta una tasca aritmètica (restar d'1 en 1 des de 100 fins a 0 el més ràpid possible i sense equivocar-se). Si aquest s'equivocava, es feia sonar un timbre i un membre del jurat li feia saber que s'havia equivocat i que havia de tornar a començar. A la tercera vegada que s'equivocava, se li demanava que tornés a començar, però aquesta vegada des de 40 i, finalment, si es tornava a equivocar 3 vegades, se li demanava que sumés d'1 en 1 des de 0. En total eren 15 minuts: 5 per preparar l'exposició oral, 5 per fer-la i 5 per la tasca aritmètica. En els minuts 7,5 i 12,5 des de l'inici de la prova, un membre del jurat li ensenyava el SAM (**figura 7**). En tot moment hi havia un jurat compost per dues persones (un home i una dona per respectar el biaix per gènere) i una sèrie d'elements per afegir intensitat (el jurat anava amb bata i mantenia una expressió neutra en tot moment; hi havia dues càmeres gravant al participant, dos micròfons, papers on el jurat fingia agafar nota del que diuen, un tamboret on el participant havia d'estar enfilat i una llum que l'il·luminava).

Una vegada transcorreguts els 15 minuts, un membre del jurat deia que el temps havia finalitzat i obria la porta perquè entrés l'investigador B i li prenguéss una mostra de saliva a l'infant (S3) i el conduís altra vegada fins a la sala 1, on començava l'última fase.

La darrera fase, la **recuperació**, consistia en 30 minuts en els quals l'investigador B realitzava 2 mostres de saliva (S4 i S5) mentre el o la participant, igual que en l'habitució, mirava vídeos de naturalesa o pintava. De la mateixa manera, s'havia d'evitar mantenir converses prolongades amb el o la participant.

Finalment, transcorreguts els últims 30 minuts, es conduïa al participant a la sala 2, on es retrobava amb el cuidador i juntament amb l'investigador A es realitzava el **debriefing**. Aquest tenia una durada aproximada de 10 minuts i en ell es feia un *feedback* a l'infant i al cuidador. Se'ls hi donava les gràcies per la participació i se'ls hi feia entrega d'un certificat de participació i d'un obsequi simbòlic (una tassa). En la **figura 6** es mostra un esquema cronològic del procediment que seguien els participants al laboratori.

2.4. Dades obtingudes

Durant el procediment, es van realitzar diferents mostres als participants que es poden veure alterades davant un estímul estressant. Aquestes es poden classificar en variables fisiològiques i afectives. A part, tal com s'ha mencionat anteriorment, els cuidadors/es dels i les participants omplien uns qüestionaris que son variables psicològiques predictives.

2.4.1. Variables fisiològiques

Concentració de cortisol (hormona que indica l'activació de l'eix HPA) i alfa-amilasa (enzim que se segrega amb l'activació del SAM) en saliva. La saliva es recollirà amb els salivettes (Sarstedt, Ref: 51.1534.500, Alemanya), es centrifugarà a 2000G, 4 °C durant 15 minuts i s'emmagatzemarà en eppendorfs a -80°C fins al dia de l'anàlisi bioquímica. (salivetes i eppendorfs han d'estar rotulats prèviament).

En total es realitzaran 5 mostres de saliva distribuïdes abans i després del TSST (Temps=0).

- S1: T -30: A l'arribada del o la participant al laboratori (Sala 1)
- S2: T0: Abans de conduir el o la participant a la sala TSST (Sala 1)
- S3: T+15: Quan finalitzi el TSST (Sala TSST)
- S4: T+30: Durant la recuperació (Sala 1)
- S5: T+45: En finalitzar la recuperació (Sala 1)

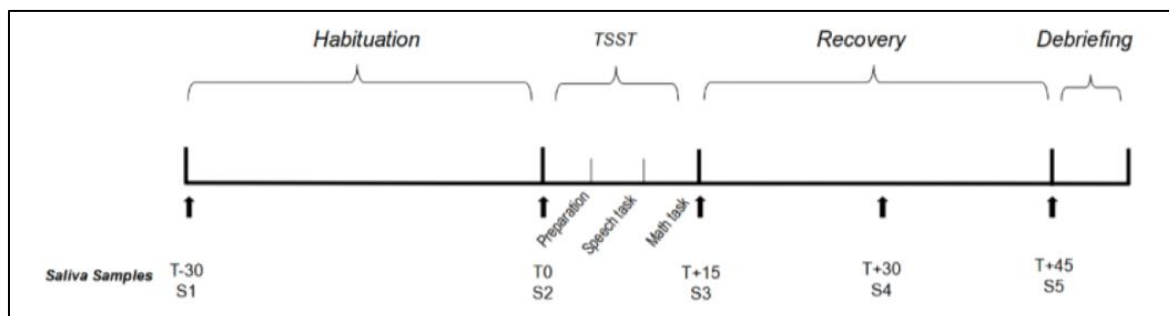


Figura 6: Esquema de la realització de mostres de saliva. Adaptat de "Manual Trier Social Stress Test (TSST)", per Grup de recerca Laboratori Humà, 2024.

Per a la presa de les mostres de saliva, l'investigador B (amb guants) col·locarà el cotó que es troba dins del salivette a la boca del participant, on el tindrà durant 2 minuts movent-lo per la boca sense mastegar-lo perquè aquest s'impregni de saliva. Transcorregut el temps, se li traurà de la boca i es tornarà a dipositar dins el salivette i aquest en gel fins a la seva centrifugació.

2.4.2. Variables afectives

Es va utilitzar el SAM (self Assessment Manikin) per tal de mesurar la percepció subjectiva a l'estrès dels i les participants. Aquest consisteix en un test pictòric i no verbal que mesura l'activació o estrès en resposta a estímuls momentanis (Bradley & Lang, 1994) en una escala de l'1 al 5 (figura 7).

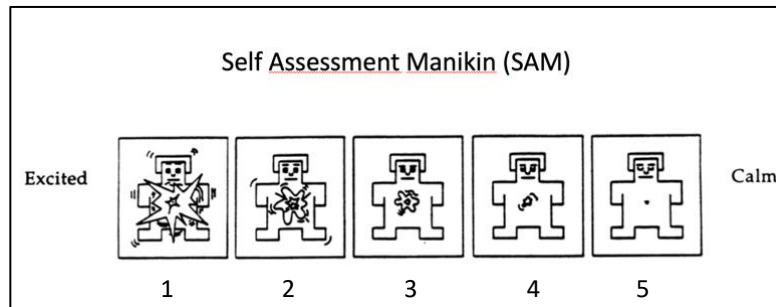


Figura 7: Self Assessment Manikin (SAM), utilitzat com a variable afectiva sobre la percepció subjectiva a l'estrès.

El SAM va ser administrat un total de 6 vegades juntament amb la pregunta: "Amb quin ninot SAM et sents identificat ara mateix?".

Els moments d'administració del SAM es mostren a continuació:

- SAM 1: A l'arribada al laboratori, juntament amb S1 (Sala 1).
- SAM 2: Abans d'iniciar el TSST, juntament amb S2 (Sala 1).
- SAM 3: Durant el TSST, al minut 7.5 (Sala TSST).
- SAM 4: Durant el TSST, al minut 12.5 (Sala TSST).
- SAM 5: Durant la recuperació, juntament amb la S4 (Sala 1).
- SAM 6: Durant la recuperació, juntament amb la S4 (Sala 1).

Les administracions de SAM que coincideixin amb la presa de mostres de saliva (1,2,5 i 6) es realitzaran mentre el participant té el cotó del salivette a la boca.

2.4.3. Variables psicopatològiques

Els qüestionaris es van realitzar pels cuidadors/es dels i les participants a la Sala 2. En total cada cuidador/a va omplir 2 qüestionaris a través del REDCAP (Research Electronic Data Capture), que és una aplicació web segura que serveix per crear i gestionar enquestes i bases de dades en línia (Harris et al., 2019).

Els qüestionaris contestats pel cuidador/a principal es mostren a continuació:

Perceived stress scale (Cohen et al., 1983), versió espanyola (Remor, 2006). Utilitzat per mesurar el nivell de percepció de l'estrès crònic dels cuidadors del participant. Té 14 ítems amb preguntes sobre la freqüència en què han pensat en una cosa o s'han sentit d'una manera específica en l'últim mes i té 4 opcions de resposta que van de menys freqüent a més freqüent. S'obté una puntuació total en la que valors més alts indiquen més estrès percebut.

Child Life-Events Check-List (Johnson & McCutcheon, 1980). Serveix per avaluar els esdeveniments estressants que han tingut lloc durant la infància del o la participant. Consisteix en 38 ítems que pregunten si l'infant ha viscut una sèrie d'esdeveniments i 2 opcions de resposta, que són Sí o No. S'obté una puntuació total en la que els valors més alts indiquen que l'infant ha patit més estrès en la infància.

Per l'estudi, també s'utilitzaran dos qüestionaris contestats pel cuidador/a principal en la sessió 1, anterior a la prova de laboratori. Aquests es mostren a continuació.

Report of Proactive and Reactive Behaviors (Dodge & Coie, 1987), versió espanyola (López-Romero et al., 2012). Serveix per avaluar els comportaments reactius (respostes impulsives o agressives a provocacions o frustracions) i proactius (impliquen l'agressió planificada per obtenir un objectiu) dels i les participants. Té 6 ítems i 4 opcions de resposta, que van de menys freqüent a més freqüent. S'obtenen dues puntuacions, una que fa referència a agressivitat proactiva i una que fa referència a agressivitat reactiva. En els dos casos, una puntuació més alta indica més agressivitat, sigui proactiva o reactiva.

Child Problematic traits Inventory (Colins et al., 2014), versió espanyola (López-Romero et al., 2019). Consisteix a avaluar els trets psicopàtics i identificar comportaments problemàtics en la infància. Té 28 ítems que serveixen per identificar 3 trets de la personalitat: insensibilitat emocional, grandiositat i engany i impulsivitat i necessitat d'estimulació. Té 4 opcions de resposta que van de menys verdader a més verdader. S'obté la puntuació total i com més elevada sigui aquesta, més pronunciats seran els trets psicopàtics.

2.5. Tècniques bioquímiques

Tot i que a causa de la programació i temporització del projecte no he pogut participar en l'anàlisi bioquímica de les mostres de saliva ni obtenir les dades reals, el comitè de TFG de la UdG m'ha permès utilitzar dades simulades de Cortisol i alfa-amilasa, que han estat creades a partir de les dades obtingudes en l'estudi pilot i d'acord amb la revisió bibliogràfica dels resultats d'altres estudis realitzats amb mètodes i participants similars.

2.5.1. Quantificació de Cortisol en saliva

Per a la determinació dels nivells de cortisol en saliva, es va utilitzar un radioimmunoassaig (RIA) amb doble anticòs (Goldberg et al., 2023). El cortisol utilitzat pel RIA és Cortisol I₁₂₅ (Cortisol-3-O-CMO_histamina), amb activitat específica 10 µCi com a traçador (MP-Biomedicals-Alemanya); Cortisol sintètic (Sigma, Barcelona) com estàndard i un anticòs produït en conills contra Cortisol-3-O-Carboximetiloxima-BSA (MP-Biomedicals-Alemanya). El complex va ser precipitat amb anticòs de cabra contra IgG de conill (Sigma, Barcelona). Les mostres diluïdes van mostrar bon paral·lelisme amb la corba estàndard i la recuperació de mostres fortificades va ser del 100%. Totes les mostres per la comparació estadística van ser analitzades en el mateix assaig per evitar la variabilitat entre assajos. El coeficient de variació intra-assaig va ser inferior al 12%. La sensibilitat per al cortisol en saliva va ser de 80 pg/ml per 20 µl de mostra utilitzada.

2.5.2. Quantificació d'alfa-amilasa en saliva

Per la determinació de l'alfa-amilasa es va utilitzar un "kit" d'assaig enzimàtic cinètic d'alfa-amilasa salival (Salimetrics, Ref: 1-1902-5, Regne Unit). Aquest mètode utilitza un substrat cromogènic, 2-Clor-P-Nitrofenol unit a maltrotrosia. L'acció enzimàtica de l'alfa-amilasa sobre aquest substrat produeix 2-Clor-P-Nitrofenol, que pot mesurar-se espectrofotomètricament a 405nm. La quantitat d'activació de l'alfa-amilasa en la mostra és directament proporcional a l'augment d'absorbància a 405nm. La reacció es llegeix en una placa de microtitulació de 96 pous amb controls proporcionats. El coeficient de variació intra-assaig va ser inferior al 7,2% i el inter-assaig va ser del 5,8%. La sensibilitat va ser de 2.0 U/ml. Protocol extret de Goldberg et al., (2023).

2.6. Anàlisis estadístiques

Per analitzar les dades obtingudes es va utilitzar el programa informàtic IBM SPSS V24 i per a la realització dels gràfics es va utilitzar el programa Graphpad-Prism V10. Els resultats es van considerar significatius quan $p < 0,05$.

Es van realitzar les mitjanes dels valors de cortisol i alfa-amilasa basals, respectivament, és a dir, la mitjana dels valors obtinguts de cortisol salival de dissabte i diumenge per cada participant i el mateix per l'alfa-amilasa. Tots els valors de cortisol i alfa-amilasa salival s'han transformat a log-10, ja que algunes de les dades no segueixen una distribució normal a la prova de Kolmogorov-Smirnov. Les anàlisis estadístiques s'han realitzat amb la mencionada transformació. També s'ha calculat l'àrea sota la corba superior i inferior (AUC_i i AUC_g, respectivament) per les variables de cortisol i alfa-amilasa en repòs i durant el TSST-M, utilitzant fórmules extretes de Pruessner et al., (2003).

Pel que fa als valors del SAM, s'han recodificat de l'1 (menor estrès percebut) al 5 (major estrès percebut). En referència als qüestionaris utilitzats, es va realitzar el sumatori de les puntuacions per a cada participant.

Per a les anàlisis de la inducció de cortisol, alfa-amilasa i estrès subjectiu durant el TSST-M, s'han realitzat ANOVAs de mesures repetides per totes les mostres agafades al llarg del TSST-M, utilitzant el temps com a factor intra-subjecte (-30, 0, 15, 30, 45 per cortisol i alfa-amilasa i -30, 0, 7.5, 12.5, 30, 45 per l'estrès subjectiu) i sexe com a factor entre-subjecte. També es van realitzar dues ANOVAs de mesures repetides més per analitzar els nivells basals de cortisol i alfa-amilasa, utilitzant com a factor intra-subjecte el temps (despertar, +30', +45', 13 h i 20 h) i sexe com a factor entre-subjecte. En el cas que el factor temps fos estadísticament significatiu, es van dur a terme anàlisis de contrastos posteriors (polinòmics per estudiar si se segueix una tendència quadràtica, o simples contra un valor de referència). Es van utilitzar correccions de Greenhouse-Geisser en cas que no es complís l'esfericitat assumida i proves de Levene per comprovar si se seguia la homogeneïtat de variàncies. Finalment, s'han realitzat correlacions bivariades de Pearson per estudiar la relació entre les diferents variables, tant amb la mostra global com separades per sexes.

3. Resultats

3.1. Cortisol salival durant el TSST-M

Per caracteritzar l'evolució dels nivells de Cortisol al llarg del temps durant la prova d'estrès, vam fer una anàlisi de la variància mixta. Els resultats van indicar que els nivells de Cortisol variaven al llarg del procés, com és d'esperar [temps: $F(2.57, 72) = 141.56, p < 0.01$], amb independència del sexe [Sexe, Sexe x Cortisol = NS]. Anàlisis addicionals de contrastos (polinomial) van indicar que les dades s'ajustaven a la tendència quadràtica [$F(1.18) = 29, p < 0.001$]; és a dir, els nivells de Cortisol van pujar durant la tasca d'estrès i posteriorment es van recuperar els nivells basals. Una anàlisi complementària de contrastos (simple) va demostrar que en comparació amb els nivells basals, el cortisol va pujar durant la tasca d'estrès [$F(1.18) = 72.81, p < 0.01$], com es veu a la **figura 9**.

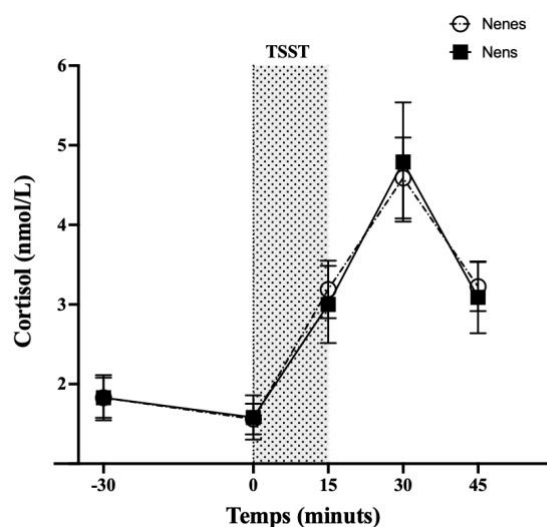


Figura 8: Nivells de cortisol salival (nmol/L) per sexes durant el temps en el laboratori, sent el temps 0 a l'inici del TSST-M. Dades simulades. N=20 (10 nens i 10 nenes).

3.2. Alfa-amilasa salival durant el TSST-M

Per caracteritzar l'evolució dels nivells d'Alfa-amilasa al llarg del temps durant la prova d'estrès, vam realitzar una anàlisi de la variància mixta. Els resultats van indicar que els nivells d'Alfa-amilasa variaven al llarg del procés, com és d'esperar [temps: $F(2.9, 72) = 2516.95, p < 0.01$], amb independència del sexe [Sexe, Sexe x Alfa-amilasa = NS]. Anàlisis addicionals de contrastos (polinomial) van indicar que les dades s'ajustaven a la tendència quadràtica [$F(1.18) = 266.1, p < 0.001$]; és a dir, els nivells d'alfa-amilasa van pujar durant la tasca d'estrès i posteriorment es van recuperar els nivells basals. Una anàlisi complementària de contrastos (simple) va demostrar que en comparació amb els nivells basals, l'alfa-amilasa va pujar durant la tasca d'estrès [$F(1.18) = 1002.21, p < 0.01$], com es veu a la **figura 10**.

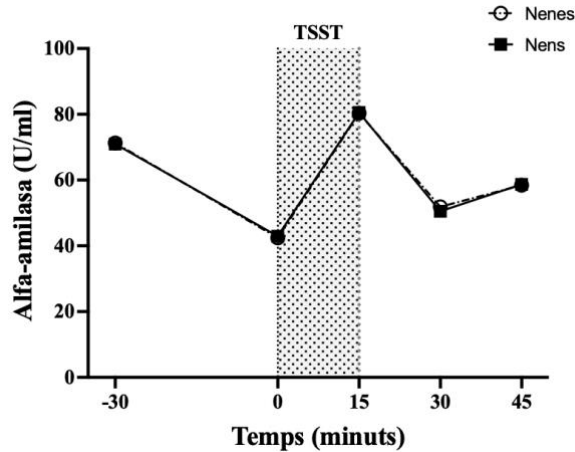


Figura 9: Nivells de alfa-amilasa salival per sexes durant el temps en el laboratori, sent el temps 0 a l'inici del TSST. Dades simulades. N= 20 (10 nens i 10 nenes).

3.3. Estrès percebut durant el TSST-M

Per caracteritzar l'evolució de l'estrès percebut al llarg del temps durant la prova d'estrès, vam realitzar una anàlisi de la variància mixta. Els resultats van indicar que l'estrès percebut variava al llarg del procés, com és d'esperar [temps: $F(2.34, 90) = 5.98, p < 0.01$], amb independència del sexe [Sexe, Sexe x Temps = NS]. Anàlisis addicionals de contrastos (polinòmic) van indicar que les dades s'ajustaven a la tendència quadràtica [$F(1.18) = 18.69, p < 0.001$]; és a dir, l'estrès subjectiu va pujar durant la tasca d'estrès i posteriorment es van recuperar els nivells basals. Una anàlisi complementària de contrastos (simple) va demostrar que en comparació amb els nivells basals l'estrès percebut va pujar durant la tasca verbal i la aritmètica [$F(1.18) = 10.13, p < 0.01$; $F(1.18) = 10.24, p < 0.01$], respectivament, tal com es veu a la **figura 8**.

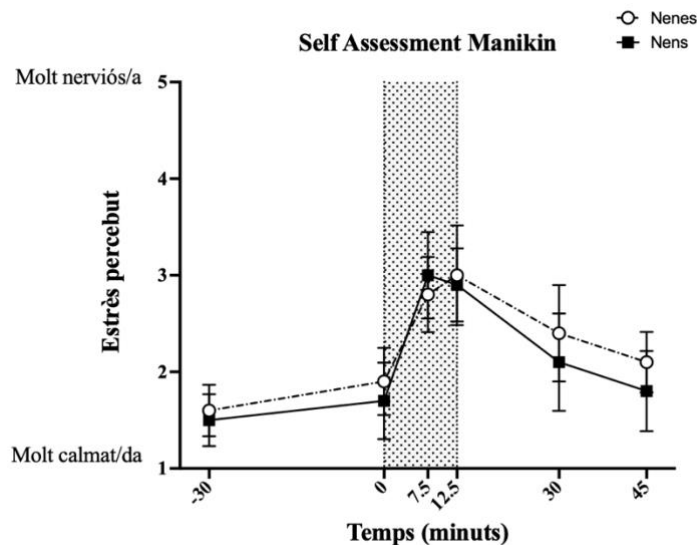


Figura 10: Mitjanes de les puntuacions obtingudes en el Self-Assessment Manikin per sexes durant el temps en el laboratori, sent el temps 0 a l'inici del TSST. N=20 (10 nens i 10 nenes).

3.4. Cortisol salival en condicions basals

Per caracteritzar l'evolució dels nivells de Cortisol al llarg del dia, vam realitzar una anàlisi de la variància mixta. Els resultats van indicar que els nivells de Cortisol variaven al llarg del dia, com és d'esperar [temps: $F(1.55, 36) = 324.235, p < 0.01$], amb independència del sexe [Sexe, Sexe x CAR = NS]. Anàlisis addicionals de contrastos (polinomial) van indicar que les dades s'ajustaven a la tendència quadràtica [$F(1.18) = 809.55, p < 0.001$]; és a dir, els nivells de Cortisol van augmentar els primers 30 minuts després de llevar-se i després van disminuir, com es veu a la figura 11.

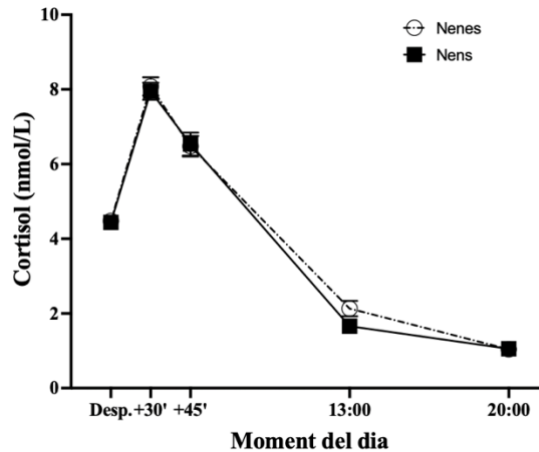


Figura 11: CAR i SLOPE obtinguts dels participants per sexes. La primera mostra va ser agafada en el moment de despertar-se (Desp.), seguida de dues mostres als 30 i 45 minuts. Dues mostres més van ser agafades a les 13:00h i a les 20:00h respectivament. Dades simulades. N=20 (10 nens i 10 nenes).

3.5. Alfa-amilasa salival en condicions basals

Per caracteritzar els nivells d'Alfa-amilasa al llarg del dia, vam realitzar una anàlisi de la variància mixta. Els resultats van indicar que els nivells d'Alfa-amilasa variaven al llarg del dia, com és d'esperar [temps: $F(1.96, 36) = 777.94, p < 0.01$], amb independència de sexe [Sexe, Sexe x Alfa-amilasa_Basal = NS]. Anàlisis addicionals de contrastos (polinomial) van indicar que les dades s'ajustaven a la tendència quadràtica [$F(1.18) = 1516.48, p < 0.001$]; és a dir, els nivells d'Alfa-amilasa van disminuir durant els primers 30 minuts després de llevar-se i posteriorment van augmentar, tal com es veu a la figura 12.

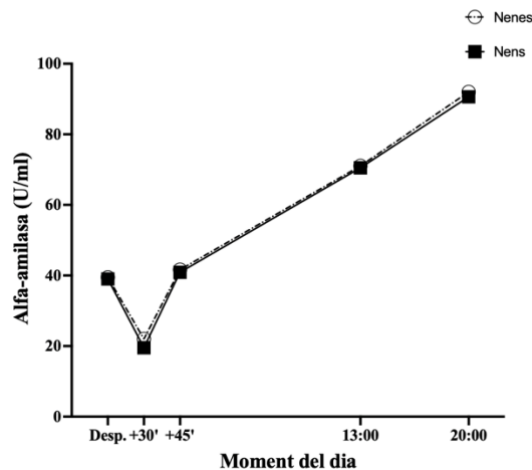


Figura 12: sAA-AR i augment al llarg del dia dels participants per sexes. La primera mostra va ser agafada en el moment de despertar-se (Desp.), seguida de dues mostres als 30 i 45 minuts. Dues mostres més van ser agafades a les 13:00h i a les 20:00h respectivament. Dades simulades. N=20 (10 nens i 10 nenes).

3.6. Correlacions entre variables

Correlacions entre variables psicològiques

S'han realitzat correlacions de Pearson entre les variables psicològiques a través dels qüestionaris contestats pel cuidador/a principal de l'infant. Pel que fa a les correlacions globals (nens i nenes junts), en primer lloc es pot observar que els trets psicopàtics es correlacionen positivament amb l'agressivitat reactiva ($r=0.649$, $p=0.002$) i proactiva ($r=0.691$, $p<0.001$) i amb l'estrès en la infància ($r=0.702$, $p<0.001$). L'agressivitat reactiva es correlaciona positivament amb la proactiva ($r=0.625$, $p=0.003$) i l'estrès en la infància es correlaciona positivament amb l'estrès percebut pels cuidadors/es ($r=0.681$, $p<0.001$). No s'han trobat diferències en les correlacions separades per sexes.

Correlacions entre variables fisiològiques i afectives

S'han realitzat correlacions de Pearson entre les variables fisiològiques i de l'estrès percebut, tant en repòs com en reactivitat al TSST-M. Primer es mostren les correlacions globals (nens i nenes junts). Correlacions positives de l'estrès percebut a diferents moments del TSST-M: s'ha vist que les mesures basals correlacionen entre sí però no amb les mesures durant l'estrès agut: SAM 1 amb SAM 2 ($r=0.565$, $p=0.009$), SAM 2 amb SAM 5 ($r=0.589$, $p=0.006$), SAM 5 amb SAM 6 ($r=0.807$, $p<0.001$). I les mesures durant l'estrès correlacionen entre sí: SAM 3 amb SAM 4 ($r=0.726$, $p<0.001$). També s'han observat correlacions entre estrès percebut al llarg del TSST-M i variables fisiològiques: el SAM 3 ha correlacionat negativament amb el CAR (AUCg) ($r=-0.574$, $p=0.008$), el SAM 4 ha correlacionat negativament amb l'alfa-amilasa en reactivitat (AUCg) ($r=-0.606$, $p=0.005$) i amb el cortisol en repòs (AUCg) ($r=-0.655$, $p=0.002$). Finalment, es mostren correlacions entre les diferents variables fisiològiques, tant en reactivitat com en repòs: l'alfa-amilasa en reactivitat (AUCg) ha correlacionat positivament amb CAR (AUCg): ($r=0.816$, $p<0.001$), (AUCi): ($r=0.595$, $p=0.006$). No s'han trobat diferències en les correlacions separades per sexes.

Correlacions entre variables fisiològiques i afectives i els trets de la personalitat/conducta (comportament agressiu i trets psicopàtics)

S'han realitzat correlacions de Pearson entre l'estrès percebut, les variables fisiològiques reactives i en repòs i les variables psicològiques relacionades amb els trets de la personalitat i comportament. El SAM 3 (estrès percebut durant el TSST-M) ha correlacionat positivament amb els trets psicopàtics ($r=0.570$, $p=0.009$), El SAM 4 (estrès percebut durant el TSST-M) també es correlaciona positivament amb els trets psicopàtics ($r=0.605$, $p=0.005$). L'alfa-amilasa en reactivitat (AUCg) ha correlacionat negativament amb els trets psicopàtics ($r=-0.869$, $p<0.001$) i amb l'agressivitat proactiva ($r=-0.696$, $p<0.001$). El CAR (AUCg) es correlaciona negativament amb els trets psicopàtics ($r=-0.852$, $p<0.001$) i amb l'agressivitat proactiva ($r=-0.616$, $p=0.004$). Finalment, el CAR (AUCi) s'ha correlacionat negativament amb els trets psicopàtics ($r=-0.627$, $p=0.003$). A més, si mirem les correlacions separades per sexes, veiem que la majoria dels resultats es mantenen, però en el grup nenes observem una diferència. L'agressivitat proactiva

es correlaciona positivament amb l'estrès percebut durant el TSST-M: SAM 3 ($r=0.794$, $p=0.006$), SAM 4 ($r=0.938$, $p<0.001$), a diferència del grup nens i del global.

Correlacions entre respostes a l'estrès agut (fisiològiques i afectives) i l'adversitat en la infància (estrès percebut pels cuidadors/es i esdeveniments estressants en la infància)

S'han realitzat correlacions de Pearson entre l'estrès percebut, les variables fisiològiques reactives i en repòs i les variables psicològiques relacionades amb els esdeveniments estressants en la infància dels i les participants. El SAM 4 es correlaciona positivament amb els esdeveniments estressants en la infància ($r=0.594$, $p=0.006$) i amb l'estrès percebut pels cuidadors/es ($r=0.676$, $p=0.001$). L'alfa-amilasa en reactivitat (AUCg) ha correlacionat negativament amb els esdeveniments estressants en la infància ($r=-0.644$, $p=0.002$). El CAR (AUCg) ha correlacionat negativament amb els esdeveniments estressants en la infància ($r=-0.697$, $p<0.001$). Finalment, el CAR (AUCi) s'ha correlacionat negativament amb els trets psicopàtics ($r=-0.627$, $p=0.003$) i amb els esdeveniments estressants en la infància ($r=-0.669$, $p=0.001$). No s'han trobat diferències en les correlacions separades per sexes.

4. Discussió

L'objectiu principal d'aquest estudi era validar l'ús d'un estrès psicosocial controlat en nens i nenes, utilitzant el cortisol i l'alfa-amilasa com a biomarcadors. Tal com s'esperava, els nivells de cortisol i alfa-amilasa salival han incrementat després del TSST-M, el que ens porta a pensar que el TSST-M és vàlid en la inducció de la resposta fisiològica de l'estrès agut en nens i nenes.

Pel que fa als objectius secundaris, el primer consistia a descriure la dinàmica de la resposta del cortisol i l'alfa-amilasa salival després de l'estrès psicosocial. Tal com es pot veure a la **figura 9**, els nivells de cortisol salival arriben al seu màxim 30 minuts després de l'inici del TSST-M. Això és coherent amb la literatura existent, que mostra un augment del cortisol després d'un estrès agut i un pic entre 30 i 45 minuts després d'aquest (Gjerstad et al., 2018). Respecte a l'alfa-amilasa (**figura 10**), realitza un pic 15 minuts després d'iniciar la prova i coincideix amb el final del TSST-M, també corroborat per la literatura existent (Armario et al., 2020). No s'han trobat correlacions significatives entre el cortisol i l'alfa-amilasa salival en reactivitat pel TSST-M.

Respecte al segon objectiu secundari, analitzar la resposta afectiva induïda per un estrès psicosocial agut en nens i nenes en base a l'estrès percebut, també s'evidencia un clar augment de l'estrès percebut durant el TSST-M i una baixada d'aquest durant el període de recuperació (**figura 8**). Aquest fet no només valida la hipòtesi realitzada, sinó que també dona suport a que el TSST-M és efectiu per induir una resposta afectiva.

El tercer objectiu secundari buscava verificar que els nivells de cortisol i alfa-amilasa en infants es corresponen amb un cicle circadiari, posant el focus en el CAR i en el sAA-AR, tal com passa en adults sans. En els nivells de cortisol salival durant el dia (**figura 11**) es veu clarament un CAR format per les tres primeres mostres de saliva (despertar, +30', +45'), i un *diurnal slope*, és a dir, una disminució del cortisol al llarg del dia, sent el pic a 30 minuts després del moment de despertar-se. Aquests resultats són sostinguts per la literatura existent i molt semblants al gràfic extret de Susman et al., (2007) (**figura 3**). Si mirem els nivells d'alfa-amilasa al llarg del dia (**figura 12**), també s'evidencia, tal com s'esperava, el sAA-AR i consegüent augment durant el dia, sent el mínim a 30 minuts després de despertar. Això també es correspon amb la bibliografia existent (Nater & Rohleder, 2009).

El quart objectiu secundari consistia a relacionar les respostes de l'estrès psicosocial agut (fisiològiques i afectives) amb els trets de personalitat en infants (comportament agressiu i trets psicopàtics). S'ha observat que tant el SAM 3 com el SAM 4, és a dir, l'estrès percebut durant el TSST-M, estan relacionats amb els trets psicopàtics. D'altra banda, els nivells d'alfa-amilasa en reactivitat pel TSST-M estan inversament relacionats amb els trets psicopàtics i amb l'agressivitat proactiva. Aquests resultats ens porten a pensar que els infants amb puntuacions elevades en trets psicopàtics podrien tenir un dèficit regulador del sistema nerviós simpàtic-adrenal en la resposta a l'estrès agut, tal com s'ha vist en homes adults (Glenn et al., 2015). A més, també s'ha observat una percepció de l'estrès més alta que en els infants amb puntuacions baixes de trets psicopàtics, fet que podria indicar una dissociació entre l'estrès percebut i el SAM (Sistema Simpàtic-medulo-adrenal). Cal destacar que no s'ha obtingut cap resultat significatiu sobre relacions entre el cortisol en reactivitat pel TSST-M i els trets de la personalitat/conducta.

Pel que fa al cinquè objectiu secundari, relacionar les respostes de l'estrès agut (fisiològiques i afectives) amb l'adversitat primerenca dels infants (esdeveniments estressants en la infància i estrès percebut pels cuidadors/es dels infants), s'ha vist que el SAM 4, és a dir, l'estrès percebut durant el TSST-M, s'ha associat positivament als esdeveniments estressants en la infància i a l'estrès percebut pels cuidadors/es, el que podria significar que l'adversitat en la infància està associada a una alta percepció de l'estrès en infants, tot i que en l'estudi de Zhang et al., (2019) no es van trobar associacions significatives entre aquests dos paràmetres. També s'ha observat que, com en el cas anterior, l'alfa-amilasa està associada negativament amb els esdeveniments estressants en la infància, fet que torna a indicar una possible dissociació entre l'estrès percebut i el SAM. Aquest resultat es correspon amb la bibliografia revisada, que indica que l'adversitat primerenca està associada a nivells atenuats d'alfa-amilasa (Hakamata et al., 2022). En aquest cas tampoc s'ha obtingut cap resultat significatiu sobre relacions entre el cortisol en reactivitat pel TSST-M i l'adversitat en la infància.

I finalment, l'últim objectiu secundari consistia a identificar possibles diferències entre sexes en tots els paràmetres anteriors. Pel que fa als nivells de cortisol i alfa-amilasa salivals, tant en reactivitat (**figures 9 i 10**) com en condicions basal (**figures 11 i 12**) no s'han trobat diferències significatives entre els dos sexes, així com tampoc s'han trobat en la percepció de l'estrès durant el TSST-M (**figura 8**), tal com s'esperava. Pel que fa a les variables psicològiques, les úniques diferències que veiem entre nens i nenes són que en el grup nenes, a diferència del grup nens, s'ha observat una correlació positiva entre l'agressivitat proactiva i l'estrès percebut durant el TSST-M. Aquesta relació podria ser deguda al baix nombre de participants, però de no ser així, obra una nova línia d'investigació.

Per tal de determinar la fiabilitat de l'estudi en qüestió, s'ha fet una breu recopilació de limitacions i punts forts que es detallen a continuació.

La mida de la mostra ha estat una limitació, ja que no hi ha suficient poder estadístic per detectar totes les diferències significatives. D'altra banda, l'ús de dades fisiològiques simulades en base a la literatura també ha estat un factor limitant, ja que aquest fet pot alterar certes diferències individuals.

En relació amb els punts forts, destaca el fet d'haver estudiat una part de la població d'ús poc freqüent en estudis científics, com són els infants d'entre 7 i 8 anys. El fet d'utilitzar diferents mesures biològiques i psicològiques fa que sigui un estudi multidimensional. D'altra banda, la possibilitat de poder tractar directament amb els subjectes en el TSST-M, aporta veracitat i és un punt fort pels investigadors/es. Finalment, comptar amb infants i amb els seus cuidadors/es a l'hora d'obtenir informació, també ha permès augmentar la fiabilitat de les respostes.

5. Conclusions

- This study has proved that the TSST-M could be a useful procedure to activate the physiological (cortisol and alpha-amylase) response to an acute psychosocial stress in 7-8 years old children.
- It could prove that cortisol and alpha-amylase reacts in response to an acute psychosocial stress.
- It has proved that children's affective response increase during the TSST-M.
- Under normal conditions, children could exhibit CAR and sAA-AR.
- There is an association between the acute stress response and psychopathic traits.
- There is also an association between the acute stress response and childhood adversity.
- Finally, it was found that there are no significant differences between sexes in the physiological and affective responses to acute psychosocial stress. Also, no differences were found between sexes in CAR and sAA-AR under normal conditions, nor any differences were found regarding psychopathy. But it was observed that girls with higher scores in proactive aggression have higher perception of acute stress than boys.

These results highlight the importance of stress in our daily lives, especially during childhood. They also suggest that childhood adversity is a key factor in stress regulation and can cause changes in SAM physiology. Finally, they show that psychopathic traits are closely related to the stress response and that low alpha-amylase levels in response to an acute psychosocial stress could possibly predict psychopathy.

6. Bibliografia

- [1] Adam, E. K., Quinn, M. E., Tavernier, R., McQuillan, M. T., Dahlke, K. A., & Gilbert, K. E. (2017). Diurnal cortisol slopes and mental and physical health outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* (Vol. 83). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.05.018>
- [2] Allen, A. P., Kennedy, P. J., Dockray, S., Cryan, J. F., Dinan, T. G., & Clarke, G. (2017). The Trier Social Stress Test: Principles and practice. *Neurobiology of Stress* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.11.001>
- [3] Armario, A., Labad, J., & Nadal, R. (2020). Focusing attention on biological markers of acute stressor intensity: Empirical evidence and limitations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 111, 95–103. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2020.01.013>
- [4] Armario, A., & Nadal, R. (2013). Individual differences and the characterization of animal models of psychopathology: A strong challenge and a good opportunity. *Frontiers in Pharmacology: Vol. 4 NOV*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00137>
- [5] Armario, A., & Nadal, R. (2013). Searching for Biological Markers of Personality: Are There Neuroendocrine Markers of Anxiety? *New Insights into Anxiety Disorders*. <https://doi.org/10.5772/53925>
- [6] Belda, X., Fuentes, S., Daviu, N., Nadal, R., & Armario, A. (2015). Stress-induced sensitization: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 18(3), 269–279. <https://doi.org/10.3109/10253890.2015.1067678>
- [7] Borráz-León, J. I., Spreitzer, A., Scrivner, C., Landers, M., Lee, R., & Maestripieri, D. (2023). Cortisol reactivity to psychosocial stress in vulnerable and grandiose narcissists: An exploratory study. *Frontiers Psychology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2022.1067456>
- [8] Bradley, M. M., & Lang, P. J. (1994). Measuring emotion: the Self-Assessment Manikin and the Semantic Differential. *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry*, 25(1), 49–59. [https://doi.org/10.1016/0005-7916\(94\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0005-7916(94)90063-9)
- [9] Chen, M. A., LeRoy, A. S., Majd, M., Chen, J. Y., Brown, R. L., Christian, L. M., & Fagundes, C. P. (2021). Immune and Epigenetic Pathways Linking Childhood Adversity and Health Across the Lifespan. *Frontiers in Psychology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.788351>
- [10] Chesnut, M., Harati, S., Paredes, P., Khan, Y., Foudeh, A., Kim, J., Bao, Z., & Williams, L. M. (2021). Stress Markers for Mental States and Biotypes of Depression and Anxiety: A Scoping Review and Preliminary Illustrative Analysis. *Chronic Stress* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1177/24705470211000338>
- [11] Colins, O. F., Andershed, H., Frogner, L., Lopez-Romero, L., Veen, V., & Andershed, A. K. (2014). A new measure to assess psychopathic personality in children: The child problematic traits inventory. *Journal of Psychopathology and Behavioral Assessment*, 36(1). <https://doi.org/10.1007/s10862-013-9385-y>

- [12] Dodge, K. A., & Coie, J. D. (1987). Social-Information-Processing Factors in Reactive and Proactive Aggression in Children's Peer Groups. *Journal of Personality and Social Psychology*, 53(6), 1146–1158. <https://doi.org/10.1037/0022-3514.53.6.1146>
- [13] Ferreira, S. O. (2019). Activación emocional en sujetos humanos: procedimientos para la inducción experimental de estrés. *Psicologia USP*, 30. <https://doi.org/10.1590/0103-6564e20180176>
- [14] Frisch, J. U., Häusser, J. A., & Mojzisch, A. (2015). The Trier Social Stress Test as a paradigm to study how people respond to threat in social interactions. *Frontiers in Psychology* (Vol. 6, Issue FEB). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.00014>
- [15] Gjerstad, J. K., Lightman, S. L., & Spiga, F. (2018). Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 21(5), 403. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1470238>
- [16] Glenn, A. L., Rimmel, R. J., Raine, A., Schug, R. A., Gao, Y., & Granger, D. A. (2015). Alpha-amylase reactivity in relation to psychopathic traits in adults. *Psychoneuroendocrinology*, 54. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.01.012>
- [17] Goldberg, X., Espelt, C., Nadal, R., Alon, Y., Palao, D., Bar-Haim, Y., & Armario, A. (2023). Blunted neurobiological reactivity and attentional bias to threat underlie stress-related disorders in women survivors of intimate partner violence. *Psychological Medicine*, 122(1). <https://doi.org/10.1017/S0033291723000910>
- [18] Hakamata, Y., Suzuki, Y., Kobashikawa, H., & Hori, H. (2022). Neurobiology of early life adversity: A systematic review of meta-analyses towards an integrative account of its neurobiological trajectories to mental disorders. *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 65). <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2022.100994>
- [19] Harris, P. A., Taylor, R., Minor, B. L., Elliott, V., Fernandez, M., O'Neal, L., McLeod, L., Delacqua, G., Delacqua, F., Kirby, J., & Duda, S. N. (2019). The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *Journal of Biomedical Informatics* (Vol. 95). <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2019.103208>
- [20] Henze, G. I., Zänkert, S., Urschler, D. F., Hiltl, T. J., Kudielka, B. M., Pruessner, J. C., & Wüst, S. (2017). Testing the ecological validity of the Trier Social Stress Test: Association with real-life exam stress. *Psychoneuroendocrinology*, 75, 52–55. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.10.002>
- [21] Hollanders, J. J., Van Der Voorn, B., Rotteveel, J., & Finken, M. J. J. (n.d.). *Is HPA axis reactivity in childhood gender-specific? A systematic review.* <https://doi.org/10.1186/s13293-017-0144-8>
- [22] King, L. S., Colich, N. L., LeMoult, J., Humphreys, K. L., Ordaz, S. J., Price, A. N., & Gotlib, I. H. (2017). The impact of the severity of early life stress on diurnal cortisol: The role of puberty. *Psychoneuroendocrinology*, 77. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.11.024>

- [23]Kirschbaum, C., Pirke, K. M., & Hellhammer, D. H. (1993). The “Trier social stress test” - A tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology*, 28(1–2). <https://doi.org/10.1159/000119004>
- [24]Kvetnansky, R., Sabban, E. L., & Palkovits, M. (2009). Catecholaminergic systems in stress: Structural and molecular genetic approaches. *Physiological Reviews* (Vol. 89, Issue 2). <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2006>
- [25]Liu, J. J. W., Ein, N., Peck, K., Huang, V., Pruessner, J. C., & Vickers, K. (2017). Sex differences in salivary cortisol reactivity to the Trier Social Stress Test (TSST): A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 82. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.04.007>
- [26]López-Romero, L., Molinuevo, B., Bonillo, A., Andershed, H., Colins, O. F., Torrubia, R., & Romero, E. (2019). Psychometric properties of the Spanish version of the child problematic traits inventory in 3-to 12-year-old Spanish children. *European Journal of Psychological Assessment*, 35(6), 842–854. <https://doi.org/10.1027/1015-5759/A000458>
- [27]López-Romero, L., Romero, E., & Luengo, M. Á. (2012). Disentangling the Role of Psychopathic Traits and Externalizing Behaviour in Predicting Conduct Problems from Childhood to Adolescence. *Journal of Youth and Adolescence*, 41(11). <https://doi.org/10.1007/s10964-012-9800-9>
- [28]Lovibond, P. F., & Lovibond, S. H. (1995). The structure of negative emotional states: Comparison of the Depression Anxiety Stress Scales (DASS) with the Beck Depression and Anxiety Inventories. *Behaviour Research and Therapy*, 33(3). [https://doi.org/10.1016/0005-7967\(94\)00075-U](https://doi.org/10.1016/0005-7967(94)00075-U)
- [29]Maruyama, Y., Kawano, A., Okamoto, S., Ando, T., Ishitobi, Y., Tanaka, Y., Inoue, A., Imanaga, J., Kanehisa, M., Higuma, H., Ninomiya, T., Tsuru, J., Hanada, H., & Akiyoshi, J. (2012). Differences in Salivary Alpha-Amylase and Cortisol Responsiveness following Exposure to Electrical Stimulation versus the Trier Social Stress Tests. *PLOS ONE*, 7(7), e39375. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0039375>
- [30]Miller, D. C. (2019). A School Neuropsychological Approach to Interpretation of the WISC-V Integrated. In *WISC-V: Clinical Use and Interpretation, Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815744-2.00003-3>
- [31]Nadal, R., & Armario, A. (2010). Mecanismos de susceptibilidad al estrés. *Hipertensión y Riesgo Vascular*, 27(3). <https://doi.org/10.1016/j.hipert.2009.05.008>
- [32]Nater, U. M., & Rohleder, N. (2009). Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research. *Psychoneuroendocrinology* (Vol. 34, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.01.014>
- [33]Nater, U. M., Rohleder, N., Gaab, J., Berger, S., Jud, A., Kirschbaum, C., & Ehlert, U. (2005). Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 55(3), 333–342. <https://doi.org/10.1016/J.IJPSYCHO.2004.09.009>

- [34] O’Leary, M. M., Loney, B. R., & Eckel, L. A. (2007). Gender differences in the association between psychopathic personality traits and cortisol response to induced stress. *Psychoneuroendocrinology*, 32(2). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.12.004>
- [35] Olivieri, N. F., Matsui, D., Hermann, C., & Koren, G. (1991). Compliance assessed by the Medication Event Monitoring System. *Archives of Disease in Childhood*, 66(12). <https://doi.org/10.1136/adc.66.12.1399>
- [36] Out, D., Granger, D. A., Sephton, S. E., & Segerstrom, S. C. (2013). Disentangling sources of individual differences in diurnal salivary α -amylase: Reliability, stability and sensitivity to context. *Psychoneuroendocrinology*, 38(3), 367–375. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2012.06.013>
- [37] *Perceived Stress Scale*. (n.d.). Retrieved June 10, 2024, from <https://psycnet.apa.org/doiLanding?doi=10.1037%2F02889-000>
- [38] Pruessner, J. C., Kirschbaum, C., Meinlschmid, G., & Hellhammer, D. H. (2003). Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology*, 28(7). [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(02\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(02)00108-7)
- [39] Rabasa, C., Gagliano, H., Pastor-Ciurana, J., Fuentes, S., Belda, X., Nadal, R., & Armario, A. (2015). Adaptation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to daily repeated stress does not follow the rules of habituation: A new perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 56). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.06.013>
- [40] Remor, E. (2006). Psychometric properties of a European Spanish version of the Perceived Stress Scale (PSS). *The Spanish Journal of Psychology*, 9(1), 86–93. <https://doi.org/10.1017/S1138741600006004>
- [41] Scheer, F. A. J. L., Chellappa, S. L., Hu, K., & Shea, S. A. (2019). Impact of mental stress, the circadian system and their interaction on human cardiovascular function. *Psychoneuroendocrinology*, 103. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.01.016>
- [42] Smith, K. E., & Pollak, S. D. (2020). Early life stress and development: potential mechanisms for adverse outcomes. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 2020 12:1, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S11689-020-09337-Y>
- [43] Stalder, T., Lupien, S. J., Kudielka, B. M., Adam, E. K., Pruessner, J. C., Wüst, S., Dockray, S., Smyth, N., Evans, P., Kirschbaum, C., Miller, R., Wetherell, M. A., Finke, J. B., Klucken, T., & Clow, A. (2022). Evaluation and update of the expert consensus guidelines for the assessment of the cortisol awakening response (CAR). *Psychoneuroendocrinology* (Vol. 146). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2022.105946>
- [44] Susman, E. J., Dockray, S., Schiefelbein, V. L., Herwehe, S., Heaton, J. A., & Dorn, L. D. (2007). Morningness/Eveningness, Morning-to-Afternoon Cortisol Ratio, and Antisocial Behavior Problems During Puberty. *Developmental Psychology*, 43(4), 811–822. <https://doi.org/10.1037/0012-1649.43.4.811>
- [45] Verona, E., & Vitale, J. (2006). Psychopathy in women: Assessment, manifestations, and etiology. *Handbook of the Psychopathy, August*.

- [46]Wadsworth, M. E., Broderick, A. V., Loughlin-Presnal, J. E., Bendezu, J. J., Joos, C. M., Ahlkvist, J. A., Perzow, S. E. D., & McDonald, A. (2019). Co-activation of SAM and HPA responses to acute stress: A review of the literature and test of differential associations with preadolescents' internalizing and externalizing. *Developmental Psychobiology*, 61(7). <https://doi.org/10.1002/dev.21866>
- [47]Welker, K. M., Lozoya, E., Campbell, J. A., Neumann, C. S., & Carré, J. M. (2014). Testosterone, cortisol, and psychopathic traits in men and women. *Physiology and Behavior*, 129. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.057>
- [48]Wesarg-Menzel, C., Marheinecke, R., Staaks, J., & Engert, V. (2024). Associations of diurnal cortisol parameters with cortisol stress reactivity and recovery: A systematic review and meta-analysis. In *Psychoneuroendocrinology* (Vol. 163). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2024.106976>
- [49]World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. (2014). *The Journal of the American College of Dentists*, 81(3). <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199241323.003.0025>
- [50]Yim, I. S., Quas, J. A., Rush, E. B., Granger, D. A., & Skoluda, N. (2015). Experimental manipulation of the Trier Social Stress Test-Modified (TSST-M) to vary arousal across development. *Psychoneuroendocrinology*, 57. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.03.021>
- [51]Zhang, H., Yao, Z., Lin, L., Sun, X., Shi, X., & Zhang, L. (2019). Early life stress predicts cortisol response to psychosocial stress in healthy young adults. *PsyCh Journal*, 8(3). <https://doi.org/10.1002/pchj.278>