

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Psicología

Departamento de Personalidad, Evaluación y Tratamiento Psicológico

Programa Oficial de Doctorado en Psicología



**MECANISMOS EXPLICATIVOS DEL EMPEORAMIENTO DE LOS/AS
PACIENTES AUTOINMUNES POR CAUSA DEL ESTRÉS
PSICOLÓGICO**

TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL – INTERNACIONAL PhD THESIS

Doctoranda: Eva Montero López

Directoras: Dra. M^a Isabel Peralta Ramírez y Dra. Ana M^a Santos Ruiz

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Eva Montero López

ISBN: 978-84-9125-954-1

URI: <http://hdl.handle.net/10481/44020>

La doctoranda Eva Montero López y las directoras de la tesis M^a Isabel Peralta Ramírez y Ana M^a Santos Ruiz garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de las directoras de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 25 de Abril de 2016.

Directoras de la tesis

Dra. M^a Isabel Peralta Ramírez

Dra. Ana M^a Santos Ruiz

Doctoranda

Eva Montero López

Dedicada a mi madre

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directoras Isabel y Ana, porque han sido mis “mamis” en este proceso. A Isabel, por siempre tener un “¡vamos!” a todo, porque es un referente a nivel personal y profesional. A Ana, porque es una hermana más que tengo. Es un ejemplo de lucha y superación a seguir. Quiero dar las gracias también a mi grupo de investigación y en especial a Miguel Pérez, por cuidar de todos/as nosotros/as.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a mi familia. A mis padres por todo el apoyo (tanto emocional, físico como económico) y en especial a mi madre, porque sin ella no habría llegado hasta aquí. A Raquel, por cuidar de mi salud física y por sus aportaciones médicas. A Víctor, por tenerme siempre a punto todos los soportes informáticos y electrónicos. A Sandra, por acompañarme los primeros días de mi estancia en Alemania. A Ricardo, por su “ojo avizor” de erratas. A Raquel G., por su apoyo, disponibilidad y capacidad de trabajo. Y por supuesto, a los pequeños soles de nuestra familia, Marta, Víctor, Carmen y Marcos.

A Nacho, porque siempre ha creído en mí, y el título de mejor amigo, se lo gana con creces cada día.

A Merchy, por las largas conversaciones, los desayunos y los ratos de distracción en momentos de “crisis”.

A Santi, por llegar en el mejor momento. Muchas gracias por tu paciencia en mis momentos de “*locura transitoria*”, tu apoyo incondicional, y por estar siempre seguro de era capaz de todo. A pesar de la distancia, hemos sobrevivido. Por supuesto, agradeceré también la ayuda con el inglés.

Muchas gracias a todas las personas que en algún momento y de una forma u otra, han estado “ahí”, con un mensaje, una llamada, o un café.

En último lugar (y no por ello menos importante), quiero dar las gracias a todas las personas que han participado en los estudios de esta tesis doctoral especialmente a las pacientes y al personal de los hospitales (Nuria, Norberto, Mario, Ana y Raquel); porque sin su colaboración y participación, esta tesis no se habría podido llevar a cabo.

ÍNDICE

Resumen	11
Introducción:	
Capítulo I: El estrés	15
1.1. Definición del estrés	16
1.2. Modelos de estrés	16
1.3. Respuestas fisiológicas asociadas al estrés	21
Capítulo II: Evaluación del estrés	26
2.1. Medidas de autoinforme del estrés	27
2.2. Medidas psicofisiológicas evaluadoras del estrés	31
2.3. Medidas endocrinas evaluadoras del estrés	33
2.4. Empleo de estresores psicológicos de laboratorio	38
Capítulo III: Enfermedades autoinmunes y estrés	43
3.1. Lupus eritematoso sistémico	44
3.2. Síndrome de Sjögren	52
3.3. Esclerosis sistémica	59
3.4. Autoinmunidad y estrés	66
Capítulo IV: Justificación y objetivos	83
4.1. Justificación	84
4.2. Objetivos	85
Capítulo V: Estudio 1	90
5.1. Introduction	91
5.2. Method	95
5.3. Results	103
5.4. Discussion	106

Capítulo VI: Estudio 2	111
6.1. Introduction	112
6.2. Method	115
6.3. Results	122
6.4. Discussion	125
Capítulo VII: Estudio 3	128
7.1. Introduction	129
7.2. Method	131
7.3. Results	136
7.4. Discussion	141
Capítulo VIII: Estudio 4	145
8.1. Introduction	146
8.2. Methods	148
8.3. Results	153
8.4. Discussion	156
Capítulo IX: Estudio 5	160
9.1. Introducción	161
9.2. Método	163
9.3. Resultados	168
9.4. Discusión	173
Capítulo X: Discusión general	177
Capítulo XI: Conclusiones y perspectivas futuras	186
11.1. Conclusiones	187
11.2. Perspectivas futuras	188

Internacional PhD	190
Summary	191
Conclusions	194
Future perspectives	195
Referencias	197
Anexos	225

RESUMEN

Esta tesis consta de once capítulos que se estructuran en los siguientes cuatro apartados: a) introducción (capítulos I, II y III), b) justificación y objetivos (capítulo IV), c) estudios empíricos (capítulos V, VI, VII, VIII y IX), y d) discusión general, conclusiones y perspectivas futuras (capítulos X y XI).

El primer apartado contiene la introducción teórica de la tesis, que se divide en tres capítulos. En el capítulo I, se define el estrés psicológico, sus principales modelos teóricos así como la respuesta fisiológica del ser humano al estrés. El capítulo II, expone cómo se evalúa la respuesta al estrés a través de medidas de autoinforme, medidas psicofisiológicas, y medidas endocrinas. Al final de este capítulo, se describen los principales estresores empleados en el laboratorio para la investigación de la respuesta al estrés y sus efectos. Por último, en el capítulo III, se resumen las principales características del lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren (SS) y esclerosis sistémica (SSc) incluyendo signos, síntomas, tratamiento así como los efectos del estrés psicológico en estas tres enfermedades. Para acabar con la parte introductoria, se exponen las principales teorías que tratan de explicar la relación entre estrés y autoinmunidad, así como los mecanismos subyacentes implicados en el empeoramiento de la sintomatología de las enfermedades autoinmunes a causa del estrés psicológico.

El segundo apartado, incluye el capítulo IV con la justificación, las diferentes hipótesis y la descripción del objetivo general y los objetivos específicos vinculados a cada uno de los estudios que componen esta tesis.

El tercer apartado está compuesto por cinco capítulos (V, VI, VII, VIII y IX) e incluye cada uno de los estudios empíricos de los que consta esta tesis doctoral. El capítulo V, incluye un estudio sobre metodología para determinar cuál de los dos protocolos de la *Trier Social Stress Test (TSST)* adaptada a la realidad virtual (gafas o pantalla), producía mayor activación del sistema nervioso simpático y del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) en personas sanas. El objetivo de validar entre los dos protocolos, fue el de orientarnos en el protocolo que

mayor respuesta al estrés produjera para utilizarlo en los estudios posteriores. Los resultados mostraron que el protocolo de la TSST adaptado a la realidad virtual (TSST-RV) mediante pantalla, producía mayor activación del sistema nervioso simpático y del eje HHA.

Los capítulos VI y VII, incluyen estudios sobre dos variables influyentes: la primera variable estudiada, fue la fase del ciclo menstrual; y la segunda variable, el tratamiento farmacológico corticoideo, que aunque no está relacionada con el estrés psicológico, si podría afectar al rendimiento de las pacientes autoinmunes. De este modo, el capítulo VI, incluye un estudio sobre la posible influencia de las fases del ciclo menstrual en la secreción de los niveles de cortisol y por tanto del eje HHA. Se estudió en mujeres sanas en distintas fases del ciclo menstrual, tanto sus patrones de cortisol en saliva diurno como sus patrones de cortisol en saliva después de la TSST-RV. Los resultados mostraron que el patrón de respuesta provocada por una situación de estrés de laboratorio, eran mayores en las mujeres que se encontraban en la fase lútea frente a las mujeres que se encontraban en la fase folicular, sin haber diferencias en los niveles de cortisol diurno. En el capítulo VII, se estudió si los efectos del tratamiento corticoideo en la flexibilidad cognitiva (medida con el *Trail Making Test*) y toma de decisiones de pacientes (medida con el *Iowa Gambling Test*) con LES se ven afectadas. Los resultados mostraron que pacientes con lupus bajo tratamiento corticoideo, tenían menor flexibilidad cognitiva y peor toma de decisiones en comparación con pacientes con lupus sin tratamiento corticoideo y personas sanas.

El capítulo VIII, incluye el estudio sobre diferencias en la activación del eje HHA en mujeres con enfermedades autoinmunes (LES, SS y SSc) y mujeres sanas analizando sus niveles de cortisol en saliva diurnos y sus niveles de cortisol de los últimos tres meses, a través de la concentración del cortisol en el pelo. Los resultados mostraron que los niveles de cortisol en saliva diurnos y los niveles de cortisol en pelo de los últimos tres meses, eran significativamente más elevados en las mujeres autoinmunes que en las mujeres sanas.

El capítulo IX, incluye el último estudio que cierra la sección de estudios empíricos. Este último estudio engloba a todos los anteriores, siendo el principal de esta tesis. En estudios anteriores, hemos determinado la metodología a usar, las variables influyentes, y los niveles de activación del eje HHA de pacientes autoinmunes en su vida diaria. Por tanto, en este estudio, se analizó la respuesta al estrés tanto a nivel del sistema nervioso simpático (a través de la conductancia dérmica) como a nivel del eje HHA (mediante el cortisol en saliva) en una situación de laboratorio (TSST-RV mediante pantalla), analizándose también los niveles de cortisol en saliva diurnos; para compararlos en mujeres sanas y mujeres autoinmunes (LES, SS y SSc) sin tratamiento corticoideo. Estas medidas se utilizaron para determinar la presencia de mecanismos alterados en la respuesta al estrés psicológico que explicarían el empeoramiento de la sintomatología en personas con enfermedades autoinmunes. Los resultados mostraron, que la activación del sistema nervioso simpático era similar en las mujeres sanas y en las mujeres autoinmunes, pero sí existían diferencias en la respuesta del eje HHA tanto en los patrones de respuesta a la TSST-RV como en los patrones de cortisol diurnos reflejados a través de los niveles de cortisol en saliva.

El último apartado incluye el capítulo X con la discusión general sobre los principales hallazgos encontrados en los cinco estudios de esta tesis, resaltando las principales implicaciones clínicas y una mayor comprensión de los mecanismos subyacentes al estrés en las enfermedades autoinmunes. Por último, el capítulo XI, recoge las principales conclusiones y perspectivas futuras de investigación.

CAPÍTULO I: “EL ESTRÉS”

1.1. DEFINICIÓN DE ESTRÉS

Son muchas y muy variadas las definiciones que existen de estrés dependiendo de su consideración como estímulo, como respuesta, o como interacción estímulo-respuesta.

En 1936, desde una perspectiva centrada en la respuesta, Selye define por primera vez el estrés como “el estado que se manifiesta por un síndrome específico, consistente en todos los cambios inespecíficos inducidos dentro un sistema biológico; así, el estrés tiene su forma y composición características, pero ninguna causa en particular”. (Selye, 1976, p. 65).

La Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), define el estrés como “el conjunto de reacciones fisiológicas que prepara al organismo para la acción”.

Dohrenwend y cols. (1978; 1984), abordan el estrés desde una perspectiva centrada en el estímulo definiendo el estrés como un proceso que se inicia con la percepción de acontecimientos vitales estresantes y termina con la aparición de un cambio psicológico (por la interacción del estrés con mediadores situacionales y personales). Estos autores definen el estrés como el estímulo que provoca una alteración en los procesos homeostáticos del organismo, superando los límites de tolerabilidad del individuo.

Actualmente, una de las definiciones de estrés más utilizada en el campo de la psicología es la de Lazarus y Folkman (1986), que explican el estrés a partir de la interacción estímulo-respuesta, como el resultado de la relación entre el individuo y el entorno, evaluado por aquel como amenazante desbordando sus recursos y poniendo en peligro su bienestar personal.

1.2. MODELOS DE ESTRÉS

Según se defina el estrés como respuesta, como estímulo, o bien como la interacción estímulo-respuesta, encontraremos modelos o teorías que tratan de explicar cómo se produce este.

Selye (1960) propone un *modelo de estrés basado en la respuesta*, denominado “síndrome general de adaptación” (SGA), en el que plantea que el cuerpo responde de forma muy similar ante la mayoría de los agentes estresantes que alteran la homeostasis (equilibrio) del organismo.

Las tres fases del SGA son:

1. *Fase de alarma*: Se inicia ante la exposición a estímulos a los que el organismo no está adaptado (estresores), por lo que para mantener la homeostasis, el organismo reacciona como medida preventiva mediante una combinación de síntomas fisiológicos, aumentando la activación del organismo y movilizándolo las defensas; aumentando la atención y la memoria para una mejor adaptación.
2. *Fase de resistencia o adaptación*: El organismo hace frente al estresor de dos maneras, adaptándose o resistiéndose. De esta manera, trata de restablecer la homeostasis ante el agente estresor para recuperar el equilibrio deseado. En esta fase, la amenaza desaparecería, pero de no ser así lo más adaptativo para el organismo sería asegurar una distribución paulatina de sus recursos, mediante la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA).
3. *Fase de agotamiento*: El organismo pierde la capacidad de adaptación por la persistencia prolongada de la exposición al estresor, y por tanto, su resistencia, dando lugar al agotamiento. Si el estresor es severo y prologando, aparecerán las denominadas “enfermedades de adaptación”, tales como trastornos cardiovasculares o úlceras gastrointestinales, entre otras.

Por otro lado, Dohrenwend y Dohrenwend (1981) presentaron un *modelo de estrés basado en el estímulo*, que consta de un proceso con tres pasos consecutivos:

- *Primer paso*: Hace referencia al origen del evento estresante (si es causado por factores ambientales o por factores del propio sujeto).

- *Segundo paso:* Hace referencia a la importancia de diferenciar entre el estresor que inicia la respuesta de estrés y la reacción propia a este. En este paso, tienen especial importancia los factores situacionales (como el apoyo social) y psicológicos (estrategias de afrontamiento).
- *Tercer paso:* El estrés interactúa con mediadores situacionales y personales, dando lugar a tres posibles resultados; crecimiento psicológico, sin cambios significativos, o aparición de reacciones patológicas o disfuncionales.

Por último, Lazarus y Folkman (1986), proponen un *modelo de estrés basado en el proceso* de interacción estímulo-respuesta. Desde nuestro punto de vista, este modelo es más completo que los anteriores, puesto que aborda tanto las variables fisiológicas como cognitivas implicadas en el proceso de estrés, a diferencia de los otros dos anteriores. El modelo de Selye sólo aborda las variables fisiológicas, mientras que el modelo de Dohrenwend y Dohrenwend (1981), se centra más en variables ambientales. Sin embargo, Lazarus y Folkman hacen referencia a la importancia de los factores psicológicos a la hora de mediar entre los estímulos y las respuestas al estrés, siendo un elemento fundamental la evaluación cognitiva que hace el sujeto de la situación. Esta evaluación tiene tres momentos:

1. *Evaluación primaria:* Esta puede ser irrelevante, benigna-positiva o estresante. Cuando es estresante, puede implicar daño/pérdida, amenaza o desafío.
2. *Evaluación secundaria:* El sujeto evalúa de qué recursos dispone para hacer frente a la situación estresante.
3. *Reevaluación:* Es la que lleva a cabo el sujeto tras la evaluación primaria de la situación y de las herramientas que dispone para hacerle frente, lo que produce un cambio.

A pesar de ser uno de los modelos que mejor se aproxima al concepto de estrés, y de resaltar la importancia que tiene el componente cognitivo, no está exento de críticas. La

principal es que no especifica los mecanismos por los que la respuesta de estrés puede afectar a la salud del sujeto que lo experimenta.

Dentro de los modelos basados en *el estrés como proceso*, hay que mencionar también el de Labrador (1996) que, al igual que Lazarus y Folkman, aborda el estrés como interacción. Labrador incluye en su modelo dos tipos de factores estresantes, los externos y los internos.

- *Factores estresantes externos*: Pueden ser *psicosociales* (situaciones que se convierten en estresantes por la interpretación cognitiva que el sujeto hace de ellas) y *biogénicos* (tienen la capacidad de provocar cambios eléctricos bioquímicos, disparando la respuesta de estrés).
- *Factores estresantes internos*: Pueden ser *físicos* (por ejemplo, la sensación de dolor) y *cognitivos/psicológicos* (por ejemplo, la sensación de enfermedad, baja autoestima, etc.).

A partir de estos factores estresantes, Labrador propone tres fuentes diferentes de estrés:

1. *Sucesos vitales intensos y extraordinarios*: Producen cambios importantes en la vida de las personas, exigiendo al organismo un trabajo de adaptación intenso.
2. *Sucesos diarios estresantes de menor intensidad (estrés cotidiano)*: Producen efectos negativos importantes, tanto biológicos como psicológicos. Estos sucesos provocan frecuentes respuestas de estrés y suelen desencadenar trastornos psicofisiológicos.
3. *Situaciones de tensión crónica mantenida*: Se trata de situaciones prolongadas en el tiempo que generan estrés. Son de elevada intensidad y alta frecuencia. Sus efectos tanto físicos como psicológicos suelen ser devastadores.

Finalmente, dentro de los modelos de estrés basados en el proceso, se encuentra el *modelo procesual del estrés* de Sandín (2009), basado en el estrés como un proceso que incluye siete etapas:

1. *Demandas psicosociales*: Se refieren a los agentes estresantes psicosociales y ambientales, tanto naturales (por ejemplo, frío, calor o radiación) como artificiales (ruido, contaminación, etc.). El estrés psicosocial incluye sucesos vitales (por ejemplo, pérdida de trabajo), sucesos menores (estrés diario) y estrés crónico (por ejemplo, estrés laboral). El estatus socioeconómico es un factor estrechamente relacionado con las demandas psicosociales (generalmente, un bajo estatus se asocia a más estresores psicosociales, peor apoyo social y características personales negativas).
2. *Evaluación cognitiva*: Es la que realiza el sujeto de la situación o demanda psicosocial (no siempre conscientemente), implicando de alguna forma una amenaza para él. El tipo de amenaza puede ser *pérdida, peligro/daño o desafío*. El tipo de amenaza generada dependerá de las características de la demanda psicosocial (*valencia, independencia, predictibilidad y controlabilidad*) y de las características del individuo (*variables personales*).
3. *Respuestas de estrés*: Tanto *fisiológicas* como *psicológicas*. Las *respuestas fisiológicas* implican fundamentalmente al sistema endocrino, con la liberación de catecolaminas y cortisol; y al sistema nervioso autónomo, con la activación del simpático y la inhibición del parasimpático. Las *respuestas psicológicas* de estrés son mayoritariamente emocionales, y suelen tratarse de respuestas de ansiedad y/o depresión.
4. *Afrontamiento*: Es el conjunto de esfuerzos conductuales y cognitivos que lleva a cabo el sujeto para hacer frente a las demandas estresantes y suprimir el estado emocional de estrés. Por tanto, es la última etapa del proceso de estrés propiamente dicho. Estas cuatro fases interaccionan constantemente en un proceso dinámico.
5. *Características personales*: Conjunto de variables (personalidad, factores hereditarios, sexo, raza, etc.) que pueden influir sobre las cuatro etapas anteriores.

6. *Características sociales*: Las características sociales relevantes para el estrés son el *apoyo social*, el *nivel socioeconómico* y las *redes sociales*.
7. *Estatus de salud*: Es el resultado del proceso de estrés. El estado de salud (fisiológico y psicológico) del sujeto va a depender del funcionamiento de las fases anteriores.

1.3. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS ASOCIADAS AL ESTRÉS

Seyle fue el primero en incluir las respuestas fisiológicas asociadas al estrés psicológico, estando presentes en todos los modelos de estrés presentados anteriormente. Fue el primer autor en resaltar el papel fundamental que tienen, tanto los sistemas neuroendocrinos hipotálamo-hipófiso-corticosuprarrenal y médulosuprarrenal, como la activación del sistema nervioso simpático, en la generación de respuestas fisiológicas frente al estrés (Belloch, Sandín, y Ramos, 2009).

Belloch y cols. (2009) resaltan que las respuestas fisiológicas asociadas al estrés, no solo implican la activación/inhibición de variables neuroendocrinas y del sistema nervioso, sino también de múltiples componentes del organismo. Estos mismos autores afirman que, actualmente no hay duda sobre la posibilidad de que no haya una sola hormona que no se vea modificada por el estrés de forma directa o indirecta; dando lugar a cambios no solo en variables psicofisiológicas y metabólicas sino en diferentes órganos debido a la alteración producida en el sistema neuroendocrino. Un ejemplo de esto es que el incremento de cortisol aumenta la producción de glucosa, la liberación de ácidos grasos y reduce la eficacia del sistema inmunológico.

En el proceso de respuesta al estrés están implicados tanto el eje adrenomedular como el eje HHA y se produciría de la siguiente manera.

En el momento en que percibimos una situación como estresante, a través de las fibras nerviosas que pasan por la médula espinal, el hipotálamo activa la región central (medular) de

las glándulas suprarrenales, incrementando los niveles de adrenalina en sangre hasta 1.000 veces por encima de su nivel normal. Esta tiene un efecto inmediato en comparación con otras hormonas, que tardan minutos, horas e incluso días en ejercer su acción (Teixido Gómez, 2003). Por otro lado, la noradrenalina y la dopamina, activan regiones cerebrales regulando las emociones (sistema límbico), grado de vigilancia y las operaciones complejas. Además, las catecolaminas periféricas producen:

- Incremento de la presión arterial.
- Incremento del aporte sanguíneo al cerebro.
- Incremento de la tasa cardíaca.
- Incremento de la estimulación de los músculos esqueléticos (preparan para la acción).
- Incremento de la liberación de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol en plasma (para mantener el estado de sobreactivación).
- Incremento de opiáceos endógenos (endorfinas y encefalinas).
- Disminución del riego sanguíneo en la piel.
- Disminución de la secreción de hormonas sexuales.

Para responder a todas estas necesidades energéticas inmediatas, la adrenalina activa la liberación de la glucosa que se encuentra en el hígado (Bensabat y Seyle, 1987).

Toda esta secreción de sustancias y activación fisiológica del organismo tiene una finalidad fundamental, que es la supervivencia, ya que lo prepara para una intensa actividad corporal con la que responder a cualquier posible amenaza externa, bien haciéndole frente, luchando, o bien escapando de ella. Sin embargo, si la situación estresante se prolonga en el tiempo, no basta con la secreción de adrenalina y noradrenalina para mantener la respuesta al estrés, por lo que es necesario una hormona de absorción más lenta. Para esto, se dispara el eje HHA, activando fundamentalmente la secreción de glucocorticoides. Los glucocorticoides tienen una función similar a la adrenalina, pero sus efectos son más duraderos prologándose

minutos u horas. La secreción de glucocorticoides estimulada por el hipotálamo, incrementa la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CHR). La CHR activa la secreción hipofisaria de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la cual, a través de la corteza suprarrenal, estimula la síntesis y secreción del cortisol (denominada la hormona del estrés). Tanto el cortisol como su derivado (cortisona), son elementos fundamentales en el disparo del eje HHA y aparte de su principal función antiinflamatoria, tienen varias funciones metabólicas. Entre ellas, favorecer la utilización de grasas almacenadas, disminuir la cantidad de proteínas en la mayoría de los tejidos (de manera que los aminoácidos puedan ir a la sangre y reparar las células dañadas), y transformar aminoácidos en glúcidos para su utilización posterior como fuente de energía incrementando el azúcar en sangre, favoreciendo su síntesis en el hígado y contribuyendo a la reconstrucción de reservas hepáticas de azúcar que han sido utilizadas en la reacción de estrés por el efecto de la adrenalina (Bensabat y Seyle, 1987). Además, destruye los tejidos linfoides indispensables en la lucha contra los agentes patógenos, debilitando así las defensas inmunitarias del organismo.

La secreción de glucocorticoides detiene la formación de nuevos linfocitos en el timo. Debido a que los glucocorticoides modulan la secreción de mensajeros como las interleucinas (IL-1, IL-2 e IL6), los interferones α y β , en concreto, el interferón α y el factor de necrosis tumoral (TNF), hacen que disminuya la sensibilidad de los linfocitos a la alarma de infección y los expulsan del torrente sanguíneo. Los efectos más evidentes de los glucocorticoides con respecto a la reacción inflamatoria e inmune son los siguientes: disminución de la agregación de células inflamatorias en el sitio de inflamación elevando la cifra de neutrófilos y reducción de los valores de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. El efecto linfopénico de los glucocorticoides es más evidente en las células CD4 o células T ayudadoras que en las células B, mientras que las células T citotóxicas o CD8 resultan

relativamente inservibles. No obstante, también disminuyen las funciones de las células B, especialmente, las relacionadas con la producción de anticuerpos.

Por último, aunque los glucocorticoides son las hormonas más relacionadas con el estrés, no son las únicas que se activan en la respuesta al estrés. Se segrega prolactina, desempeñando la función de inhibir la actividad reproductora durante el estrés. Se segregan endorfinas y encefalinas, que son sustancias endógenas similares a la morfina, y sirven entre otras cosas, para anular el dolor. Por último, se segrega también vasopresina (hormona antidiurética) que interviene en la respuesta cardiovascular de estrés. Al igual que estas hormonas son liberadas, otros sistemas hormonales son inhibidos. Esto ocurre con las hormonas reproductoras (estrógenos, progesterona y testosterona), con las hormonas asociadas al crecimiento (hormona del crecimiento) y por último, también se inhibe la secreción de insulina (hormona pancreática), que suele almacenar energía para su uso posterior (Sapolsky, 2004, p. 56). En la Figura 1, podemos ver un esquema de cómo se produce esta respuesta al estrés.

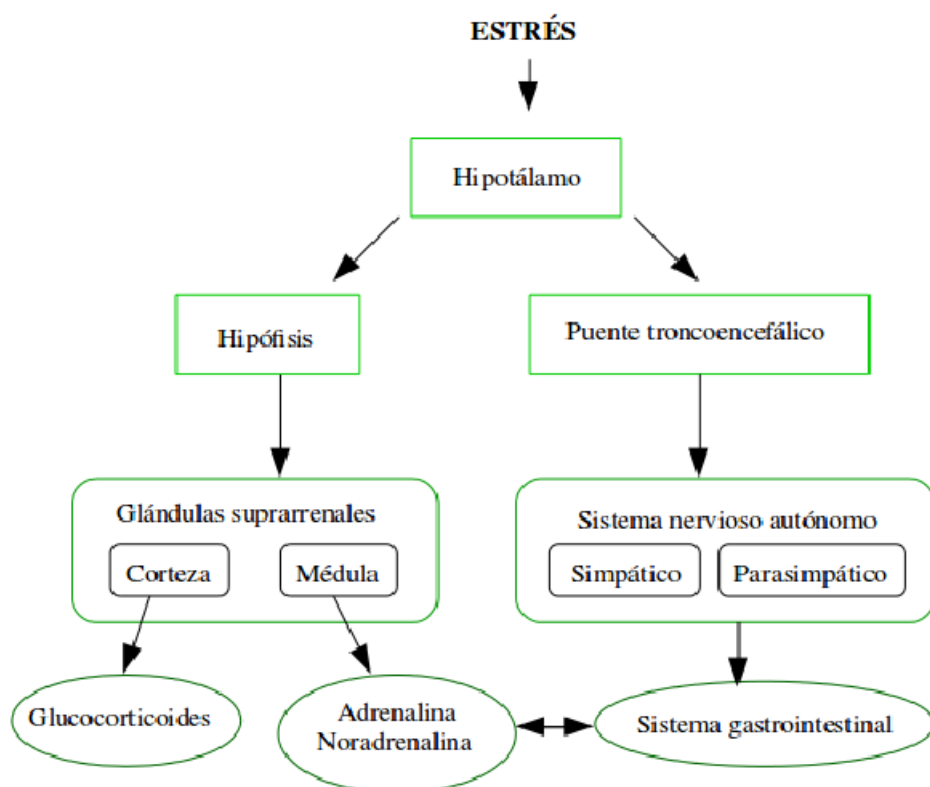


Figura 1. Mecanismos implicados en la respuesta al estrés.

De los modelos descritos anteriormente, el modelo procesual del estrés de Sandín (2009) es el que mejor se ajusta a este trabajo, por ser un modelo que incluye tanto factores físicos, como psicológicos y ambientales, los cuales forman parte del proceso de estrés y su respuesta. Por este motivo, para una mejor comprensión de este proceso de estrés, resulta necesaria la evaluación de los distintos componentes físicos, psicológicos y ambientales implicados en el estrés y su respuesta.

CAPÍTULO II: “EVALUACIÓN DEL ESTRÉS”

Una vez definido el estrés, sus modelos y la respuesta de este, se van a describir a continuación las medidas de evaluación del estrés a tres niveles: autoinforme, psicofisiológicas de biofeedback (evaluación del eje adrenomedular) y endocrinas (evaluación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal).

2.1. MEDIDAS DE AUTOINFORME DEL ESTRÉS

En primer lugar, la entrevista es uno de los instrumentos que nos permitirá saber qué nivel de estrés tiene una persona. Posteriormente, podemos complementar y ampliar la información aportada por la persona en la entrevista, a través de cuestionarios y escalas más específicas de acuerdo a nuestros objetivos (Robles-Ortega y Peralta-Ramírez, 2006).

Crespo y Labrador (2003) diferencian los cuestionarios de estrés psicológico según la medida a evaluar:

Condiciones ambientales generadoras de estrés

Podemos hablar de tres tipos de sucesos o acontecimientos ambientales que pueden generar estrés:

1. *Sucesos vitales estresantes*: Dos de los cuestionarios más conocidos son de Holmes y Rahe (1967); estos son el Cuestionario de experiencias recientes (*Schedule of Recent Experience -SRE-*) y la Escala de evaluación del reajuste social (*Social Readjustment Rating Scale -SRRS-*). Otra escala ampliamente utilizada es la Escala de Apreciación al Estrés (*EAE*), (Fernández Seara y Mielgo Robles, 2001).
2. *Acontecimientos estresantes diarios*: Como por ejemplo, la Escala de acontecimientos molestos cotidianos (*Daily Hassles Scale*) de Kanner, Coyne, Schaefer, y Lazarus (1981).
3. *Situaciones de tensión crónica mantenida*: Aquí podemos incluir la Escala de carga del cuidador de Zarit, Reever, y Bach-Peterson (1980).

Valoración cognitiva de los acontecimientos estresantes

Uno de los cuestionarios más utilizados es la Escala de estrés percibido (*Perceived Stress Scale -PSS-*) de Cohen, Kamarch y Mermelstein (1983), adaptación española por Remor y Carrobles (2001). La PSS es una escala de autoinforme utilizada para evaluar el nivel de estrés percibido y el grado en que las personas encuentran su vida impredecible, incontrolable, o con sobrecarga. Se compone de 14 elementos con cinco alternativas de respuesta. La puntuación más alta corresponde al nivel de estrés percibido más alto. La versión española de la PSS (14 ítems) tiene una adecuada fiabilidad (consistencia interna = 0,81 y test-retest = 0,73), validez concurrente, y sensibilidad (Remor, 2006). Por ello, este instrumento es utilizado en todos los estudios de esta tesis doctoral. Hemos considerado cuatro niveles de estrés percibido según las puntuaciones:

- Leve: 0-10.
- Moderado: 11-21.
- Agudo: 22-40.
- Severo: 41-56.

Activación fisiológica

Este tipo de cuestionarios son útiles para conocer, por ejemplo, el nivel de activación del sujeto tras la aplicación de una técnica concreta o para relacionar sucesos externos y cambios fisiológicos, cuando no es posible hacerlo con otros tipos de medidas. Por ejemplo, los cuestionarios que incluyen indicadores fisiológicos en situaciones de estrés como el Inventario de indicadores de tensión y ansiedad de Cautela y Groden (1985). Este inventario recoge ocho formas en las que las personas podemos sentirnos tensos o ansiosos; sudar, sentir latidos del corazón, temblores, piel fría, entre otros.

Conductas de afrontamiento

Estos cuestionarios presentan un listado de estrategias de afrontamiento recogidas en varios ítems del cuestionario. Los hay que miden estilos de afrontamiento o bien estrategias de afrontamiento ante la situación. El cuestionario más utilizado para evaluar el afrontamiento es el Inventario de modos de afrontamiento (*Ways of Coping Inventory-WOC-*) de Folkman y Lazarus (1988).

Consecuencias del estrés

Este tipo de instrumentos miden la sintomatología tanto física como psicológica que presenta el sujeto, es decir, su nivel de funcionamiento general. Esta información es útil para conocer los efectos del estrés.

Los cuestionarios que hemos utilizado en esta tesis son los siguientes:

1. Para medir estrés percibido: Escala de estrés percibido (*EEP*) de Cohen y cols. (1983), adaptación española por Remor y Carrobles (2001). Este instrumento fue escrito en el apartado anterior.
2. Para medir vulnerabilidad al estrés: Inventario de vulnerabilidad al estrés (*VE*) de Beech y cols. (1986), adaptación española por Robles-Ortega y cols. (2006). Evalúa la predisposición que tiene la persona a ser afectada por el estrés percibido. Se compone de 22 ítems que describen problemas que las personas tienen a veces, con dos alternativas de respuesta: “Sí” (cuando la persona considere que el problema en cuestión le afecta habitualmente) y “No” (cuando la persona considere que el problema no le afecta en absoluto o lo hace raramente). La adaptación española muestra una alfa de Cronbach de 0,87. En cuanto a la validez convergente, los resultados muestran una correlación positiva significativa ($p < 0,01$) con las siguientes escalas de evaluación: STAI-R, Inventario de depresión de Beck (*Beck Depression Inventory-BDI-*), Escala de síntomas somáticos (*Somatic Symptom*

Scale-SSS-), y la Encuesta de experiencias de vida reciente (*Survey of Recent Life Experiences-SRLE-*).

3. Para medir sintomatología psicopatológica: Listado de Síntomas 90-R (*SCL-90-R*) de Derogatis y Unger (2001); adaptación española por González de Rivera y De las Cuevas (1988). Fue desarrollado para evaluar los síntomas de psicopatología e incluye 90 ítems donde los sujetos responden de acuerdo a cómo se han sentido en las últimas semanas, incluyendo el día que se administra el inventario. A través de las puntuaciones es posible caracterizar la sintomatología del evaluado en un perfil compuesto por nueve dimensiones primarias de síntomas (*Somatización, Obsesiones, Sensitividad Interpersonal, Depresión, Ansiedad, Hostilidad, Ansiedad Fóbica, Ideación Paranoide y Psicoticismo*) y tres índices globales de psicopatología: el índice de Gravedad Global (*Global Severity index, GSI*), el índice de Malestar de Síntomas Positivos (*Positive Symptom Distress, PSDI*) y el Total de Síntomas Positivos (*Positive Symptom Total, PST*).
4. Para medir calidad de vida relacionada con la salud: Encuesta breve sobre salud de 36 ítems (*SF-36*) de Ware y Sherbourne (1992) adaptada al español por Alonso y cols. (1995). Los 36 ítems miden ocho dimensiones: *Función física* (limitaciones en las actividades físicas a causa de problemas de salud), *Función social* (limitaciones en las actividades sociales debido a problemas físicos o emocionales), *Rol físico* (limitaciones en las actividades habituales de roles debido a problemas de salud física), *Dolor corporal*, *Salud mental general* (malestar psicológico y el bienestar), *Rol Social* (limitaciones en las actividades habituales de roles debido a problemas emocionales), *Vitalidad* (energía y fatiga), *Percepción de la salud general*. También se encuentra disponible la versión breve de 12 ítems (*SF-12*) de Ware (1994, revisada 1998).

2.2. MEDIDAS PSICOFISIOLÓGICAS EVALUADORAS DEL ESTRÉS

Las medidas psicofisiológicas nos aportan información sobre el componente fisiológico de la respuesta de estrés. Según de Rivera (2010) “el estrés produce activación psicofisiológica autonómica simpática, de forma que el incremento de activación detecta la respuesta ante los factores externos” (p. 238). Para este autor, la principal ventaja de este tipo de medidas es que, a diferencia de las medidas psicológicas, no están influidas por los sesgos de respuesta o la subjetividad de la persona que cumplimenta los cuestionarios. Por tanto, son medidas objetivas, que evalúan una respuesta del organismo sin ser producto de las creencias o de la introspección. Pueden registrarse en una situación de reposo (mostrando la activación basal del sujeto) o de forma reactiva a una situación o estímulo. La activación basal es el estado psicofisiológico propio del sujeto en varios momentos de tiempo en una situación neutra, que servirá de medida de referencia para la comprobación de la variación de la respuesta fisiológica ante determinados estímulos. Propone las siguientes medidas de activación psicofisiológica para la evaluación del estrés:

1. *Conductancia electrodermal*: Medida de la conductancia de una corriente eléctrica por la piel de los dedos de la mano. El estrés incrementa la producción de sudor, rico en electrolitos, aumentando la conductancia de la piel.
2. *Tasa cardíaca*: El incremento de la actividad simpática ante el estrés aumenta la tasa cardíaca.
3. *Respuesta electromiográfica*: La activación psicofisiológica debida al estrés produce hipertonia muscular, detectada habitualmente en los trapecios, frontales o maseteros mediante electromiografía.
4. *Presión arterial*: La activación psicofisiológica debida al estrés aumenta la presión arterial, debido a la activación simpática del músculo liso alrededor de la superficie del vaso sanguíneo.

5. *Temperatura dermal*: Debido a una excesiva activación psicofisiológica, la vasoconstricción periférica dificulta que la sangre llegue a los dedos de las manos con el mismo flujo que en reposo. Por este motivo, disminuye la temperatura en la piel de las partes más distales de las extremidades.

En esta tesis, hemos registrado mediante el polígrafo, la actividad electrodérmica (conductancia), registro perteneciente al sistema nervioso autónomo (Vila-Castelar, 2000). Según estos autores “la actividad electrodérmica designa de manera global y genérica, todas las manifestaciones eléctricas de la piel” (p. 62).

La electrodermografía estudia la actividad eléctrica de la piel y la técnica utilizada para registrarla (endógena o exógena). En este caso, hemos utilizado el registro exógeno de conductancia dérmica (corriente continua y voltaje constante) que recoge el valor de conductancia/admitancia de la piel ante el paso de una corriente pequeña externa que pasa a través de dos electrodos colocados en la palma de la mano. La selección de esta medida se debe a, tal como expone Vila Castelar (2000), que existen razones fisiológicas que aconsejan registrar directamente la conductancia. Por otro lado, es una técnica que permite que se haga el registro psicofisiológico (al colocar los electrodos en la palma de la mano no dominante del sujeto) desde el momento que llega al laboratorio, pudiendo realizar con facilidad las tareas que se incluyen en todo el procedimiento. Es una técnica que además de dar un feedback inmediato al experimentador/a, es sencilla, accesible y fácil de colocar, sin ser aparatosa o incómoda para el sujeto, aportando información sobre una de las medidas del sistema nervioso autónomo y por tanto, de uno de los componentes del sistema nervioso simpático implicado en la respuesta al estrés junto con el eje HHA.

2.3. MEDIDAS ENDOCRINAS EVALUADORAS DE ESTRÉS

La evaluación de las medidas endocrinas se debe, por un lado, a la implicación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal en el estrés y, por otro, a que son medidas objetivas y biológicas. La principal hormona segregada mediante la activación de este eje es el cortisol.

2.3.1. Cortisol en saliva

El cortisol, denominado también *la hormona del estrés*, puede medirse a través de sangre, orina, saliva o pelo. La saliva es el método más utilizado tradicionalmente en investigación, al contar con múltiples ventajas:

- No invasivo (y por tanto, menos estresante).
- Rentable.
- Puede ser recogida por personal no médico y en muchos entornos diferentes.
- Sensible a los cambios, lo que nos permite manipular variables y estudiar su respuesta.
- Su transporte y almacenamiento son sencillos.

A pesar de estas múltiples ventajas, la medición de cortisol en saliva presenta el inconveniente de que sólo cubre un momento puntual y limitado sin posibilidad de medir el estrés de forma longitudinal o a posteriori (Kidambi, Raff, y Findling, 2007). Por otro lado, las medidas de cortisol en saliva, al igual que ocurre con el cortisol en sangre y orina, están influenciadas por las características individuales y ambientales, incluyendo los procedimientos de estudio (Wolfram, Bellingrath, Feuerhahn, y Kudielka, 2013), la hora del día (Adam Hawkey, Kudielka, y Cacioppo, 2006), y el consumo de alimentos (Gibson et al., 1999). Es importante tener en cuenta que aunque sea uno de los biomarcadores biológicos más utilizados en investigación sobre estrés y en el estudio del eje HHA, determinadas variables pueden afectar a los niveles de cortisol en saliva, tales como los estrógenos, determinados por el género, anticonceptivos orales o ciclo menstrual, así como otras variables de tipo médico (Hellhammer, Wüst, y Kudielka, 2009).

El cortisol en saliva, sigue siendo la medida más utilizada en laboratorio para estudiar la respuesta a situaciones de estrés psicosocial, principalmente en la tarea de hablar en público, Trier Social Stress Test (TSST), que describiremos más adelante.

2.3.2. Cortisol en pelo

En los últimos años, se ha desarrollado un nuevo y diferente método para medir la secreción de cortisol tanto en humanos como en animales y consiste en la extracción de cortisol en pelo.

Desde hace años, el pelo se ha utilizado como un sustrato para la medición de agentes ambientales, fármacos o toxinas e incluso para medir retrospectivamente hormonas esteroides (Wheeler, Zhong, Kicman, y Coutts, 1998; Yang, Lan, Meng, Wan, y Han, 1998), incluyendo los niveles de cortisol en pelo, cuya primera prueba fue aportada en el año 2000 (Crimele, Kintz, Dumestre, Goullé, y Ludes, 2000). Desde entonces, una gran cantidad de investigaciones han utilizado en esta prometedora técnica para medir el estrés crónico, presentando numerosas ventajas entre las que destaca la extracción de cortisol como una "ventana al pasado reciente". El pelo tiene una tasa de crecimiento bastante predecible de aproximadamente 1 cm/mes. Por lo tanto, la parte más próxima del segmento de 1 cm al cuero cabelludo se aproxima a la producción de cortisol del último mes, el segundo centímetro del segmento más proximal se aproxima a la producción durante el mes anterior, y así sucesivamente (Wennig, 2000). De este modo, si analizamos tres centímetros de pelo, obtendremos la cantidad de cortisol segregada por la persona en los tres últimos meses, ya que cada centímetro representa un valor aproximado de la producción de cortisol de un mes.

Este método permite a los investigadores examinar retrospectivamente la producción de cortisol en los momentos en que un factor de estrés era más sobresaliente, sin necesidad de tomar la muestra en ese momento. Por otro lado, al tratarse de una técnica no invasiva, se elimina también el riesgo de que la propia toma de muestras impacte sobre la producción de

cortisol (ya que no produce dolor) como ocurre en el caso de la medida tradicional de cortisol en sangre. Finalmente, hay destacar que el procedimiento es muy sencillo y no precisa que la muestra sea recogida por un profesional sanitario. Una vez recolectado el pelo, puede ser almacenado en sobres o frascos a temperatura ambiente, libre de exposición a la luz solar, y con facilidad para su transporte (Gow, Thomson, Rieder, Van Uum, y Koren, 2010).

Actualmente, contamos con gran cantidad de estudios que han aplicado esta técnica como un biomarcador de estrés crónico. En la literatura podemos encontrar estudios observacionales o intervencionistas (Iglesias y cols., 2015; Russell, Koren, Rieder, y Van Uum, 2012); estudios que la utilizan como técnica de biomarcador de eventos vitales estresantes (Karlén, Ludvigsson, Frostell, Theodorsson, y Faresjö, 2011); estudios sobre estrés en animales (Gow y cols., 2010; Weisser et al., 2016); estudios sobre los estados de ánimo y trastornos de ansiedad, así como en relación a otros trastornos psicopatológicos (Staufenbiel, Penninx, Spijker, Elzinga, y van Rossum, 2013; Vives, 2015); estudios de la relación con otras características sociodemográficas y de estilo de vida (Wosu y cols., 2015), etc.

En la última década, la extracción del cortisol en pelo ha surgido como un biomarcador prometedor, tanto de estrés crónico como de alteraciones del eje hipotalámico-hipofisario adrenal, como el síndrome de Cushing (Wester y van Rossum, 2015) y la enfermedad de Addison (Noppe, Rossum, Vliegenthart, Koper, y Akker, 2014), confirmando el carácter retrospectivo y no invasivo para medir el estrés, y reafirmando su gran potencial para la aplicación en investigación.

2.3.3. Recogida y análisis de cortisol en saliva y en pelo

Una vez descritos los distintos métodos de recogida del cortisol utilizados en esta tesis, vamos a pasar a exponer la metodología empleada para la extracción de las concentraciones de cortisol en saliva y en pelo.

El cortisol en saliva, se recoge a través de los *Salivette® Cortisol* (*Sarstedt, Numbrecht, Alemania, Ref.51.1534*). Estos constan de dos pequeños tubos, uno mayor que contiene otro más pequeño, el cual guarda un trozo de algodón. Es el método más óptimo e higiénico de recolección de saliva. Permite al sujeto recoger la saliva muy fácilmente y de forma independiente, sin la necesidad de asistencia de profesional médico. El tipo de *Salivette®* utilizado en esta tesis doctoral puede verse en la Figura 2.



Figura 2: Método de recogida de cortisol en saliva. Obtenida de www.medicaexpo.es/prod/sarstedt

El procedimiento de recogida consiste en introducirse en la boca el algodón que contiene el *Salivette®* durante un minuto y humedecerlo con saliva lo máximo que se pueda. Treinta minutos antes de la recogida de la muestra no se puede comer, beber (excepto agua), fumar, tomar chicles o caramelos, ni lavarse los dientes.

Posteriormente, se introduce de nuevo en el tubo, y se introduce en frío, para su posterior análisis mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas de electroquimioluminiscencia (ELISA) a través de quimioluminiscencia. Este método está

diseñado para su uso en Roche Elecsys 1010/2010 automatizado por los analizadores y en el módulo Elecsys MODULAR ANALYTICS E170.

Mediante el Salivette® se puede analizar el cortisol de forma precisa con poca cantidad de saliva y con bajos niveles de cortisol. Esto resulta una ventaja para nuestra investigación, puesto que, entre las pacientes autoinmunes participantes en esta tesis, se encontraban mujeres con síndrome de Sjögren, siendo unos de los síntomas principales de esta enfermedad tener un volumen bajo de saliva o ausencia de la misma.

Como puede observarse en la Figura 3, el cortisol en pelo se recoge cortando un mechón de la cabeza desde la raíz, con un grosor del tamaño del diámetro de un lápiz. Se coloca en papel de aluminio, y se cierra. Posteriormente, se cortan los 3 cm del mechón de pelo obtenido más cercanos a la raíz, y se introducen en pequeños tubos para su posterior análisis. Al igual que con la extracción del cortisol en saliva, para la obtención de las concentraciones de cortisol en pelo, se lleva a cabo la técnica ELISA. En la Figura 4, puede observarse como se concentra el cortisol en el pelo.



Figura 3: Método de recogida de cortisol en pelo

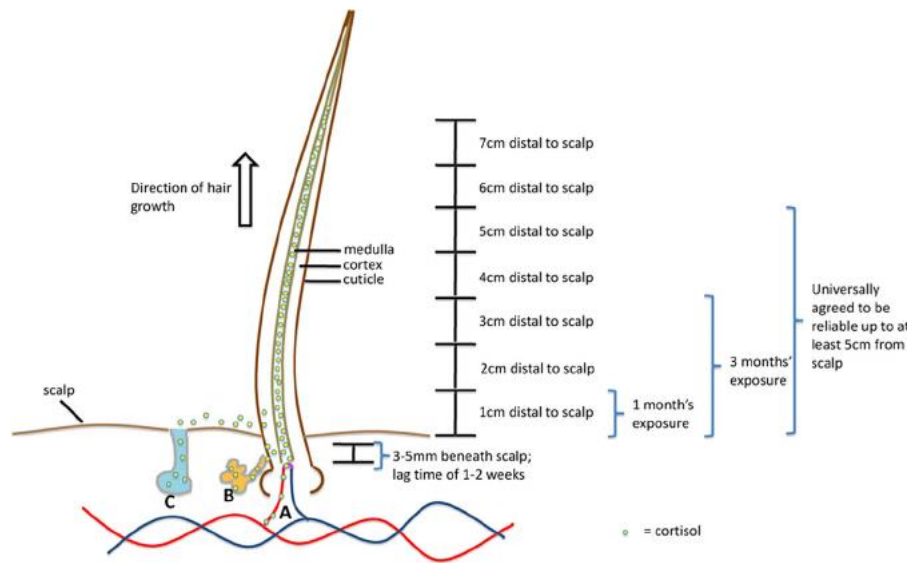


Figura 4: Concentración del cortisol en el folículo piloso. Obtenida de Rusell y cols. (2012)

2.4. EMPLEO DE ESTRESORES PSICOLÓGICOS DE LABORATORIO

La estimulación que se emplea para inducir estrés puede desarrollarse a través de dos métodos; en contexto real o en laboratorio. Por un lado, los métodos utilizados en contexto real, tienen mayor poder de generalización y extrapolación de los resultados, pero los métodos empleados en laboratorio permiten mayor control de las variables y una mayor posibilidad de replicación.

Los estresores psicológicos implican la evaluación cognitiva del factor estresante y pueden clasificarse en tres categorías principales: tareas de rendimiento, tareas de interacción social, e imaginación guiada individualizada del estado de ánimo (Thomas, Bacon, Sinha, Uhart y Adinoff, 2012).

Estas categorías incluyen diversas tareas y según Moya-Albiol y Salvador (2001), las más empleadas son:

1. Tareas aritméticas
2. Tareas de resolución de problemas

3. Tareas de tiempo de reacción
4. Tareas de hablar en público

De todas ellas, las tareas de hablar en público, son las únicas que activan tanto el eje adrenomedular como el eje HHA.

La Trier Social Stress Test (TSST) es una de las tareas de hablar en público que más se usa para estudiar la respuesta del eje HHA. Es una herramienta utilizada para investigar la respuesta psicobiológica al estrés en situaciones de laboratorio, ya que activa el eje HHA (Kirschbaum, Pirke, y Hellhammer, 1993) y el sistema nervioso autónomo (SNA). Esta respuesta se refleja en el incremento de la tasa cardíaca, conductancia de la piel, la presión sanguínea, adrenalina y cortisol, así como un empeoramiento del estado de ánimo (Al' Absi y cols., 1997; Montero-López y cols., 2015; Nicolson, Storms, Ponds, y Sulon, 1997). En la TSST tradicional propuesta por Kirschbaum y cols. (1993), el sujeto tiene que preparar un discurso que refleje que es la persona idónea para conseguir un determinado puesto de trabajo, pronunciar ese discurso que ha preparado ante una audiencia y, posteriormente, completar una tarea aritmética ante la misma. La audiencia está compuesta por personas que previamente han sido entrenadas en conductas verbales y no verbales neutras (Foley y Kirschbaum, 2010).

La TSST, provoca cambios significativos del eje HHA con patrones de respuesta diferentes entre pacientes y sujetos sanos, así como entre pacientes con diferentes patologías. Variables como el género, la edad, rasgos de personalidad, entorno social, y el genotipo determinan la respuesta de estrés agudo del individuo provocada por la TSST (Foley y Kirschbaum, 2010).

Skoluda y cols. (2015) comprobaron que, en comparación con otras tareas como el ergómetro, la tarea de Stroop y la prueba de estimulación por frío, la TSST era la que producía mayor incremento de estrés percibido por el sujeto y mayor incremento de la respuesta del eje

HHa. En el caso de la respuesta autonómica, el ergómetro era la tarea que mayor incremento producía, seguida de la TSST.

A pesar de ser muy utilizada, la aplicación de la TSST tradicional presenta una serie de limitaciones, tanto para crear diferentes ambientes y escenarios, así como para contar con una audiencia disponible para cada sesión experimental y con un número de personas suficiente, ya que, a mayor audiencia, mayor incremento de la respuesta al estrés (Kotlyar y cols., 2008). Otra limitación es el coste económico, al ser necesarias diferentes salas (para el sujeto y la audiencia), así como el tiempo invertido en el entrenamiento a las personas de la audiencia, teniendo en cuenta que, a pesar de estar formadas para mostrar una conducta neutra ante los sujetos, este recurso puede no ser fiable, mostrando diferencias en su conducta de un sujeto a otro. Teniendo en cuenta estas limitaciones en su aplicación en el laboratorio y, principalmente, la variabilidad individual, Kudielka, Hellhammer, y Kirschbaum (2007) recomiendan que “los investigadores deberán determinar qué protocolo de la TSST podría ser utilizado como herramienta de diagnóstico para predecir la susceptibilidad frente a la enfermedad y la severidad de los síntomas, y/o la monitorización de la eficacia de las intervenciones” (p.74).

Las tareas de realidad virtual llevadas a cabo en el laboratorio, son usadas cada vez más por su utilidad y eficacia, para crear diferentes ambientes y entornos a través de ordenador e imágenes en 3D, permitiendo estudiar distintos trastornos y sus respuestas asociadas; entre ellas el estrés (Krijn, Emmelkamp, Olafsson, y Biemond, 2004). Por este motivo, y gracias a los grandes avances tecnológicos con los que contamos actualmente, y como principal solución a los inconvenientes anteriormente descritos, se está llevando a cabo el uso de la realidad virtual en la TSST mediante métodos cada vez más sofisticados que utilizan diseños experimentales con el mismo paradigma de esta tarea mediante realidad virtual (Jönsson y cols., 2010; Kelly, Matheson, Martínez, Merali, y Anisman, 2007; Kotlyar y cols., 2008; Santos-Ruiz y cols., 2010, Montero-López y cols., 2015). La adaptación de la TSST en un entorno de realidad virtual

(RV) provoca una respuesta fisiológica significativa, resolviendo así algunas de las limitaciones mencionadas anteriormente.

Por lo tanto, la adaptación de la TSST en el entorno virtual (TSST-RV) constituye una alternativa viable a las formas habituales de presentación de las tareas de estrés (Kotlyar y cols., 2008). En una revisión reciente de Malbos, Boyer, y Lançon (2013), sobre la aplicación de RV para el tratamiento de trastornos mentales, llegaron a la conclusión de que había pruebas suficientes para demostrar la eficacia de esta metodología en la evaluación y el tratamiento de distintos trastornos mentales.

Kelly, Matheson, Martínez, Merali, y Anisma (2007) utilizaron la TSST-VR, y comprobaron que dar un discurso y llevar a cabo una tarea aritmética delante de una audiencia virtual produjo un significativo aumento de cortisol salivar (30%), a pesar de que el aumento fue mayor cuando ambas tareas se llevaron a cabo frente a un verdadero público (90%). En su estudio, Kotlyar y cols. (2008) demostraron que la TSST-VR daba lugar a una respuesta fisiológica significativa con un aumento de la presión arterial sistólica y diastólica, y de la frecuencia cardíaca.

Varios estudios han utilizado la TSST-VR en los últimos años. Por ejemplo, Jönsson y cols. (2010) estudiaron la habituación de respuesta de las distintas medidas de la actividad simpática tras una segunda aplicación de la TSST-RV. En la primera sesión de la TSST-RV hubo un aumento del 88% de cortisol salivar con respecto a los niveles de la línea de base, habiendo habituación tras la segunda sesión. Otra versión de la TSST-RV fue implementada por Santos Ruiz y cols. (2010) mediante la proyección de una audiencia virtual en 3D en una pantalla, llegando a la conclusión de que esta forma de la TSST-RV estimula los principales ejes que intervienen en la respuesta al estrés.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta la fecha, llegamos a la conclusión de que la TSST-RV constituye una técnica útil en el estudio de la activación de los ejes básicos que intervienen en la respuesta al estrés.

CAPÍTULO III: “ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y ESTRÉS

Es numerosa la cantidad de enfermedades provocadas por una respuesta autoinmune. En ellas se producen autoanticuerpos y reacciones de hipersensibilidad inmunológica por linfocitos T, diferenciando entre *enfermedades autoinmunes orgánico-específicas* (cuando afectan a un solo órgano) y *enfermedades autoinmunes sistémicas* (cuando hay afectación de diferentes órganos y sistemas de forma extensa y en un/a mismo/a paciente).

Dentro del grupo de enfermedades autoinmunes sistémicas se encuentran el **lupus eritematoso sistémico, el síndrome de Sjögren y la esclerosis sistémica**. Por dos razones, pacientes con estas enfermedades son las que se han seleccionado para esta tesis. En primer lugar, al hacer un sondeo previo de la prevalencia en las unidades de enfermedades sistémicas de los hospitales de Granada, se comprobó que estas tres eran las que abarcaban mayor número de pacientes para formar grupos homogéneos que pudieran ser incluidos en los estudios de esta tesis. En segundo lugar, actualmente son aún escasos los estudios sobre estrés y estas enfermedades, en comparación con otras enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide o esclerosis múltiple.

A continuación, vamos a describir las principales características de cada una de estas tres enfermedades autoinmunes.

3.1. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica de etiología desconocida con afectación multisistémica (Tsokos, 2011; Vargas-Hitos y cols., 2014). Se caracteriza por una alteración en la respuesta inmunológica produciéndose anticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares, afectando así a múltiples órganos. Los principales órganos afectados con una gravedad variable son: piel, articulaciones, riñones, pulmones, sistema nervioso y la sangre, entre otros (Schur y Gladman, 2011). Cursa con un amplio espectro de manifestaciones clínicas (Smith y Gordon, 2010), donde la mayoría de los

pacientes tienen una evolución crónica, presentando períodos de brotes o exacerbaciones de la enfermedad intercalados con períodos de inactividad.

3.1.1. Epidemiología

Es del 90 % en mujeres en edad fértil, aunque puede aparecer en la infancia y en épocas más tardías y un 10 % en hombres. La incidencia y prevalencia del LES varía según la etnia (son más frecuentes y graves en nativos indígenas americanos, orientales y afroamericanos) y el área geográfica (más elevadas en Europa y Australia que en Estados Unidos). En España se estima una prevalencia de 34-91 por 100.000 personas, y la incidencia de 2/100.000/habitantes-año (Jiménez-Alonso y cols., 2011).

3.1.2. Factores etiológicos

Actualmente se desconoce la etiología y mecanismos etiopatogénicos que subyacen al LES, pero diferentes estudios confirman la implicación de distintos factores que determinan el desarrollo de la enfermedad.

Factores genéticos

Entre los principales factores genéticos que pueden tener una posible implicación en el desarrollo del LES, se encuentran:

1. Antecedentes familiares: Siendo más frecuente en personas con familiares con LES (5-10 %), familiares con otras enfermedades autoinmunes o bien con anomalías inmunológicas. Sin embargo, el hecho de que el 90 % de las personas con LES carezcan de antecedentes familiares, confirma la existencia de otros factores implicados (Santos-Ruiz, 2012).
2. Predisposición genética: Estudios como el de Sestak, Fürnrohr, Harley, Merrill y Namjou (2011), confirman que existe una predisposición genética evidente, pero la mayoría de estos genes se desconocen. El marcador genético más frecuente en LES, es el gen anómalo C₄AQO productor de la

proteína C4a del complemento, que hace que ésta no funcione correctamente (Welch y cols., 1998). Además de esta asociación del LES con antígenos HLA DR2 y DR3, también se ha asociado con la presencia de anticuerpos IgG contra la beta 2-glicoproteína I (Arnett, Thiagarajan, Ahn, y Reveille, 1999).

3. Cromosoma X: Diversos estudios están apoyando la hipótesis de que la dosis génica del cromosoma X determina la vulnerabilidad a desarrollar la enfermedad, por lo que el complemento del cromosoma sexual XX presentaría mayor susceptibilidad a desarrollar LES que el complemento cromosómico XY (Scofield y cols., 2008; Smith-Bouvier, Divekar, Sasidhar, y cols., 2008).

Factores hormonales

Debido a la estimulación estrogénica mantenida, se altera la respuesta autoinmune (Kanda, Tsuchida, y Tamaki, 1999), facilitando la producción de anticuerpos anti-DNA y de inmunocomplejos circulantes. Esta evidencia de la afectación hormonal, queda reflejada en la mayor incidencia del LES en mujeres, y sobre todo especialmente tras la menarquía y en la postmenopausia (etapa donde los niveles de estrógenos son elevados). Por otro lado, parece haber una protección por los andrógenos, puesto que varones con LES presentan niveles hormonales elevados en estrógenos y bajos en andrógenos.

Factores ambientales

Los principales factores ambientales que están implicados en el desarrollo del LES son:

1. Luz ultravioleta B: Existe relación entre el inicio o exacerbación del LES y la exposición a la luz solar siendo además la mayoría de los pacientes fotosensibles.
2. Fármacos: Medicamentos como la clorpromazina, isoniazida, anticonvulsivantes, hidralazina, procainamida y propiltiouracilo pueden desarrollar en el hombre un

síndrome clínico similar al LES, aunque no está claro el mecanismo por el que estos fármacos inducen la enfermedad.

3. Hábitos de vida: Conductas como la exposición a metales pesados como cadmio, mercurio y oro, así como a sustancias relacionadas con la producción de anticuerpos antinucleares como sílice y pesticidas, se han relacionado con la etiología del LES. Por otro lado, el tabaquismo y la ingesta de determinados alimentos que contienen psoralenos, L-canavanina e, hidracinas o bien una desnutrición proteico calórica, se han asociado a la inducción del LES. Por último, diferentes estudios han demostrado el papel exacerbador que tiene el estrés psicosocial en el LES (Peralta-Ramírez, Navarrete-Navarrete, y Pérez-García, 2006; Santos-Ruiz, 2012). Otros estudios confirman que el incremento del estrés cotidiano empeora la sintomatología del LES, entre las 24 y las 48 horas siguientes a la exposición al estresor (Schubert y cols., 2003; Peralta-Ramírez, Jiménez-Alonso, Godoy-García, y Pérez-García, 2004; Peralta-Ramírez, 2006; Peralta-Ramírez, Jiménez-Alonso y Pérez García, 2009), así como se ha identificado al estrés como uno de los factores que inciden en el deterioro cognitivo de pacientes con lupus (Peralta-Ramírez y cols., 2006).

3.1.3. Síntomas y signos clínicos

1. Manifestaciones generales: Los síntomas generales más frecuentes son la astenia (95 %), pérdida de peso inexplicable (95 %), fiebre prolongada sin deberse a ningún proceso infeccioso (90-95 %) y pérdida de peso inexplicable. Las manifestaciones más frecuentes son osteomusculares y cutáneas (Rothfield, Sontheimer, y Bernstein, 2006).
2. Manifestaciones músculo-esqueléticas: Son los síntomas más frecuentes de la enfermedad. El 90 % de los/as pacientes con lupus, presenta dolor e inflamación de las articulaciones (artritis). Las manifestaciones más habituales son artralgias, mialgias y poliartritis intermitentes no deformantes que afectan a manos, rodillas y muñecas.

3. Manifestaciones cutáneas: Las afecciones cutáneas son las más frecuentes tras las músculo-esqueléticas. La lesión más conocida es el “eritema malar en alas de mariposa” que consiste en el enrojecimiento y la erupción de la piel de las mejillas y la nariz. Cuando la enfermedad está activa, es frecuente la alopecia. La fotosensibilidad (piel muy sensible a los rayos ultravioleta) también es muy frecuente en el LES, siendo habitual la aparición de signos de la enfermedad tras una exposición solar prolongada.
4. Manifestaciones cardiopulmonares: Pericarditis (inflamación del pericardio) y pleuritis (inflamación de la pleura) son las principales afecciones cardiopulmonares debidas al lupus.
5. Manifestaciones renales: La mayoría de los/as pacientes con LES presenta depósitos de inmunoglobulinas en los glomérulos pero solo el 50 % desarrolla nefritis clínica. Un 23% de los/as pacientes con nefropatía lúpica desarrollará en un periodo de cinco años, insuficiencia renal terminal.
6. Manifestaciones digestivas: Los síntomas más frecuentes son las náuseas, diarreas, vómitos y molestias inespecíficas o atribuibles al tratamiento. La más frecuente es la vasculitis intestinal, que predispone a perforación intestinal por peritonitis lúpica o infarto abdominal y abdomen agudo.
7. Manifestaciones hematológicas: Sobre todo anemia (descenso del número normal de hemoglobina) y trombopenia (descenso del número normal de plaquetas).
8. Manifestaciones neuropsiquiátricas y neuropsicológicas: Hasta un total de diecinueve manifestaciones psiquiátricas pueden estar presentes en el lupus. Las principales son cefalea, ansiedad y depresión, disfunción cognitiva por lesiones isquémicas, enfermedad cerebrovascular y síndrome orgánico cerebral agudo lúpico. Por otro lado, las principales manifestaciones neuropsicológicas que se pueden ver afectadas son la

memoria, atención, fluencia verbal, flexibilidad cognitiva y coordinación visomotora (Coín y cols., 2008; Glanza y cols., 2005, Mikdashi, 2007; Monastero y cols., 2001).

En la Figura 5 podemos ver los principales síntomas y signos del LES.

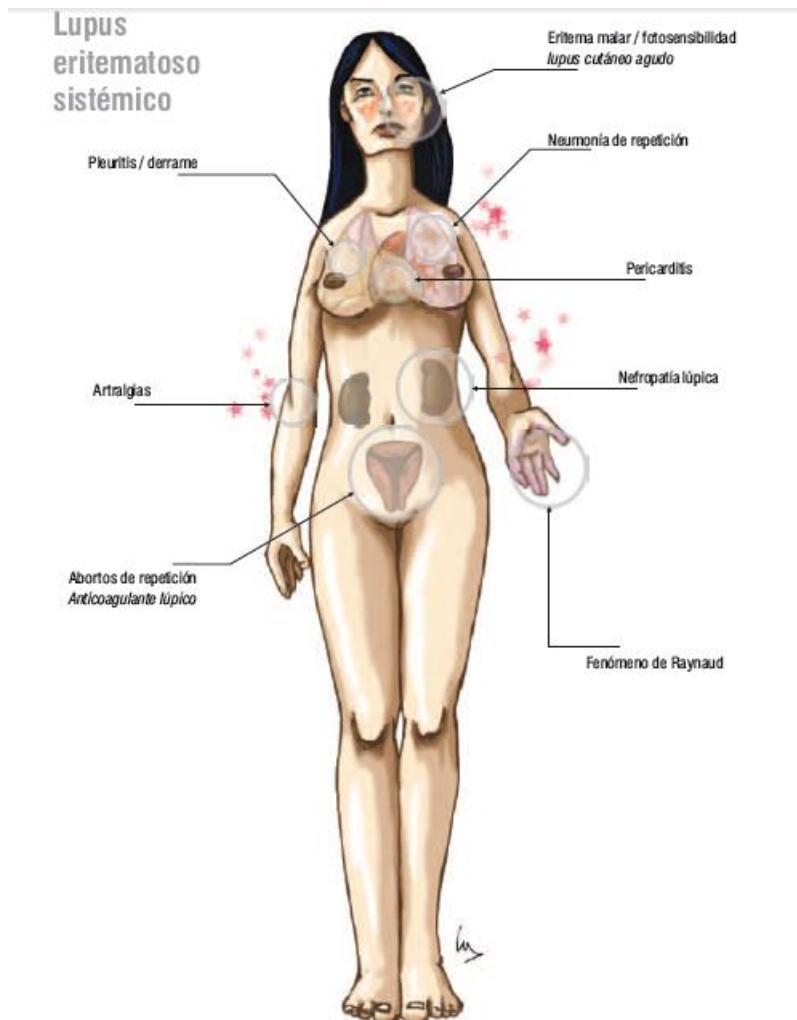


Figura 5: Signos y síntomas del LES. Obtenido del Manual AulaMir, Colegio Oficial de Médicos de Granada (2015)

3.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico se realiza al presentar al menos cuatro de los siguientes criterios diagnósticos propuestos por la American College of Reumathology (ACR) en 1997:

1. Erupción malar.
2. Lupus discoide.
3. Fotosensibilidad.
4. Úlceras orales.
5. Artritis no erosiva.
6. Serositis (pleuritis o pericarditis).
7. Afección renal: proteinuria o cilindros en la orina.
8. Afección neurológica.
9. Alteración hematológica.
10. Alteración inmune (presencia de anticuerpos anti-ADN, anti-Sm y/o anticuerpos antifosfolípido)
11. Anticuerpos antinucleares (ANA) positivos.

3.1.5. Clasificación

1. Pseudolupus (*lupus-like syndrome*): Engloba a pacientes que no cumplen con, al menos cuatro de los criterios diagnósticos propuestos por la ACR, pero presentan signos clínicos habituales del LES.
2. Lupus por fármacos: Se trata de un síndrome originado por algunos fármacos, que manifiesta características clínicas similares al LES, pero un perfil de anticuerpos diferente.
3. Lupus neonatal: Producido por el traspaso de anticuerpos maternos a través de la placenta, y suele desaparecer a los 6-8 meses de edad.
4. Lupus de inicio en la infancia: Aproximadamente el 8 % de pacientes es menor de 14 años.
5. Lupus de inicio tardío: Aproximadamente el 10-15 % de pacientes inician la enfermedad a los 50-60 años.

6. Lupus sin anticuerpos antinucleares: El 5 % de pacientes no presenta ANAs en ningún momento de la enfermedad.
7. Lupus con anticuerpos antifosfolípidos: Denominado síndrome antifosfolípido.
8. Lupus eritematoso cutáneo subagudo (LECS): Se caracteriza por lesiones cutáneas floridas, fotosensibles y con borde serpiginoso característico.

3.1.6. Tratamiento

En la Tabla 1 podemos ver los tipos de tratamiento para el LES. El tratamiento dependerá y se irá adaptando al estado de cada paciente con el objetivo de mantener la remisión clínica de la enfermedad, permitiéndole continuar con su vida cotidiana (Jiménez-Alonso, 1997).

Tabla 1. Tipos de tratamientos en LES

Tratamientos	Componentes o alternativas
Farmacológico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) ▪ Glucocorticoides ▪ Inmunosupresores ▪ Otros medicamentos: Antipalúdicos ▪ Nuevas tendencias: <ul style="list-style-type: none"> ◆ Tratamientos biológicos ◆ Trasplante de progenitores hemopoyéticos
Estilo de vida	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Actividad física (teniendo en cuenta el estado de cada paciente, que no necesite período en cama) ▪ Protección solar ▪ Alimentación (variada y equilibrada) ▪ No fumar

3.2. SÍNDROME DE SJÖGREN

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune de causa desconocida que consiste en una inflamación crónica de las glándulas de secreción externa, (especialmente lacrimales y salivares) produciendo disminución de las glándulas salivares, xerostomía,

queratoconjuntivitis seca y aumento de la glándula parótida (Chen, Cao, Lin, Olsen, y Zheng, 2015; Greenspan, Daniels, Talal, y Sylvester, 1974; Sjögren, 1930).

3.2.1. Epidemiología

El síndrome de Sjögren es considerado la variante más frecuente de enfermedad sistémica y puede llegar a afectar al 3 % de la población, con una prevalencia de 1 cada 1.000 habitantes. Es más frecuente en mujeres (García-Carrasco y cols., 2002) siendo la proporción de hasta 15:1, y suele comenzar a partir de los 30-40 años, aunque puede aparecer a cualquier edad.

3.2.2. Factores etiológicos

Actualmente, no se conoce la causa que origina el SS. Algunos estudios apuntan a posibles *factores genéticos y ambientales* implicados en la patogénesis del síndrome, dando lugar a la desregulación de las células epiteliales, produciendo una inflamación aberrante y respuesta autoinmune anómala (Luciano y cols., 2015), siendo el desencadenante posible de la enfermedad una *infección vírica*.

Entre los factores genéticos, existe predisposición genética, que se confirma por la presencia de determinados marcadores HLA [DR2/DR3] y también por la existencia de varios casos en una misma familia. Otro factor de riesgo de tipo hormonal son los estrógenos, que explicaría que sea una enfermedad predominante en las mujeres.

En el síndrome de Sjögren, la infiltración de *linfocitos T₄* destruye directamente las células epiteliales dando lugar a la liberación de *citoquinas*, aumentando la proliferación de *linfocitos B* (Sánchez-Román y cols., 2010) que causa la hiperactividad linfocitaria característica de la enfermedad (Ramos-Casals, García-Carrasco, Cervera, Font, y Ingelmo, 2005), dando lugar a:

- Hipergammaglobulinemia
- Anticuerpos antinucleares de factor reumatoide

- Anticuerpos dirigidos contra otros órganos

3.2.3. Síntomas y signos clínicos

A. Manifestaciones generales: En algunos/as pacientes los síntomas son muy molestos y en otros/as casi son imperceptibles. Esto hace que no exista un SS igual a otro. Las manifestaciones generales suelen ser fiebre sin motivo, cansancio, dolores musculares o articulares, afecciones digestivas funcionales, alteraciones del sueño y síntomas depresivos. De forma más específica los síntomas más frecuentes de este síndrome pueden englobarse en dos grupos, glandulares y los extraglandulares.

B. Manifestaciones glandulares:

1. Síntomas bucales y orales: La destrucción en mayor o menor grado de las glándulas salivales causa *xerostomía* (disminución salival) lo que da lugar a sequedad oral lo que dificulta la deglución de los alimentos. Por otro lado, la falta de saliva (por sus propiedades antisépticas) hace que la higiene de la boca sea defectuosa, favoreciendo las *infecciones de encías y dientes* por hongos y bacterias. También se produce *tumefacción parotídea*.
2. Síntomas oculares: La inflamación de las glándulas lagrimales causa *xeroftalmía* (disminución lacrimal). La falta de humedad en el ojo debido a la disminución/ausencia de lágrimas puede desencadenar inflamación conjuntiva y lesiones ulceradas en la córnea, dando lugar a una queratoconjuntivitis *seca*. También los ojos se vuelven más *sensibles a la luz*, hasta el punto de no tolerar la exposición al sol.
3. Otros síntomas glandulares: Se observa disminución de las secreciones *cutánea* (produciendo sequedad de la piel), *bronquial* (causando tos irritativa), del *tracto digestivo* (dando lugar a hipoclorhidria, que es la disminución de la producción del ácido gástrico), *intestinal* (facilitando el estreñimiento) y *vaginal* (causando dispareunia dando lugar a infecciones y molestias durante las relaciones sexuales).

C. Manifestaciones extraglandulares:

1. Osteomusculares: Las artralgias y artritis son las más frecuentes y afectan sobre todo a las manos. Se refieren al dolor (artralgia) e inflamación de las articulaciones de los huesos (artritis).
2. Cutáneas: Sobre todo vasculitis cutánea, relacionada con la presencia de *crioglobulinas*, que son anticuerpos que tienen la característica de precipitar o coagular con el frío. Presencia de púrpura de miembros inferiores. También fenómeno de Raynaud o lesiones “lupus-like”.
3. Neurológicas: Hay más probabilidad de lesiones neurológicas como hemiparesia (disminución del movimiento sin llegar a parálisis) y déficit neurosensorial (ataxia o neuropatía trigeminal).
4. Pulmonares y nefrológicas: Se manifiestan en forma de infiltrados y generalmente producen poca sintomatología. A nivel pulmonar, suele haber afectación de los bronquios y fibrosis pulmonar, y a nivel renal, nefropatía intersticial y glomerulonefritis.
5. Hepáticas: Cirrosis biliar primaria y hepatitis autoinmune.
6. Vejiga urinaria: Cistitis intersticial (no infecciosa), se trata de un incremento de la frecuencia urinaria, urgencia miccional y dolor abdominal bajo o perineal originado en la vejiga.
7. Gastrointestinales: Disfagia, gastritis atrófica, asociación a enfermedad celíaca y pancreatitis autoinmune.

En la Figura 4 se encuentra los principales síntomas y signos del síndrome de Sjögren.

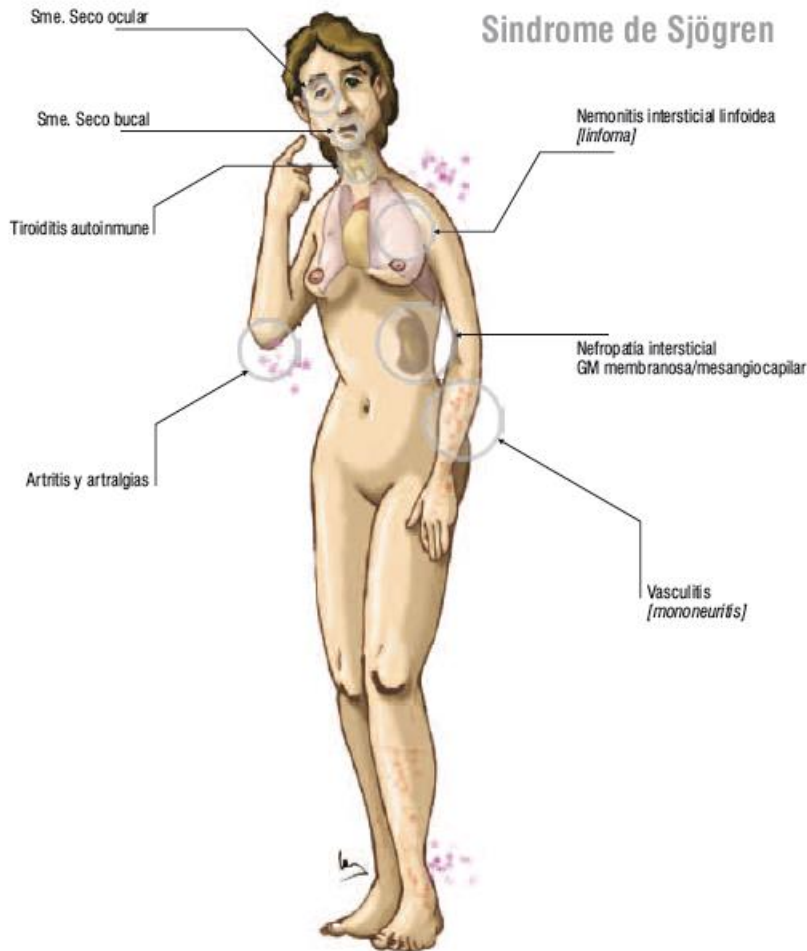


Figura 6: Síntomas y signos del Sjögren. Obtenido del Manual AulaMir, Colegio Oficial de Médicos de Granada (2015)

3.2.4. Diagnóstico

Calvo-Aranda y Muñoz-Fernández (2011) proponen un esquema diagnóstico a partir los criterios de clasificación americano-europeos del síndrome de Sjögren (2002):

1. Síntomas oculares (1 respuesta afirmativa):

- Molestias de sequedad ocular de forma diaria y persistente en los últimos 3 meses.
 - Sensación de arenilla en los ojos.
 - Utilización de lágrimas artificiales más de 3 veces al día.
2. Síntomas orales (1 respuesta afirmativa):
- Sensación de sequedad oral en los últimos 3 meses.
 - Glándulas salivales hinchadas de forma recurrente y persistente.
 - Tener que beber líquidos frecuentemente para tragar alimentos secos.
3. Signos oculares (1 resultado positivo):
- *Test de Schirmer* sin anestesia < 5 mm en 5 minutos. Consiste en introducir un papel absorbente en el saco conjuntival inferior durante 5 minutos o hasta que la humedad llegue a 10 mm que es el límite normal del que se considera que no hay humedad.
 - *Tinción con Rosa de Bengala o fluoresceína*. En pacientes con sequedad dudosa no confirmada en la prueba anterior, se examina la conjuntiva del ojo con lámpara de hendidura y tinción con Rosa de Bengala o fluoresceína para confirmar la existencia o no de queratoconjuntivis punteada (propia de la sequedad crónica).
4. Biopsia de glándula salival menor: Se hace una pequeña incisión en la parte interna del labio inferior, mediante cirugía mínimamente invasiva con anestesia local, extrayéndose varias glándulas para examen anatómico patológico. El criterio compatible con SS es la presencia de *sialoadenitis* linfocítica con focus score ≥ 1 (un foco de linfocitos en una concentración de más de 50 linfocitos por 4 mm² de tejido glandular).
5. Alteración objetiva de la función de las glándula salivales:
- Sialometría: flujo sin estimulación $\leq 1,5$ ml en 15 minutos.

- Sialografía parotídea: sialectasias difusas.
- Gammagrafía parotídea: captación retrasada, concentración reducida o excreción retrasada del marcador.

6. Presencia de anticuerpos en suero de anti-Ro/SSA o anti-La/SSB.

Se diagnosticará el síndrome de Sjögren como primario cuando se cumplan 4 de los 6 criterios propuestos, siendo necesario que uno sea el quinto o el sexto, y 3 de los 4 criterios objetivos (del tercero al sexto).

3.2.5. Clasificación

Según la Asociación Española de Síndrome de Sjögren (AESS) podemos diferenciar entre dos tipos de SS según si la enfermedad está acompañada o no de otras enfermedades autoinmunes.

1. Síndrome de Sjögren primario: Aparece sin la presencia de otra enfermedad autoinmune asociada.
2. Síndrome de Sjögren secundario o síndrome de Sjögren asociado: En este caso está asociado a otras enfermedades autoinmunes o reumatológicas, principalmente artritis reumatoide, LES, esclerosis sistémica o miopatías inflamatorias.

3.2.6. Tratamiento

En la Tabla 2 se encuentran los tipos de tratamiento para el síndrome de Sjögren. A nivel general, se deben evitar los medicamentos que favorezcan la sequedad de las mucosas. Por otro lado, se debe favorecer la humedad ambiental, evitando el exceso de calefacción y disponer de humidificadores en las habitaciones (o bien recipientes planos con agua) para una constante humidificación gracias a la evaporación.

Tabla 2. Tipos de tratamiento en SS

Manifestaciones	Componentes o alternativas
-----------------	----------------------------

Extraglandulares	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) ▪ Glucocorticoides ▪ Inmunosupresores ▪ Antipalúdicos ▪ Tratamientos biológicos
Glandulares (oculares)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lágrimas artificiales ▪ Gafas de sol
Glandulares (bucales)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Salivales artificiales ▪ Beber agua frecuentemente ▪ Chicles y caramelos (sin azúcar) y pilocarpina, para estimular la producción de saliva
Sequedad de las mucosas respiratorias	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Higiene bucal rigurosa
Sequedad vaginal	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lavados nasales ▪ Humidificación ambiental
Sequedad cutánea	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Óvulos o cremas con estrógenos (siempre con prudencia en paciente con lupus) ▪ Espumas hidratantes (teniendo cuidado a las infecciones por hongos) ▪ Lubricantes ▪ Aceites y cremas hidratantes

3.3. ESCLEROSIS SISTÉMICA

Sánchez-Román y cols. (2010) definen la esclerosis sistémica o esclerodermia (SSc) como una enfermedad crónica y autoinmune caracterizada por la afección difusa (induración o endurecimiento) de la piel y órganos internos (pulmones, corazón, riñón, tubo digestivo y articulaciones), predominando los cambios en los vasos sanguíneos de menor tamaño que

nutren los órganos (microcirculación) y tendencia a la cicatrización exagerada (fibrosis colágena).

Es una enfermedad poco frecuente que produce en los/as pacientes que la padecen un deterioro psicosocial importante que hace necesaria su rehabilitación en este ámbito (Kwakkenbos y cols., 2014).

3.3.1. Epidemiología

Forma parte de las llamadas enfermedades raras por su baja prevalencia. Afecta a 3 por cada 10.000 habitantes, más frecuente en mujeres que en hombres, siendo la proporción de 4:1. La edad más frecuente de aparición es entre la tercera y quinta década de la vida, aunque puede aparecer a cualquier edad (García-Serna, 2014).

Según determinadas etnias y zonas geográficas, hay una mayor frecuencia y expresión clínica distinta (Sánchez-Román y cols., 2010). En la raza negra, la esclerodermia es más frecuente, hay mayor proporción de hombres afectados, edad de aparición más precoz y predominio de formas difusas.

3.3.2. Factores etiológicos

La causa de la esclerosis sistémica es desconocida, pero los estudios actuales indican un origen multifactorial con la implicación de *factores genéticos* (alteraciones cromosómicas) y *factores ambientales* (aceite de colza adulterado, triptófano, sílice, cloruro de vinilo, y otras sustancias) para que la enfermedad se desencadene. Para desencadenar la aparición de la enfermedad son necesarias tanto una predisposición genética como agentes desencadenantes, produciendo alteraciones a tres niveles (García-Serna, 2014):

1. *Afectación vascular*
2. *Cambios inflamatorios*: acumulación de fibras de colágeno (fibrosis) y afectación del tejido conectivo (conectivopatía)
3. *Alteración autoinmune*: presencia de autoanticuerpos

3.3.3. Síntomas y signos clínicos

- A. Manifestaciones generales: Las manifestaciones generales de la esclerosis sistémica son falta de energía o cansancio, artralgias con o sin inflamación, mialgias con o sin pérdida de fuerza, hinchazón de manos y pérdida de peso.
- B. Síntomas cutáneos: Endurecimiento de la piel, dilatación de los vasos pequeños de la piel (sobre todo en la cara, cuello y manos), cambios en la pigmentación (las manos con el frío se vuelven excesivamente pálidas y después violáceas), depósitos de calcio en partes blandas donde normalmente no los hay (calcinosis) con tendencia a salir al exterior, favoreciendo la aparición de úlceras. Los cambios cutáneos en la cara pueden provocar, a veces, una piel tersa y sin arrugas, excepto peribucal, limitación de la apertura de la boca y afilamiento de nariz y labios.
- C. Fenómeno de Raynaud: Consiste en el cambio de coloración de los dedos de manos y pies debido al frío o al estrés, dando lugar a hinchazón de dedos, dolor, úlceras cutáneas de difícil cicatrización e incluso necrosis de la zona afectada (gangrena). El fenómeno de Raynaud se da con una frecuencia del 90 % de los casos.
- D. Alteraciones digestivas: Puede haber afecciones en cualquier parte del aparato digestivo, pero el esófago es la parte más afectada, debido a la transformación fibrosa de la pared y esfínter del mismo, dando lugar a: acidez y ardores (pirosis), disfagia o regurgitación de algunos alimentos. Otros síntomas de afección del tubo digestivo son: estreñimiento, diarrea o dificultad de absorción de los alimentos.

- E. Alteraciones pulmonares: Las principales afecciones pulmonares presentes en la SSc, son la fibrosis pulmonar e hipertensión pulmonar, causando dificultad para respirar (disnea) al realizar algún esfuerzo y tos.
- F. Alteraciones cardíacas: Las alteraciones del ritmo cardíaco (arritmias, taquicardias o bloqueos de rama) son las principales afecciones cardíacas junto con derrames pericárdicos y fibrosis miocárdica (que condicionan en gran medida el pronóstico y la calidad de vida del paciente).
- G. Alteraciones renales: Las alteraciones vasculares pueden afectar a los vasos sanguíneos del riñón, siendo la causa de una hipertensión arterial intensa y grave (crisis esclerodérmica) junto con insuficiencia renal y anemia hemolítica microangiopática.
- H. Síntomas psiquiátricos: La esclerosis sistémica es una enfermedad degenerativa que afecta tanto a la vida personal, laboral como social de la persona afectada, lo que puede causarle depresión, ansiedad, perturbación de sueño, disfunción sexual y alteraciones en la percepción de sí mismos y de su propio cuerpo por los cambios que se producen a nivel corporal (Thombs y cols., 2010).

En la Figura 7 podemos observar los principales signos y síntomas de la SSc.

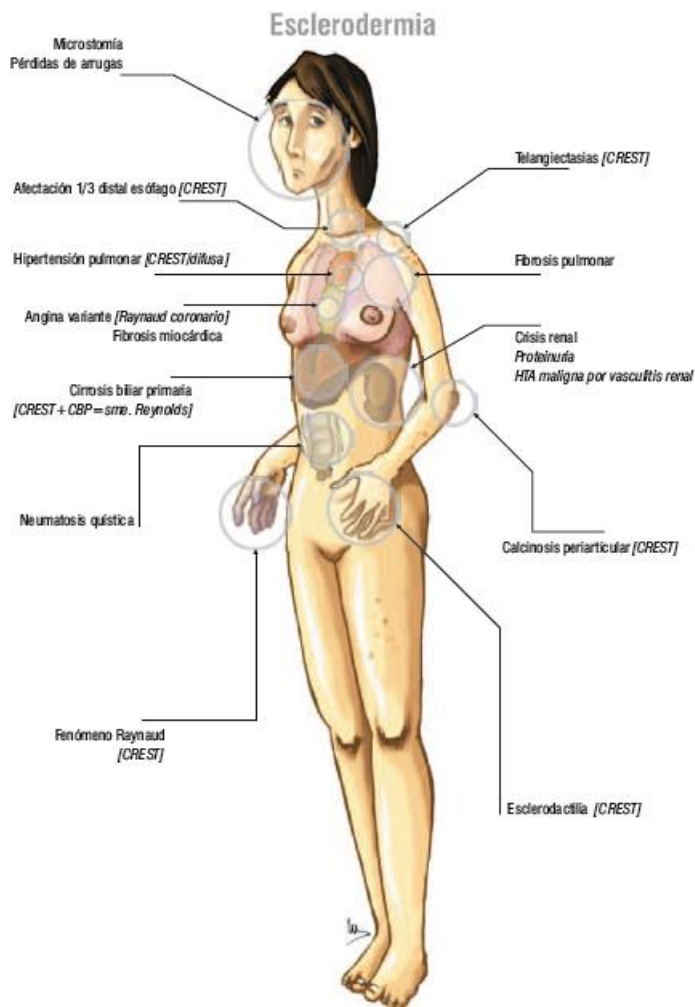


Figura 7: Síntomas y signos de la esclerodermia. Obtenido del Manual AulaMir, Colegio Oficial de Médicos de Granada (2015)

3.3.4. Diagnóstico

Los criterios diagnósticos propuestos por la Asociación Americana de Reumatología (ARA, 1980) para la esclerodermia son:

✓ Criterio mayor:

- Esclerodermia proximal.
- Engrosamiento, retracción e induración simétrica de la piel de los dedos y de la piel proximal a las articulaciones metacarpofalángicas. Los cambios pueden afectar a toda la extremidad, la cara, el cuello y el tronco (tórax y abdomen).

✓ Criterios menores:

1. Esclerodactilia: Los cambios indicados arriba, pero limitados a los dedos de las manos.
2. Cicatrices digitales o pérdida de sustancia de los pulpejos de los dedos: áreas deprimidas en las puntas de los dedos o pérdida de tejido en los pulpejos, como resultado de isquemia.
3. Fibrosis pulmonar basal bilateral: Patrón reticular de densidades lineales o lineonodulares bilaterales, más pronunciado en las porciones basales de ambos pulmones en un estudio radiológico de rutina, y que pueden tener la apariencia de moteado difuso o pulmón "en panal de abeja". Estos cambios no deben ser atribuibles a enfermedad pulmonar primaria.

Una persona tiene esclerosis sistémica si cumple el criterio mayor, o dos o más criterios menores.

3.3.5. Clasificación

Antes de hablar de los distintos tipos de SSc, debemos tener en cuenta que tanto la sintomatología, como la evolución y progresión de la enfermedad es muy variable (García-Serna, 2014).

Los dos tipos principales de SSc son la esclerodermia localizada y la esclerodermia sistémica.

A. Tipos de esclerodermia localizada (afecta sólo a la piel):

1. Morfea: Es la forma más común y afecta sólo a las capas más superficiales de la piel con disminución de la pigmentación o parches de piel abultada.
2. Morfea generalizada: Afecta a una superficie corporal mayor que la morfea, presentándose manchas más extensas.

3. Esclerodermia lineal: Es más frecuente en la infancia y adolescencia. Presenta una línea de piel abultada que aparece en piernas y brazos, pudiendo afectar al tejido subcutáneo y el músculo que está debajo.
4. Golpe de Sable (Coup de Sabre): Esclerodermia lineal de cara o cuero cabelludo que puede asociarse con anormalidades en el crecimiento de los huesos faciales.

B. Tipos de esclerodermia sistémica (afecta a los órganos internos):

1. Esclerosis sistémica cutánea limitada: Sus principales síntomas son la presencia del fenómeno de Raynaud de varios años de evolución, afectación cutánea limitada a cara, manos, pies y antebrazos, capilares periungueales dilatados, anticuerpos anticentrómero e incidencia de hipertensión arterial pulmonar tardía, con/sin calcificación cutánea, enfermedad gastrointestinal, síndrome de CREST o enfermedad intersticial pulmonar.
2. Esclerosis sistémica cutánea difusa: Se caracteriza por afectación cutánea troncal o acral, fenómeno de Raynaud seguido de cambios cutáneos edematosos de menos de un año de evolución, dilatación capilar periungueal (pérdida de capilares), anticuerpos anti-Scl-70 y anti-ARN-polimerasa-I, II o III y aparición temprana y significativa de afectación renal, fibrosis pulmonar, afectación gastrointestinal difusa y miocárdica.

3.3.6. Tratamiento

García-Serna (2014) expone los siguientes tratamientos para la esclerosis sistémica:

Tabla 3. Tipos de tratamiento de la esclerosis sistémica

Tratamientos	Componentes o alternativas
Farmacológico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vasodilatadores ▪ Anti-fibróticos ▪ Inmunosupresores
Estilo de vida	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cuidado de la piel: hidratación, curación de heridas, protección solar, etc. ▪ Protección contra el frío (usar guantes y calcetines gruesos en invierno) y cambios bruscos de temperatura ▪ Evitar el estrés ▪ Higiene bucal ▪ Prohibido fumar ▪ Estiramientos musculares, masajes, fisioterapia, evitar inmovilización de articulaciones
Otros	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS): técnica terapéutica de electroestimulación transcutánea de los nervios para controlar el dolor ▪ Terapia con células madre adultas

Una característica común a todas las enfermedades autoinmunes es el efecto exacerbador que tiene el estrés psicológico en la sintomatología de las mismas. En el siguiente apartado vamos a mostrar de forma más detallada la estrecha relación entre el estrés psicológico y la autoinmunidad, así como del papel exacerbador del estrés en la sintomatología clínica de las enfermedades autoinmunes, y de forma más específica en: lupus, síndrome de Sjögren y esclerosis sistémica.

3.4. AUTOINMUNIDAD Y ESTRÉS

Actualmente, el interés en la relación entre estrés y enfermedades autoinmunes es cada vez mayor (McCray y Agarwal, 2011). Diferentes revisiones y estudios muestran la relación del estrés psicológico con factores tanto hormonales como etiológicos en la patogenia de la enfermedad autoinmune (Herrmann, Sholmerich, y Straub, 2000; Huerta, Kowal, DeGiorgio, Volpe, y Diamond, 2006; Jessop, Richards, y Harbuz, 2004; Sapolsky, Romero, y Munck, 2000; Shepshelovich y Shoenfeld, 2006; Shoenfeld y cols., 2008).

3.4.1. ESTRÉS PSICOLÓGICO Y LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Multitud de estudios avalan el efecto devastador que tiene el estrés psicológico en el lupus. Los principales resultados encontrados por estos estudios muestran que el estrés cotidiano (diario) y no los eventos vitales estresantes se relacionan con el empeoramiento de la sintomatología lúpica. Además, se ha comprobado que las fluctuaciones en la cantidad de estrés y su interacción con el gen 5-HT1A-1019G alelo, son las que en mayor grado se relacionan con dicho empeoramiento, y no tanto un alto estrés mantenido durante mucho tiempo. Por otro lado, se ha comprobado que ante situaciones de estrés psicológico, se produce una alteración en el patrón de respuesta inmunológica en pacientes con LES. Diversos estudios han mostrado que, mediante la terapia de afrontamiento al estrés, los pacientes no solo mejoraban psicológicamente sino también se encontró una disminución de síntomas de la enfermedad y un incremento de calidad de vida (Navarrete-Navarrete y cols., 2010).

En la Tabla 4, presentamos los principales resultados llevados a cabo para comprobar el efecto del estrés en el lupus.

Tabla 4. Estudios sobre los efectos del estrés psicológico en lupus

Autores	Muestra	Tipo de estudio	Medidas/Conclusiones
Wekking, Vingerhoets, Van Dam, Nossent, y Swaak (1991)	n=21 LES n=20 AR	(9 evaluaciones en intervalos de 6 semanas)	<ul style="list-style-type: none"> - Se midieron problemas cotidianos y el impacto de aspectos físicos y psicosociales de la enfermedad. - Poca correlación entre estrés, calidad de vida y variables biológicas. - Número e intensidad de los problemas cotidianos fueron correlacionados con el estado físico y psicosocial en pacientes con LES que en pacientes con artritis reumatoide (AR).
Adams, Dammers, Saia, Brantley, y Gaydos (1994)	n=41 LES	Prospectivo (evaluación diaria durante 56 días)	<ul style="list-style-type: none"> - Se hicieron regresiones para evaluar la relación entre el estrés, la depresión, la ansiedad, la ira y quejas de los síntomas de LES. - Mayor variabilidad interindividual entre estrés y estado de salud física y psicosocial. - Distinción entre pacientes que responden al estrés y no responden. - El efecto del estrés diario sobre el estado de salud fue más significativo que el estrés producido por eventos vitales mayores.
Dobkin y cols. (1998)	n=44 LES	Transversal	<ul style="list-style-type: none"> - Se usaron los siguientes cuestionarios: SCL-90-R, Escala de Estrés Cotidiano, Lista de Evaluación de Apoyo Interpersonal y SF-36. - El nivel de estrés y el apoyo social percibido predijeron el malestar psicológico, el componente físico y la calidad de vida.

			- El malestar psicológico fue responsable en gran parte de la actividad de la enfermedad.
Da Costa y cols. (1999)	n=42 LES	Prospectivo (al inicio y 8 meses después)	<ul style="list-style-type: none"> - Se usó la Escala de Experiencias Vitales, Escala de Estrés Cotidiano e Inventario de Depresión de Beck. - El estrés causado por los acontecimientos negativos fue el principal determinante a corto plazo de la incapacidad funcional del LES. - Necesario un tratamiento integral del LES, que incluya el manejo del estrés.
Pawlak y cols. (1999)	n=15 LES n=15 controles	Prospectivo (antes, inmediatamente después y 1 hora después de una tarea de hablar en público)	- Diferencias en las respuestas inmunológicas producidas por estrés psicológico entre LES y sanos.
Jacobs y cols. (2001)	n=9 AR n=7 LES n=15 controles	Prospectivo (antes, durante y después de una tarea de hablar en público)	- Diferencias en las respuestas inmunológicas producidas por estrés psicológico entre pacientes con AR y LES con respecto a las mujeres sanas.

			<ul style="list-style-type: none">- Cambios en los patrones de citoquinas pueden ser responsables de la exacerbación inducida por el estrés de la actividad de la enfermedad en pacientes con AR y LES.
Ward, Marx, y Barry (2002)	n=23 LES	Prospectivo (evaluaciones cada 2 semanas durante 9 meses)	<ul style="list-style-type: none">- Se utilizó la Escala de Depresión (CES-D), la subescala Ansiedad/Rasgo del Inventario Ansiedad-Estado-Rasgo (STAI) y Escala Analógica Visual para evaluación global de la actividad del LES.- Cambios paralelos entre las puntuaciones de ansiedad y depresión y las evaluaciones de la actividad del LES.- La angustia psicológica no provoca aumento de la actividad del LES.
Peralta-Ramírez y cols. (2004)	n=58 LES	Prospectivo (6 meses)	<ul style="list-style-type: none">- Se utilizó la Escala de Eventos Vitales Estresantes y Escala de Estrés Cotidiano.- El estrés cotidiano (y no los eventos vitales estresantes) produce un empeoramiento de la sintomatología clínica percibida por las pacientes con LES.- Este aumento podía durar hasta 2 días, estando asociado a una mayor actividad lúpica.

Peralta- Ramírez y cols. (2006)	n=21 LES	Prospectivo (6meses)	<ul style="list-style-type: none"> - Se evaluó el estrés diario, ansiedad, depresión, atención y memoria. - Estrés diario se relaciona con alteraciones en la memoria visual, la fluidez y la atención en los pacientes con LES.
Birmingham y cols. (2006)	n=77 LES	Prospectivo (cada 2 meses)	<ul style="list-style-type: none"> - Se utilizó la Escala de Estrés Percibido y se hicieron análisis de sangre. - El estrés ambiental (fluctuaciones de la tensión personal) y un factor genético relacionado con el estrés (el 5-HT1A -1019G alelo) actúan en conjunto como factores de riesgo de brotes en pacientes con LES que tienen manifestaciones renales.
Navarrete- Navarrete y cols. (2010)	n=45 LES	Terapia cognitivo- conductual	<ul style="list-style-type: none"> - Se evaluaron estrés, ansiedad y depresión, actividad de la enfermedad y brotes, calidad de vida y se recogieron muestras de sangre. - La terapia cognitiva-conductual es eficaz en el tratamiento con lupus y altos niveles de estrés diario. - Reduce significativamente la incidencia de trastornos psicológicos asociados con el lupus así como produce mejora. - Mantiene la calidad de vida de los pacientes.
Takahashi y cols. (2014)	n=160 LES n=660 controles	Estudio de casos	<ul style="list-style-type: none"> - Se midió el estrés diario y hábito de fumar. - Estrés psicológico diario y fumar son posibles factores de riesgo de padecer LES.

Williams, Bruner, Penfield, Kamen, y Oates (2014)	n=30 LES	Intervención psicoeducacional: batería completa psicosocial, de calidad de vida y las medidas de cambio de comportamiento	<ul style="list-style-type: none">- Entre las medidas que incluía la batería, se evaluó ansiedad, depresión, autoeficacia en lupus, gestión de los síntomas cognitivos y alteración de la salud.- Reducciones significativas de estrés y depresión como resultado de la participación en el taller.- Las mejoras se asociaron positivamente con mejora de hábitos saludables.
Jung, Nam, Kim, y Suh (2015)	n=100 LES	Prospectivo (4-5 meses de seguimiento)	<ul style="list-style-type: none">- Se utilizó el Inventario de Depresión de Beck, Escala de Estrés Percibido, y se analizó la α-amilasa en saliva.- No se correlaciona el estrés percibido con actividad de la enfermedad; sin embargo, los síntomas empeoran varios meses después de sufrir niveles elevados de estrés percibido.

3.4.2. ESTRÉS PSICOLÓGICO Y SÍNDROME DE SJÖGREN

Las principales conclusiones que podemos extraer de los pocos los estudios que hay actualmente sobre estrés y síndrome de Sjögren son:

- Antes del inicio de la enfermedad, los niveles de estrés psicológico de los/as pacientes son elevados y están causados por: sucesos vitales negativos, experiencias adversas en la infancia y/o ausencia de estrategias de afrontamiento adaptativas.
- Pacientes con SS presentan mayor tasa de trastornos psicológicos comparados con pacientes con LES y personas sanas.
- Pacientes con SS suelen presentar dificultades de adaptación a sucesos vitales estresantes, siendo un factor de riesgo de padecer trastornos mentales.

En la Tabla 5 presentamos los principales estudios llevados a cabo para comprobar el efecto del estrés en el síndrome de Sjögren y sus conclusiones.

Tabla 5. Estudios sobre los efectos del estrés psicológico en el síndrome de Sjögren

Autores	Muestra	Tipo de estudio	Medidas/Conclusiones
Andersson, Manthorpe, y Theander (2001)	n=69 SS	Estudio de casos	<ul style="list-style-type: none"> - Se evaluaron la aparición y gravedad de factores de estrés biopsicosociales percibidos por los pacientes. - Síntomas propios del SS (como sequedad ocular o bucal) son percibidos como factores estresantes por los pacientes; en mayor medida por mujeres que por hombres, y en pacientes con menor nivel educativo en comparación a pacientes con mayor nivel educativo.
Karaiskos, y cols. (2009)	n=47 SS n=35 linfomas n=120 controles	Retrospectivo	<ul style="list-style-type: none"> - Se evaluó la ocurrencia de eventos estresantes mayores y menores, estrategias de afrontamiento y apoyo social antes de la aparición de la enfermedad. - Antes de la aparición de la enfermedad, los pacientes con SS experimentan elevado estrés psicológico debido a: <ul style="list-style-type: none"> ✓ eventos vitales negativos ✓ la ausencia de estrategias de afrontamiento adaptativas y satisfactorias. - La falta de apoyo social es otro factor de riesgo de desarrollo de la enfermedad.
Hyphantis, Mantis, Voulgari,	n=40 SS n=56 LES n=80 controles	Estudio de casos	<ul style="list-style-type: none"> - Se usaron el SCL-90-R, el Cuestionario de Estilo de Defensa, el Cuestionario de Ambivalencia Emocional y el Cuestionario de Calidad de Vida relacionada con la Salud.

Tsifetaki, y Drosos (2010)			<ul style="list-style-type: none">- Pacientes con SS presentan mayores tasas de trastornos psicológicos en general en comparación con LES y los controles.- La somatización fue más prominente en las SS que en LES o controles.- Los pacientes con SS presentan dificultades psicológicas específicas en la adaptación a factores estresantes vitales.- El perfil defensivo subyacente y de capacidad de respuesta de estos pacientes, se asocia de forma independiente con la evolución del SS.
Shelomkova y cols. (2013)	n=50 SS ingresadas	Estudio de casos	<ul style="list-style-type: none">- Se evaluó severidad de la depresión, ansiedad, estrés percibido y fatiga.- Pacientes con SS tienen mayor tasa de riesgo a padecer trastornos mentales causados por factores estresantes vitales y experiencias adversas en la infancia.- Los resultados apoyan el modelo de diátesis-estrés de los trastornos mentales en pacientes que sufren SS.

3.4.3. ESTRÉS PSICOLÓGICO Y ESCLEROSIS SISTÉMICA

Son pocos los estudios que existen sobre los efectos del estrés en la esclerosis sistémica, pero todos coinciden en que el estrés psicológico es un factor de riesgo del inicio y exacerbación de la enfermedad (Tabla 6); al igual que ocurre en el lupus y el síndrome de Sjögren.

Tabla 6. Estudios sobre los efectos del estrés psicológico en la esclerosis sistémica

Autores	Muestra	Tipo de estudio	Medidas/Conclusiones
Chen, Huang, Qiang, Wang, y Han (2008)	n=40 SSc n=40 controles	Retrospectivo	- Se evaluaron los sucesos vitales recientes mediante la entrevista semiestructurada de Paykel. - Relación fuerte entre eventos vitales estresantes e inicio de esclerosis sistémica.
Hui, Johnston, Brodsky, Tafur, y Kim Ho (2009)	n=113 SSc	Restrospectivo	- El estrés está involucrado en el inicio, desarrollo y exacerbación de la enfermedad.
Matsuura y cols. (2011)	n=17 SSc n=38 controles	Prospectivo (Tarea estresante de cálculo mental)	- Se midieron niveles séricos hormonales relacionados con el estrés y citoquinas, sucesos estresantes recientes y calidad de vida. - Alteración en los patrones de respuestas neuroendocrino e inmunitarios a causa del estrés psicológico.
Newton, Thombs y Groelau (2012)	n=16 SSc	Estudio de casos	- Mediante entrevista los/as pacientes informaron sobre cuestiones relacionadas con el estrés y la enfermedad. - Algunas pacientes manifiestan que el estrés puede exacerbar la enfermedad.

Resumidos los principales estudios que muestran los efectos del estrés psicológico en estas enfermedades autoinmunes. A continuación vamos a explicar el proceso que relaciona el estrés y la autoinmunidad.

3.4.4. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL EFECTO DEL ESTRÉS EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

En el capítulo I, se expuso el papel fundamental que tienen los sistemas neuroendocrinos hipotálamo-hipófiso-corticosuprarrenal y médulosuprarrenal, en la respuesta fisiológica al estrés. Según Labrador y cols. (1995), la activación de glucocorticoides produce una inhibición de la inmunidad celular que da lugar a:

- supresión de la proliferación de linfocitos T.
- liberación de interlucina-1 (responsable del desarrollo de los linfocitos).
- liberación de catecolaminas que estimulan la liberación de células T supresoras.
- liberación de noradrenalina que inhibe el tejido linfático (encargado de producción de linfocitos).
- liberación de interlucina-6 (hormona proinflamatoria).

La secreción de hormonas neuroendocrinas provocadas durante el estrés puede conducir a una desregulación inmune o producción alterada y amplificada de las citoquinas dando lugar a la enfermedad autoinmune. Las sustancias transmisoras del sistema inmune-neuroendocrino son: epinefrina, norepinefrina, acetilcolina, sustancia P, péptido intestinal vasoactivo, glucagón, insulina, citoquinas, factores de crecimiento y otros numerosos mediadores. La respuesta al estrés y la inducción de una desregulación en el equilibrio de las citoquinas pueden desencadenar una disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal y del sistema nervioso simpático. Trastornos en la función inmune están mediados por el sistema neuroendocrino-inmune debido a la sobreproducción de neuropéptidos y citoquinas. Las múltiples funciones de las células Th2 (células T auxiliares tipo 2) en el mantenimiento de la inflamación y la alteración del equilibrio entre Th1 (células T auxiliares tipo 1) y las respuestas Th2 presentan un importante mecanismo de inflamación y daño tisular (Brickman y Shoenfeld, 2001; Frieri,

2003; Shepshelovich y Shoenfeld, 2006; Shoenfeld y cols., 2008; Shoenfeld e Isenberg, 1989; Stojanovich, 2010).

Distintas hipótesis plantean que la interacción bidireccional alterada entre el sistema nervioso, inmune y endocrino es la causante de varias enfermedades endocrinológicas autoinmunes (Brickman y Shoenfeld, 2001; Shoenfeld y cols., 2008; Shoenfeld e Isenberg, 1989; Stojanovich y Marisavljevich; 2008; Tsatsoulis, 2006; Stojanovich, 2010).

Los niveles altos de glucocorticoides y catecolaminas segregados por una situación de estrés prolongada, producen la supresión del sistema inmune. Sin embargo, esta inmunosupresión ampliamente demostrada, no tiene sentido filogenéticamente puesto que si la finalidad de la respuesta al estrés es preparar al organismo para defenderse frente a una posible amenaza, es contradictorio que este actúe suprimiendo su mayor sistema de defensa que es el sistema inmune. De este modo, cuando el estrés es más prolongado, las glándulas suprarrenales segregan glucocorticoides en cantidades excesivas que pueden afectar al sistema inmune, haciéndolo más vulnerable a la enfermedad (Robles-Ortega y Peralta-Ramírez, 2010).

Hipótesis de Munck

Munck y Náray-Fejes-Tóth (1994) plantean un modelo avalado por distintas investigaciones (Salpolsky, Romero y Munck, 2000) donde explican por qué se produce la supresión del sistema inmune durante el estrés.

Durante los primeros minutos (treinta aproximadamente) posteriores a la aparición de un agente estresante, la inmunidad no se suprime uniformemente, hecho que sucede en todos los ámbitos de inmunidad, sobre todo en la inmunidad innata. Esto tiene sentido, aunque resultara útil que se activaran partes de nuestro sistema inmune que produzcan anticuerpos que nos protejan a lo largo de las siguientes semanas; tiene más sentido que se activen partes del sistema inmune que nos ayuden en el mismo momento que aparece el agente estresante. Cuantas más células inmunes sean liberadas por el torrente sanguíneo y por el sistema dañado,

más células inflamatorias se infiltrarán, teniendo en cuenta que los linfocitos son los que mejor liberan y responden a los transmisores inmunes.

Además, este aumento de la inmunidad no se produce únicamente ante la aparición de un agente infeccioso, también con agentes estresantes físicos y psicológicos se produce una activación inmune temprana; por lo que con toda clase de agentes estresantes nuestras defensas se refuerzan (Bachen y cols., 1995). Sin embargo, si los agentes estresantes se mantienen, bajan los niveles de inmunidad a niveles incluso del 40-70 % por debajo de la línea base (Salpolsky, 2008). Es decir, cuando el estrés prolonga la permanencia de los glucocorticoides y la activación del sistema simpático, comienza a tener el efecto opuesto, dando lugar a la supresión de la inmunidad. Cuando el sistema inmune se activa de forma crónica empieza a confundir parte de uno mismo como elemento invasor, generando autoinmunidad (Salpolsky, 2008).

Según la hipótesis de Munck (Munck y Náray-Fejes-Tóth (1994), cuando hay una adecuada secreción de glucocorticoides, se produce un aumento de la inmunidad innata, como respuesta adaptativa al estrés; sin embargo, en situaciones en las que no hay una inmunosupresión adecuada, no se restablecen los niveles basales inmunológicos, produciendo autoinmunidad debido a una desregulación entre el SNS y el eje HHA. Por tanto, si el sistema inmune no desciende, regresando a su línea base, corremos el riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune (Heim, Ehlert, y Hellhammer, 2000).

Diferentes estudios afirman que a causa del estrés se altera el eje HHA, produciendo resistencia a los glucocorticoides y un desequilibrio de las citoquinas, que explicaría las recaídas de las enfermedades autoinmunes y secreción inadecuada de cortisol (Deleaux, Chamoux, y Aumaître, 2013; Silverman y Sternberg, 2012; Van der Goes y cols., 2012; Shalimar, Deepak, Bhatia, Aggarwal, y Pandey, 2006). Sin embargo, en un estudio actual de Finan y Zautra (2013) en artritis reumatoide (AR), los resultados no muestran estos desequilibrios. Esto podría explicarse a través del estudio de Straub (2014), donde la activación del eje HHA en pacientes

con AR era similar a personas sanas, pero en realidad no debería ser así puesto que son pacientes con inflamación. Por este motivo el sistema nervioso simpático para compensar, se activa de forma crónica, por lo que hay una desincronización entre ambos ejes. Además Straub, Cutolo, Buttgereit, y Pongratz (2010), proponen que existe una energía reguladora de control neuroendocrinoinmunológico, que media entre los ejes de respuesta.

Por otro lado, la hipótesis expuesta por Munck ha sido verificada en, al menos, tres ámbitos (Salpolsky, Romero, y Munck, 2000):

1. Bloqueando artificialmente los niveles de glucocorticoides en ratas y luego estresándolas, se produce una activación del sistema inmune mediada por la adrenalina (no por glucocorticoides), aumentando el riesgo de que las ratas desarrollen una enfermedad autoinmune.
2. Casos en los que se ha extirpado una de las glándulas renales (fuente de glucocorticoides) por un tumor, los niveles de éstos descienden a la mitad durante un tiempo, en el que hay más probabilidad que la persona desarrolle una enfermedad autoinmune o inflamatoria.
3. Conjuntos de ratas o pollos que desarrollan espontáneamente enfermedades autoinmunes, tienen alguna alteración en su sistema glucocorticoide, con niveles de la hormona por debajo de lo normal o células inmunes e inflamatorias menos sensibles a los glucocorticoides.

Dos situaciones que aumentan el riesgo de autoinmunidad son, las continuas subidas y bajadas que mantienen al sistema inmune en alto, y tener una subida de inmunidad no seguida de una correcta secreción de glucocorticoides.

Extrapolando el modelo de Munck a los dos ejes de respuesta al estrés (adrenomedular y HHA) en personas con enfermedades autoinmunes, se produce una desregulación de ambos

ejes, teniendo una activación normal o incluso mayor del eje adrenomedular (promovido por la adrenalina y noradrenalina) y una respuesta menor o más tardía del eje HHA.

Efectos del estrés psicológico en las enfermedades autoinmunes

“El estrés psicológico puede tener un papel destacado en las enfermedades sistémicas. Su impacto puede ser devastador en la medida en que los efectos físicos que producen no son evidentes en un principio, sino que son percibidos por la persona cuando aparecen manifestaciones físicas no deseables.” (Navarrete-Navarrete, 2006, p. 34).

Podemos afirmar, por tanto, que el estrés empeora la sintomatología de las enfermedades autoinmunes (Stojanovich, 2010).

Robles-Ortega y Peralta-Ramírez (2010), tras el análisis de numerosos estudios llevados a cabo en la mayoría de las enfermedades autoinmunes y con estresores diferentes (eventos vitales de gran intensidad, estrés cotidiano, estrés inducido químicamente, etc.), llegan a la conclusión de que “el estrés psicológico en algunos casos precipita y en la mayoría de los casos da lugar a un empeoramiento de las enfermedades autoinmunes”. (p. 44)

A nivel general, esta afirmación está avalada por diferentes revisiones teóricas llevadas a cabo por Harbuz, Richards, Chover-González, Marti-Sistac, y Jessop (2006), Jessop, Richard, Harbuz (2004), y Stojanovich (2008, 2010).

Las distintas investigaciones interdisciplinares llevadas a cabo dentro del campo de la **psiconeuroinmunología** demuestran cada vez más la interrelación clínicamente relevante entre los factores de estrés psicológico y la aparición y progresión de las enfermedades crónicas (Stojanovich, 2010).

La psiconeuroinmunología incluye múltiples disciplinas científicas como la psiquiatría, psicología, endocrinología, neurología, inmunología y medicina interna; para investigar sobre las interacciones y consecuencias clínicas entre cerebro y sistema inmune (Solomon, 1998).

Tres conclusiones básicas a las que se llega a través de esta disciplina son (Navarrete-Navarrete, 2006):

- ✓ La respuesta inmunológica está modulada por el sistema nervioso y en situaciones de estrés se liberan citoquinas (IL-1, IL-6, IL-4, IL-10, TNF-alfa).
- ✓ La respuesta inmunológica está modulada por el sistema endocrino, de manera que IL-1 e IL-2, favorecen el aumento de ACTH que inhibe la producción de IFN-gamma, alterando la función de los linfocitos B. Por otro lado, IL-6 e IL-1, favorecen la liberación de CHR estimulando la secreción de glucocorticoides, que junto con la ACTH y los opiáceos, disminuyen el número y la función de los linfocitos.
- ✓ El sistema inmunológico determina la función de los sistemas nervioso y endocrino, detectando la presencia de agentes patógenos y generando una respuesta de adaptación efectiva. El hipotálamo se activa al detectar el antígeno y el eje HHA se activa por el antígeno y las citoquinas ante una situación de estrés.

Todo esto hace necesario investigar sobre los mecanismos implicados en la respuesta al estrés de modo que expliquen el empeoramiento de los/las pacientes con enfermedades autoinmunes a casusa del estrés psicológico.

CAPÍTULO IV: “JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS”

4.1. JUSTIFICACIÓN

Como hemos visto en los capítulos anteriores, existen numerosos estudios que muestran el efecto devastador que tiene el estrés psicológico en las enfermedades autoinmunes. Además, se ha demostrado que la alteración en los ejes implicados en la respuesta al estrés, tiene importantes implicaciones en la autoinmunidad. Por un lado, la activación del eje adrenomedular, mediante la adrenalina, provoca un incremento en la función del sistema inmune. Por otro lado, la activación del eje HHA, mediante la secreción de glucocorticoides, actúa deprimiendo este sistema inmune para que no ataque al propio cuerpo, evitando así la autoinmunidad.

Sin embargo, aunque son numerosas las investigaciones que avalan las dos afirmaciones anteriores, no se ha llevado a cabo ningún estudio con el objetivo de analizar la activación de los dos ejes de respuesta al estrés psicológico en pacientes con patología autoinmune, en comparación con la activación de personas sanas.

Por tanto, nuestra hipótesis de partida es que el mecanismo psiconeuroinmunológico subyacente al empeoramiento de las enfermedades autoinmunes a causa del efecto del estrés psicológico, está determinado por una desregulación del eje adrenomedular y del eje HHA.

De este modo, cuando una persona con una enfermedad autoinmune se expone a una situación estresante, su sistema adrenomedular activa el sistema inmunológico. Posteriormente, si esta activación no se ve suprimida por un correcto disparo del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, el cual restablezca la función normal del sistema inmunitario; este sistema podría atacar al propio organismo, incrementando el riesgo de autoinmunidad y provocando un empeoramiento de los síntomas en los pacientes.

4.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Estudiar los mecanismos que expliquen el empeoramiento de la sintomatología de pacientes con enfermedades autoinmunes a causa del estrés psicológico.

Objetivos específicos

Para llevar a cabo el objetivo principal, se llevaron a cabo cinco estudios englobados en tres bloques que contienen los siguientes objetivos específicos:

BLOQUE I: Metodología

Este bloque está constituido por el estudio 1, actualmente publicado en una revista internacional. Este bloque resulta necesario para seleccionar la metodología más adecuada para la consecución de los siguientes estudios que forman parte del resto de bloques de la tesis. El objetivo específico del estudio de este bloque fue:

- ✓ **Objetivo específico 1:** Comprobar cuál de los dos protocolos de la TSST-RV (Gafas vs. Pantalla), producía mayor activación del sistema nervioso simpático y activación del eje HHA en personas sanas; para así determinar el protocolo a utilizar en estudios posteriores, tanto en personas sanas como en pacientes autoinmunes.

La hipótesis planteada fue que la TSST-RV mediante que la proyección de pantalla, produciría mayor activación del sistema simpático y del eje HHA.

El artículo está publicado en la revista *Behavior Research Methods* (Montero-López, E., Santos-Ruiz, A., García-Ríos, M.C., Rodríguez-Blázquez, R., Pérez-García, M. y Peralta-Ramírez, M.I., 2015).

BLOQUE II: Variables influyentes

En este bloque se realizaron dos estudios para investigar dos variables, una de ellas fue las fases del ciclo menstrual, que podrían influir en la secreción de los niveles de cortisol, y por tanto de la respuesta del eje HHA; la otra variable estudiada, no relacionada con el estrés pero

que podría afectar al rendimiento de las pacientes, fue el tratamiento farmacológico corticoideo para los síntomas de la enfermedad, el cual podría afectar a la función ejecutiva de estas pacientes.

En el estudio 2 de esta tesis doctoral, se comprobó en mujeres sanas, la influencia de las fases del ciclo menstrual tanto en los niveles de cortisol diario como en los niveles de cortisol en una situación de estrés (TSST-RV). En el estudio 3 de esta tesis, se investigó el efecto del tratamiento corticoideo sobre la flexibilidad cognitiva y toma de decisiones en mujeres con lupus. A continuación se presentan los objetivos específicos perseguidos en cada uno de estos estudios:

- ✓ **Objetivo específico 2:** Determinar si los niveles de cortisol durante el día de mujeres en distintas fases del ciclo menstrual se asociaba con la reactividad al estrés posterior en la tarea clásica de hablar en público adaptada a realidad virtual.

La hipótesis planteada fue que la activación del eje HHA, basada en sus niveles de cortisol diario, así como en el patrón de respuesta provocada por una situación de estrés de laboratorio, serían mayores en las mujeres que se encontraban en la fase lútea frente a las mujeres que se encontraban en la fase folicular.

La publicación científica de este estudio está en proceso de revisión por la revista *Anxiety, Stress and Coping* (Montero-López, E., Santos-Ruiz, A., García-Ríos, M.C., Rodríguez-Blázquez, M., y Peralta-Ramírez, M.I., 2016).

- ✓ **Objetivo específico 3:** Determinar los efectos del tratamiento corticoideo en la flexibilidad cognitiva y toma de decisiones de pacientes con LES.

La hipótesis planteada fue que pacientes con lupus bajo tratamiento corticoideo, tendrían menor flexibilidad cognitiva y peor toma de decisiones en comparación con pacientes con lupus sin tratamiento corticoideo y personas sanas.

Este estudio ha sido aceptado para su publicación, encontrándose *in press* en la revista *Lupus* (Montero-López, E., Santos-Ruiz, A., Navarrete-Navarrete, N., Ortego-Centeno, N., Pérez-García, M., y Peralta-Ramírez, M.I., 2016).

BLOQUE III: *Estrés y autoinmunidad*

Este bloque contiene los estudios 4 y 5 de la tesis. Los estudios de los bloques anteriores, nos han proporcionado por un lado, la metodología a seguir y por otro lado, las variables a tener en cuenta para investigar el comportamiento de los dos ejes implicados en la respuesta al estrés, tanto en personas autoinmunes como en personas sanas.

El estudio 4 consistió en el análisis de los niveles de cortisol a corto y largo plazo de pacientes autoinmunes y personas sanas. Por último, en el estudio 5 se comprobó si había diferencias en la activación de los dos ejes de respuesta al estrés de personas con enfermedad autoinmune con respecto a personas sanas. Los objetivos específicos de estos estudios se presentan a continuación:

- ✓ **Objetivo específico 4:** Estudiar si existen diferencias en la activación del eje HHA entre mujeres con enfermedades autoinmunes y mujeres sanas a dos niveles: mediante el cortisol en saliva durante un día, como medida transversal y mediante el cortisol en pelo, como medida retrospectiva de estrés crónico.

La hipótesis planteada fue que los niveles de cortisol en saliva y en pelo entre pacientes autoinmunes y personas sanas, estarían alterados en las pacientes autoinmunes, debido a una alteración del eje HHA.

La publicación científica de este estudio está en proceso de revisión por la revista *Psychosomatic Medicine* (Montero-López, E., Santos-Ruiz, A., González, R., Navarrete-Navarrete, N., Ortego-Centeno, N., Martínez-Augustín, O., Rodríguez-Blázquez, M., y Peralta-Ramírez, M.I., 2016).

✓ **Objetivo específico 5:** Identificar diferencias en la activación psicofisiológica y neuroendocrina de la respuesta al estrés en pacientes autoinmunes y personas sanas. De este objetivo, se derivan los siguientes sub-objetivos:

✓ 5.1. Estudiar si existen diferencias en la respuesta del sistema nervioso simpático de pacientes autoinmunes con respecto a personas sanas, en una situación de estrés de laboratorio.

La hipótesis planteada fue que pacientes autoinmunes presentarían una activación similar del sistema nervioso simpático que las personas sanas en la respuesta al estrés en una situación de laboratorio.

✓ 5.2. Estudiar si existen diferencias en la respuesta endocrina del eje HHA de pacientes autoinmunes con respecto a personas sanas, en una situación de estrés de laboratorio, medida a través de los niveles de cortisol en saliva.

La hipótesis planteada fue que pacientes autoinmunes presentarían una menor activación del eje HHA que las personas sanas en respuesta al estresor.

La hipótesis que sustenta el objetivo específico 5 fue que pacientes autoinmunes presentarían una activación similar del sistema nervioso simpático a la de las personas sanas ante un estresor, pero una disminución de la activación del eje HHA, lo que demostraría la presencia de mecanismos alterados en la respuesta al estrés psicológico que explicarían el empeoramiento de la sintomatología en personas con enfermedades autoinmunes.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los mecanismos que expliquen el empeoramiento de la sintomatología de pacientes con enfermedades autoinmunes a causa del estrés psicológico.

BLOQUE I: Metodología	Objetivo 1: Comparar los protocolos de TSST-RV.	Estudio 1: A virtual reality approach to the Trier Social Stress Test: Contrast of two distinct protocols
BLOQUE II: Variables influyentes	Objetivo 2: Analizar la influencia de las fases del ciclo menstrual en los niveles de cortisol diario y frente a un estresor.	Estudio 2: The relationship between the menstrual cycle and cortisol secretion: Daily and stress-invoked cortisol patterns
	Objetivo 3: Determinar los efectos del tratamiento corticoideo en la flexibilidad cognitiva y toma de decisiones de pacientes con lupus.	Estudio 3: The effects of corticosteroids on cognitive flexibility and decision-making in women with lupus
BLOQUE III: Estrés y autoinmunidad	Objetivo 4: Identificar diferencias en los niveles de cortisol en saliva y pelo en pacientes autoinmunes y personas sanas.	Estudio 4: Analyses of hair and salivary cortisol for evaluating hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in patients with autoimmune disease
	Objetivo 5: Identificar diferencias en la activación psicofisiológica y neuroendocrina de la respuesta al estrés de pacientes autoinmunes y personas sanas.	Estudio 5: Mecanismos explicativos del empeoramiento de pacientes autoinmunes a causa del estrés psicológico.

CAPITULO V: “ESTUDIO 1”

A virtual reality approach to the Trier Social Stress Test: Contrasting two distinct protocols

Montero-López, E., Santos-Ruiz, A., García-Ríos, M.C., Rodríguez-Blázquez, R., Pérez-García, M., & Peralta-Ramírez, M.I. (2016). A virtual reality approach to the Trier Social Stress Test: Contrasting two distinct protocols. *Behavior Research Methods*, 42, 223-232.
doi: 10.3758/s13428-015-0565-4 (Anexo I)

“A virtual reality approach to the Trier Social Stress Test: Contrasting two distinct protocols”

5.1. Introduction

The Trier Social Stress Test (TSST) is an experimental paradigm used as a tool in investigating the psychobiologic stress response in the laboratory, as it activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) (Kirschbaum, Pirke, & Hellhammer, 1993). The response is reflected in an increase in heart rate, blood pressure, and adrenaline and cortisol levels, as well as in a negative effect on mood (Al’Absi et al., 1997; Nicolson, Storms, Ponds, & Sulon, 1997). In the traditional TSST, as proposed by Kirschbaum et al. (1993), participants have to prepare a speech, claiming they are suitable for a given job appointment, articulate the speech in front of an audience, and subsequently complete an arithmetic task in public. The audience is generally composed of people who had been previously trained in neutral verbal and non-verbal behaviors (Foley & Kirschbaum, 2010). Vinkers et al. (2013) recorded psychophysiological variables to investigate the effects of stress on core and peripheral body temperature in humans. They used the TSST and obtained distinct response patterns in men (i.e., increased cheek temperature) and women (i.e., decreased nasal skin temperature).

The original TSST has been utilized, since its inception, to measure stress reactivity in diverse populations such as children (TSST-C; Buske-Kirschbaum et al., 1997), middle aged adults (Fiocco, Jooper, & Lupien, 2007), and retired people (Kudielka et al., 1998), as well as in various pathologies, such as psychiatric patients (Brenner et al., 2009), metabolic syndrome (Chrousos, 2000), systemic hypertension (Esler et al., 2008), systemic lupus erythematosus (Pawlak et al., 1999; Santos-Ruiz et al., 2010), and myalgias (Sjörs et al., 2010). Likewise, the TSST has been used to test the relationship between stress and a variety of psychological variables, such as depression (Parker, Schatzberg, & Lyons, 2003), social anxiety (Shirotsuki et al., 2009), and personality traits (Kirschbaum, Bartussek, & Strasburger, 1992; Pruessner et al., 1997).

The adaptation of the TSST into a virtual reality (VR) environment elicits a significant physiologic response, thus solving some of the common TSST limitations that come from constraints both in the design of different environments or set-ups and from the assembling of acceptably large audiences for each experimental session, given that the magnitude of the stress response depends in part on the size of the audience. An additional limitation results from the cost of TSST implementation, as it is necessary to have separate rooms for experimental subjects and audiences, a certain time is spent in training audience participants to show neutral behaviors in response to subjects' performance, and audiences may be unreliable and show distinct behaviors between one participant and another. Therefore, it would seem that the TSST in the virtual environment constitutes a viable alternative to the usual forms of presentation of stress tasks (Kotlyar et al., 2008).

Virtual reality tasks are increasingly used in the laboratory setting, given their convenience and efficacy in providing three-dimensional (3D) computerized environments and setups with which to study various pathologies and their associated responses (e.g., stress). In reviewing recent research on the application of VR to the treatment of mental disorders, Malbos, Boyer, and Lançon (2013) concluded that there was sufficient evidence to attest to the efficacy of this methodology in the assessment and treatment of distinct mental disorders.

In a related investigation, Kelly, Matheson, Martinez, Merali, and Anisma (2007) utilized the TSST-VR, as delivered by Virtually Better Inc., Atlanta, GA, in which a previously recorded virtual audience was presented in 3D. Results indicated that giving a speech and carrying out an arithmetic task in front of a virtual audience produced a significant increase in salivary cortisol (30 %), even though the increase was greater when both tasks were conducted in front of a real audience (90 %).

In their study, Kotlyar et al. (2008) demonstrated that the TSST-VR resulted in a physiologic response with significant increases observed in response to each stress task in

systolic and diastolic blood pressure and heart rate, a finding that suggests the TSST-VR constitutes a viable alternative to previous TSST methodologies, with the additional advantages of reducing variability in the mode of presentation, and decreasing human and financial costs.

Several studies have used the TSST-VR in recent years. For instance, Jönsson et al. (2010) used a CAVE™ system developed at the Electronic Visualization Laboratory of the University of Illinois in Chicago, which facilitates total immersion by means of a VR room, a head-tracking system, and passive stereoscopy. This study's main results center on the habituation of the various measures of sympathetic activity obtained in response to the second implementation of the TSST-VR. On the first performance of the TSST-VR there was an 88 % increase of salivary cortisol with respect to baseline levels, which was habituated in the second session.

Another version of the TSST-VR was implemented by Santos-Ruiz et al. (2010) by projecting a 3D virtual audience onto a screen. Results showed that this version of the TSSTVR resulted in significant sympathetic activation, as well as activation of the HPA axis in the majority of participants. It was, therefore, concluded that this form of the TSST-VR stimulated the main axes involved in the stress response.

Given the results obtained to date, it seems that the TSSTVR constitutes a useful technique in the study of the activation of the basic axes involved in the stress response. Considering the advantages of this way of presenting the TSST paradigm, it would be beneficial to further investigate which methodological variations produce greater or lesser immersion in the virtual environment, as we hypothesize that the level of immersion will determine the level of activation of the physiologic axes involved in the stress response. Additionally, it would be worthwhile to explore whether there are sex differences in the stress response brought about by the TSST-VR, as traditional TSST studies have shown that this task results in larger increases

of salivary cortisol in men than in women (Foley & Kirschbaum, 2010; Kirschbaum et al., 1993; Williams, Hagerly, & Brooks, 2004).

Annerstedt et al. (2013) carried out a pilot study in which a VR environment was used with two distinct objectives; first, producing physiologic stress by means of the TSST-VR, and, secondly, comparing physiologic recovery in different virtual environments after inducing the stress response. Their results showed that the TSST-VR activates the HPA axis and that recovery from the induced stress response varied as a function of the type of virtual environment to which participants were exposed.

Previous studies of the TSST in the virtual environment have differed in the way they projected 3D images, with some projecting images onto a screen and others using 3D goggles. Morina, Brinkman, Hartanto, and Emmelkamp (2014) examined levels of anxiety and sense of presence during exposure to two types of virtual environments: a head-mounted display (HMD) with motion tracker and stereoscopic view, and a one-screen projection-based VR display. Their results suggest that both VR displays were equally effective in evoking moderate levels of anxiety, although the HDM display appeared to produce a stronger sense of presence.

We have explored the potential differences between studies of the TSST-VR paradigm that have used goggles and those that have used a projection screen, and it appears that none of them show a conclusive advantage of using one method over the other in terms of activating the axes of the stress response. Thus, our objectives were twofold. First, we aimed to investigate which of two TSST-VR protocols induced greater sympathetic activation, as measured by skin conductance, and HPA axis activation, as measured by secretion of salivary cortisol. Both protocols included a 3D virtual audience but, while one was presented on a large screen, the other was presented by virtual goggles. A second objective in this study was to examine whether there were sex differences in the activation of either axis, as is the case in the traditional TSST, and whether they differed according to the two TSST-VR protocols.

5.2. Method

Participants

Forty-five students attending the University of Granada volunteered their participation in this study. They were divided into two groups, according to which protocol of the TSST-VR was used: 3D goggles or a large screen projection. The goggles group included 13 females and 11 males, with a mean age of 21.9 years ($SD = 5$) and 14 years of schooling on average ($SD = 0$). The screen group contained 15 females and six males, with a mean age of 20.4 years ($SD = 1.25$) and 14 years of schooling on average ($SD = 0$).

The following were the exclusion criteria, adopted because of their potentially negative effect on cortisol levels (Williams et al., 2004): hypertension, heart disease, obesity, clinical diagnosis of depression or anxiety, personality disorders, and substance use (i.e., amphetamines, methadone, barbiturates, or muscle relaxants). We also recorded sleep duration and excluded any participant that had not slept a minimum of 4 hours on the night prior to the experiment. Participants provided data on sleep duration as part of the semi-structured interview.

On arrival at the laboratory, participants were given information about the experiment and asked to sign an informed consent form approved by the Ethics Committee of the University of Granada and performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki. Immediately afterwards, they were administered the semi-structured interview.

Instruments

The questionnaires below provided meaningful covariates that could be used in statistical analyses of the psychophysiological measures and cortisol.

Semi-structured interview Including sociodemographic data, daily life and sleep habits, medication, menstrual cycle, and history of psychiatric or psychologic treatment.

Stress Vulnerability Inventory (SVI) (Beech, Burns, & Scheffield, 1986; Spanish adaptation, validated by Robles-Ortega, Peralta-Ramirez, & Navarrete-Navarrete, 2006). This instrument consists of 22 items and evaluates the individual's predisposition to be affected by perceived stress. The Spanish adaptation by Robles-Ortega et al. (2006) shows a Cronbach's alpha of 0.87. As for convergent validity, the results show a significant positive correlation ($p < 0.01$) with the following assessment scales: STAI-R, Beck Depression Inventory, Somatic Symptom Scale, and Survey of Recent Life Experiences (SRLE).

Perceived Stress Scale (PSS) (Cohen, Kamarak, & Mermeistein, 1983; Spanish adaptation by Remor & Carrobles, 2001) The PSS is a self-report scale used to evaluate perceived stress level and the degree to which people find their lives unpredictable, uncontrollable, or overwhelming (aspects that contribute to stress). It consists of 14 items with five response alternatives. The highest score corresponds to the highest perceived stress level. The Spanish version of the PSS (14 items) has adequate reliability (internal consistency = 0.81 and test-retest = 0.73), concurrent validity, and sensitivity (Remor, 2006). Here, we have considered those scores over 22 (i.e., the mean score for the Spanish population; Remor & Carrobles, 2001) as reflecting high levels of perceived stress.

SCL-90-R Symptoms Inventory (Derogatis, 1994; Spanish adaptation by Gonzalez de Rivera & De las Cuevas, 1988) We used this instrument to rule out potential psychopathology in the participants. This self-report questionnaire was developed to assess symptoms of psychopathology and includes 90 items with five response alternatives (0–4) on a Likert scale. Subjects respond according to how they have felt within the past seven days, including the day the inventory is administered. The inventory is scored and interpreted according to nine main dimensions (somatization, obsessive-compulsive symptoms, interpersonal sensitivity,

depression, anxiety, hostility, phobic anxiety, paranoid ideation, and psychoticism) and three global indices of psychological distress (Global Severity Index [GSI], Positive Symptom Total [PS], and Positive Symptom Distress Index [PSDI]). In this study, we analyzed these last three global indices. This instrument is thought to have satisfactory reliability and validity (De las Cuevas et al., 1991).

Group Presence Questionnaire (IPQ; Schubert, Friedmann, & Regenbrecht, 2001) The IPQ is used to measure the sense of presence experienced in a virtual environment. The questionnaire was used to rule out the possibility that potential differences between groups could be attributable to variations in the sense of presence experienced by participants within the virtual environment. IPQ responses range from -3 (=totally disagree) to +3 (=totally agree). The IPQ includes a total of 14 items, consisting of a global scale (with scores between -3 and 3) and three subscales: spatial presence (i.e., the sense of being physically present in the virtual environment), with scores between -15 and 15; involvement (i.e., the attention devoted to the virtual environment and the degree of involvement experienced), with scores between -12 and 12; and experienced realism (i.e., the subjective experience of realism in the virtual environment), with scores between -12 and 12. Reliability data are not yet available for the Spanish population.

Virtual reality version of the Trier Social Stress Test (TSST-VR) This is a virtual-reality adaptation of the traditional TSST. It includes a computer program that enables the design of a 3D audience, which can be projected into a set of VR goggles (eMagin Z800 3DVisor) with a viewing equivalent of a 105-in diagonal movie screen viewed at 12 ft, with a 40° field of view and stereoscopic image with a 800 × 600 triad pixels per display (<http://www.3dvisor.com/>) connected to a computer or, alternatively, can be projected onto a screen.

Pertaub, Slater, and Barker (2002) showed that participants that are exposed to three virtual audiences whose behavior is different toward the speaker (i.e., neutral, positive, or

negative) generate distinct responses in the speaker. In the present study, all participants were exposed to the same type of audience, in identical VR and protocol conditions. Presentations were all stereoscopic, since Ling, Brinkman, Nefs, Qu, and Heynderickx (2012) had shown that stereoscopic VR presentations improved the sense of spatial presence in the case of public speaking. Sound volume and audience behavior were the same for all presentations.

World Viz (http://www.worldviz.com/industries/academic/neuroscience#Starter_Kit) was adopted as the software of choice, as it provides VR environments that can be integrated with fMRI signals, biologic responses, motion tracking input, and 3D rendering. The Vizard program, with its high-level scripting language, affords the creation of interactive 3D content and the integration of biologic signals. The screen was 2.21 m wide and 2.30 m high, with a 44° field of view and stereoscopic image of 1600 × 1200 triad pixels per display and a distance of 1.75 m from the participant.

Both VR delivery protocols require that participants wear earphones to listen to the sounds coming from the virtual environment, as well as a microphone to mislead them into thinking that their speech will be recorded and thus enhance the threatening effect of the social evaluation component and the participants' level of psychosocial stress. Once the participants were ready to start the experiment, they were informed that the task included four different phases. During the 3-min initial phase, participants were instructed to relax and remain still. This phase was designated as the period of psychophysiologic adaptation to the virtual environment (baseline of skin conductance). Under both experimental conditions, participants were seated. In the Screen Projection condition, they faced a screen showing a 3D image of a stage curtain, while in the Goggles condition, the same image was projected by means of virtual goggles. The second phase, labeled the anticipatory stress period, lasted 5 min, during which participants were required to prepare a speech, describing their positive and negative traits, to be delivered in front of the virtual audience. The third phase, also of 5 min in duration, was

called the speech delivery period. During this period, the curtain came up, the virtual audience appeared (Fig. 1), and participants had to begin delivering their speeches. They were instructed to speak for the entire 5 min without interruption and attend to the form and content of the speech, as they would greatly determine the audience's response to their speech. The end of the speech constituted the beginning of the last phase of the stressful task, the arithmetic task, based on the Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT) in which participants were asked to add two consecutive numbers (i.e., the number they just heard and the one that just preceded it), delivered by means of an auditory recording.

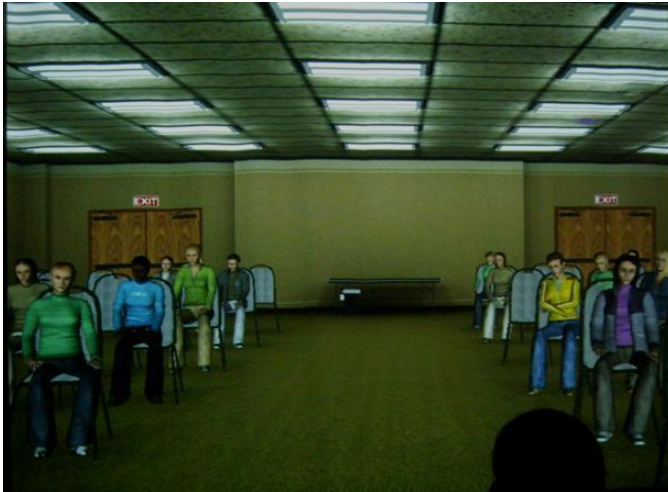


Figure 1: Three-dimensional virtual audience as projected onto a large screen

Procedure

The study was scheduled according to the diurnal cortisol curve, between 3:00 pm and 6:00 pm, when levels of salivary cortisol are more stable. Although cortisol levels are reportedly stable between 2:00 pm and 4:00 pm (Kudielka & Kirschbaum, 2005), Spanish metabolic and

circadian rhythms could differ from those of other European countries, due to the greater number of light hours and the distinctive schedule of meals. Therefore, following a pilot study, Santos-Ruiz et al. (2010) determined in a Spanish sample that cortisol levels were stable between 3:00 pm and 6:00 pm, so all participants were tested in the afternoon, within this temporal window. Once the participants arrived at the laboratory, they were given information about the experiment and a consent form to be read and signed. Afterwards, they were interviewed and completed the following questionnaires: SV, PSS, and SCL-90-R. Next, participants were fitted with electro-dermal electrodes to record their skin conductance responses at various time intervals (see assessment of the sympathetic reactivity section below). Immediately afterwards, the TSST-VR was explained to the participant, the first salivary cortisol sample (pre-exposure cortisol) was collected and the stressful task was started (anticipatory stress, a situation of speech delivery and arithmetic task). Right after the end of arithmetic task, the second cortisol sample (post-exposure cortisol) was collected and the degree of immersion into the VR environment was assessed by administering the IPQ. Ten and 20 min later, the third (post-exposure cortisol +10') and fourth (post-exposure cortisol +20') cortisol samples, respectively, were taken. Participants were given interior design magazines to leaf through in the interval between the third and fourth drawing of salivary cortisol. A diagram of the protocol of the TSST-VR is shown in Fig. 2.

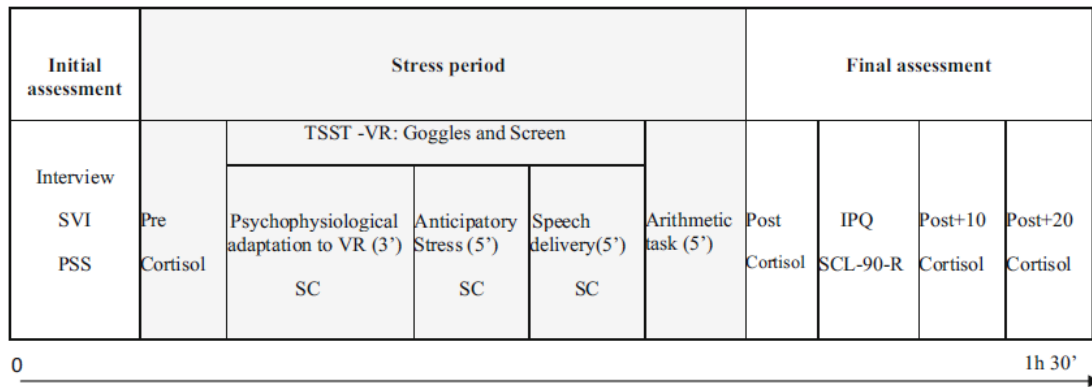


Figure 2: Diagrammatic representation of the protocol of a virtual reality adaptation of the Trier Social Stress Test (TSST-VR). *Note:* SVI: Stress Vulnerability Inventory; PSS: Perceived Stress Scale; TSST -VR: Trier Social Stress Test adapted to Virtual Reality; Pre-cortisol: pre-exposure cortisol; Post-cortisol: post-exposure cortisol; Post +10 cortisol: cortisol at 10 min after exposure; Post +20 cortisol: cortisol at 20 min after exposure; SC: skin conductance; IPQ: Igroup Presence Questionnaire; SCL- 90-R: Symptom Checklist SCL-90R

At the end of the experiment, participants are told that their speech has not been recorded and that the objective of the procedure was to elicit a stress response and not to have their performance evaluated in the speech and arithmetic tasks.

Assessment of the physiologic axes involved in the stress response

Assessment of the sympathetic reactivity

Skin conductance was recorded by means of two standard-size Ag/AgCl electrodes, with isotonic electrolyte gel placed on the palm of the non dominant hand. Subsequently, data were recorded during visualization of the virtual scenarios, and consisted of a 3-min baseline period prior to the TSST-VR (period of psychophysiological adaptation to the virtual environment) and continued recording throughout the anticipatory stress (5 min) and speech delivery (5 min) periods. Recording of skin conductance ended right after the conclusion of the speech delivery task (see Fig. 2). Since one of the aims of the study was to test the sympathetic reactivity evoked during the speech delivery task under the two experimental conditions, we chose to record measures of skin conductance because they provided a measure of sympathetic reactivity during

the speech delivery task that was faster than that of the HPA axis in the presence of threatening stimuli.

Assessment of the hypothalamic-pituitary adrenal axis (HPA)

Collection of salivary cortisol samples was performed using Salivette® Cortisol (Sarstedt, Numbrecht, Germany, Ref.51.1534), which consists of two small tubes, one of them containing a small piece of cotton. Participants chewed the cotton for about 60 s, after which it was introduced into the salivette for analysis. Samples were analyzed at the San Cecilio University Hospital, using the electrochemiluminescence immunoassay BECLIA[^] method. This method is designed for use in Roche Elecsys 1010/2010 automated analyzers and in the Elecsys MODULARANALYTICS E170 module. Salivary cortisol samples were obtained at four collection times in the study: pre-exposure cortisol, post-exposure cortisol, post-exposure cortisol +10 min and post-exposure cortisol +20 min.

Statistical analyses

Initially, Student's t-tests were used to check for differences between groups (goggles vs. screen) in terms of sociodemographic (age and education level), and psychologic (SV, PSS, and SCL-90-R) variables. Chi-square analyses were performed to check for differences between groups in sex, use of tobacco, and contraception.

Next, we conducted a $2 \times 2 \times 2$ ANCOVA in order to test for differences in conductance between the two types of VR presentation protocols (goggles vs. screen), the sexes (males vs. females), and the time of data acquisition (anticipatory stress vs. speech delivery). Baseline levels of conductance for each participant were used as a covariate.

Additionally, we carried out a $2 \times 2 \times 3$ ANCOVA to analyze if there were significant differences in cortisol levels associated with the two types of VR protocols (goggles vs. screen), the sexes (males vs. females), and the time of cortisol sampling (post-exposure, post-exposure

+10 min and post-exposure +20 min). Pre-exposure levels of cortisol for each participant were used as a covariate.

The Greenhouse-Geisser correction was applied to all analyses involving repeated measures and sphericity violations. Also, in the case of cortisol responses, Bonferroni post-hoc analyses were conducted when analyzing within-group differences across time during the experimental session.

When significant Group \times Sampling Time interactions were found, follow-up Student's t-tests were carried out to determine whether there were differences in either skin conductance or cortisol level between groups at each sampling time.

Finally, we conducted a 2×2 ANOVA that included the type of VR protocol (goggles vs. screen) and sex (males vs. females) to analyze the four subscales of the IPQ: global, spatial presence, involvement, and experienced realism. Significant interactions were further examined by means of Student's t-tests. Further, correlation analyses were used to test the relationship between the stress variables (PSS and SVI) and the IPQ.

5.3. Results

Sample description

Sociodemographic and psychologic data for the participants can be found in Table 1. Results showed significant statistical differences between types of protocol in the PSS, with the screen group scoring higher than the goggles group. Thus, PSS scores were added as covariate in the following analyses.

Table 1: Means (M) and standard deviations (SD) of socio-demographic and psychological variables for the participants in both groups

Variables	Goggles M ± SD	Screen M ± SD	<i>t</i> / χ^2	<i>p</i>
Age (years)	21.9 ± 5	20.4 ± 1.25	1.36	0.181
Education Level (years)	14 ± 0.00	14 ± 0.00	-1.07	0.290
Sex (% , χ^2)				
Males	45.83 %	25 %	1.4	0.230
Females	54.17 %	75 %		
Smoking (% , χ^2)				
Males	27.27 %	0 %	2.7	0.100
Females	30.77 %	6.5 %		
Contraceptives (% , χ^2)	4.33 %	1.3 %	2.6	0.140
Perceived Stress Scale	20.08 ± 10.03	26.90 ± 5.15	-2.81	0.007*
Stress Vulnerability	4.91 ± 3.92	6.62 ± 4.07	-1.43	0.161
Inventory				
<i>Symptom Checklist SCL-90-R</i>				
Somatization	54.20 ± 11.39	55.52± 6.83	-0.46	0.647
Obsessions and compulsions	58.96 ± 9.32	61.71± 6.02	-1.16	0.253
Interpersonal sensitivity	57.96 ± 12.99	59.81± 7.51	-0.57	0.569
Depression	48.56 ± 14.30	54.09 ± 6.03	-1.65	0.107
Anxiety	52.87 ± 10.21	54.38 ± 7.89	-0.55	0.587
Hostility	50.37 ± 11.40	52.05 ± 8.13	-0.56	0.579
Phobic Anxiety	43.71 ± 13.12	42.19 ± 9.23	0.44	0.660
Paranoia	57.50 ± 10.09	55.38 ± 8.76	0.75	0.459
Psychoticism	52.62 ± 14.11	53.95 ± 8.50	-0.37	0.709

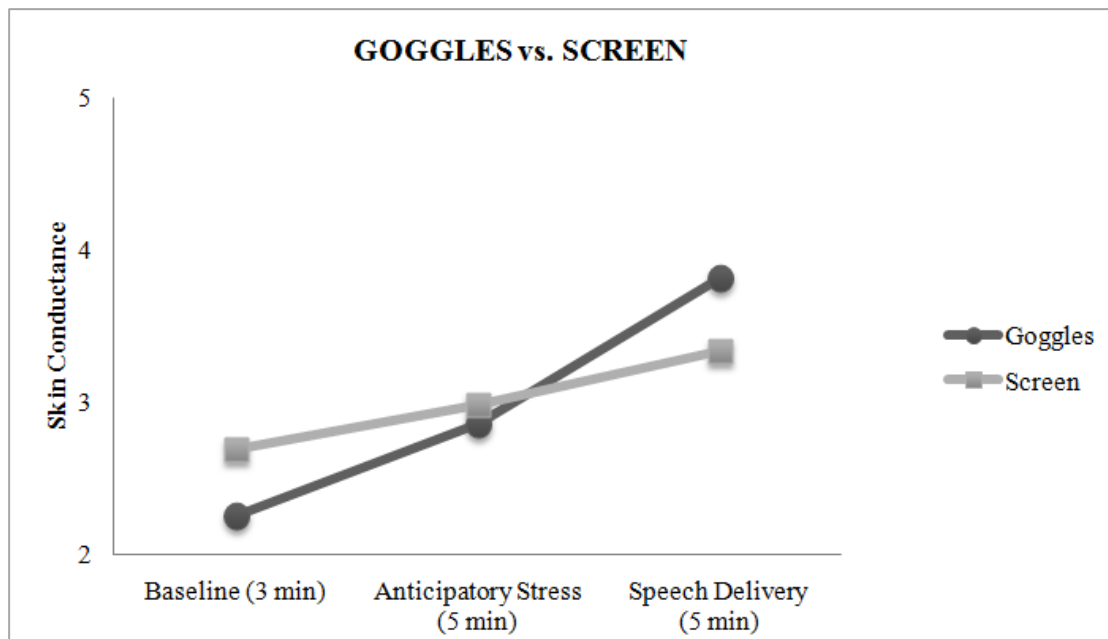
Note: χ^2 : Chi-square analysis; *t* : t-student value; * $p \leq 0.05$

Sympathetic reactivity: Skin conductance

Results showed a main effect of type of VR protocol [$F(1,42) = 4.440$; $p = 0.041$], with the goggles condition evoking higher sympathetic activity overall.

A significant interaction between type of VR protocol and assessment time [$F(1,42) = 3.959$; $p = 0.050$] revealed a higher activation between anticipatory stress ($M = 2.85$; $SD = 1.95$) and speech delivery ($M = 3.81$; $SD = 2.72$) in the goggles group than in the screen group (anticipatory stress: $M = 2.98$; $SD = 1.20$; speech delivery: $M = 3.34$; $SD = 1.10$).

Figure 3: Skin conductance for the two protocols of TSST-VR delivery (Goggles vs. Screen), recorded at 3 points in the experiment



Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA): Salivary cortisol

In terms of HPA axis activation, there was no evidence of any main effect or an interaction between the level of activation of the HPA axis and the type of TSST-VR protocols, goggles or screen projection, at any of the cortisol extraction times.

Finally, results showed that there was no interaction between sex and cortisol secretion levels, regardless of whether the TSST-VR was presented by means of goggles or projected on a screen.

Immersion in the virtual environment (IPQ)

Statistical analyses demonstrated statistically significant differences in the involvement subscale of the IPQ as a function of the sex of the participant (independent of VR protocol used), with males ($M = -1.06$; $SD = 5.43$) endorsing lower levels of involvement than females ($M = 2.92$; $SD = 3.50$) [$F(1,42) = 7.29$; $p = 0.01$].

On the experienced realism subscale, there was a significant interaction between sex and type of TSST-VR protocol [$F(1,42) = 6.63$; $p = 0.014$], such that males obtained higher scores than females only on the screen projection condition (males: $M = -1.66$; $SD = 2.16$ vs. females: $M = -4.26$; $SD = 2.05$). No significant differences were found on the global and spatial presence subscales.

Significant correlations were found between scores on the PSS and on the IPQ subscales involvement ($r = 0.348$; $p = 0.02$) and spatial presence ($r = 0.519$; $p < 0.001$). Similarly, SVI scores correlated with those obtained on the IPQ subscales involvement ($r = 0.298$; $p = 0.049$) and spatial presence ($r = 0.428$; $p = 0.004$).

5.4. Discussion

The objective of this study was twofold: firstly, we aimed to determine which of two protocols of the TSST-VR, whether a 3D virtual audience projected onto goggles or a large screen, produced greater sympathetic reactivity and activation of the HPA axis. Secondly, we sought to find out whether males and females showed distinct levels of activation of the sympathetic nervous system and HPA axis in these two TSST-VR protocols.

In terms of activation of the HPA axis, we found no statistical differences between the two TSST-VR protocols: goggles versus screen. However, sympathetic reactivity, as measured

by skin conductance, did vary across presentation protocols, being higher in the goggles projection condition than in the screen condition. This effect could not be attributed to the level of immersion associated with each of the experimental conditions.

Here, it is worth emphasizing that, although an adequate level of immersion in the virtual environment seems indispensable to activate the stress response axes, some studies (e.g., Santos-Ruiz et al., 2010) have failed to find a significant relationship between the HPA axis and the level of immersion in the virtual environment. In the present study, we did not find a significant relationship of the HPA axis and sympathetic reactivity with the level of immersion in the virtual environment.

In fact, although females obtained higher scores in the involvement subscale of the IPQ, regardless of VR protocol, there were no significant sex differences associated with HPA axis activation and sympathetic reactivity. Similar results were found with the screen protocol in male participants that, despite obtaining higher scores on the experienced realism subscale of the IPQ, did not show higher sympathetic activation either. It seems that the goggles elicited significantly higher conductance values overall, but this effect was not associated with any subscale of the IPQ and did not vary across sexes.

On the other hand, these results are in agreement with the recent study by Ling, Brinkman, Nefs, Qu, and Heyndericky (2013) in which real-size screen presentations of a virtual classroom were associated with a greater sense of presence when compared to real- or reduced-size TV projections.

A positive correlation was found between stress levels (as measured by the PSS and VSI) and the IPQ involvement and (goggles or screen) or the participant's sex. In other words, those participants reporting higher stress levels were also more likely to feel involved and spatially present during the task, regardless of the manner in which the virtual audience was presented. These results concur with those of Ling, Nefs, Morina, Heynderickx, and Brinkman

(2014), who found a correlation between sense of presence and anxiety, but not for sex or type of projection of the virtual environment (e.g., field of view, degree of freedom of the tracker, etc.). Since we did not measure anxiety levels in the present study, we cannot say whether a greater spatial presence leads to a higher level of anxiety, but we did find that those participants with higher levels of stress prior to the TSST-VR protocol showed a higher level of involvement and a greater sense of spatial presence, as measured by the IPQ.

The results showed sex differences in that females manifested a greater degree of involvement than males, regardless of the VR protocol used. In contrast, females exposed to the 3D audience of the TSST-VR by means of the screen projection manifested less experienced realism than males. Such sex differences need to be considered in designing research that uses VR methodologies, given that differences between males and females could be erroneously attributed to distinct HPA axis responses when, in fact, they are due to differences in the degree of VR immersion of each gender. In fact, the two aims of this study stemmed from results such as those reported by Kotlyar et al. (2008), showing that the TSST-VR produces sympathetic activation and engages the HPA axis. Similarly, Kelly et al. (2007) concluded that the TSST-VR activates the stress response and constitutes a useful tool in that it solves some of the limitations associated with the traditional TSST.

In recent years, there have been reports of various investigations demonstrating the utility of the TSST-VR. Nevertheless, despite common agreement on the suitability of the VR version of this task in engaging the axes mediating the stress response, certain controversial issues still remain. One of these issues pertains to the presentation of the virtual environments that are common to most. Some investigators have projected 3D environments onto large screens (Santos-Ruiz et al., 2010), while others have used goggles (Jönsson et al., 2009; Kelly et al., 2007). Despite these differences, no study has contrasted the various versions of the TSST-VR to detect which form of presentation results in a greater response to the stress

generated by the task. Additionally, although it is well known that the traditional TSST evokes more activation in males than in females (Foley & Kirschbaum, 2010; Hemmeter et al., 2005; Williams et al., 2004), sex differences in response to the TSST-VR have not been systematically studied. The results obtained in this study provide some answers to these questions.

It should be noted, however, that use of the VR goggles could have caused cybersickness, according to theories like the Sensory Conflict Theory, the Poison Theory, and the Postural Instability Theory (La Viola Jr., 2000). Still, no member of the goggle presentation group reported symptoms of cybersickness, nor were there any indications of cybersickness in the skin conductance records.

The present study has limitations that need to be taken into account when considering the study and its findings. Firstly, given that one of our objectives was to characterize sex differences in the two versions of the TSST-VR used here, it would have been desirable to have an equal number of males and females. Likewise, it would have been preferable to count on matched levels of perceived stress across groups at the baseline level, since the initial differences could be selectively influencing stress responses at both the sympathetic and HPA axis levels.

In summary, our results appear to support the use of the TSST-VR, whether it is delivered via goggles or via a large screen projection, as a useful paradigm to investigate the modulation of the principal axes that intervene in the stress response. More concretely, if the aim of the study is to specifically investigate one of the two axes, it seems that it would be preferable to use a goggles protocol to activate the sympathetic nervous system and projection of the 3D image onto a screen to activate the HPA axis, particularly if participants are mainly females. In investigating the stress response in both axes and mostly with males, our results seem to favor the use of the goggles protocol. Finally, if the study were to include both stress

response axes and both sexes, our findings would indicate that the use of a 3D image projected onto a large screen would be the recommended TSST-VR protocol.

CAPÍTULO VI: “ESTUDIO 2”

The relationship between the menstrual cycle and cortisol secretion: Daily and stress-invoked cortisol patterns

Montero-López, E., Santos-Ruiz, A., García-Ríos, M.C., Rodríguez-Blázquez, & M., Peralta-Ramírez, M.I. (Under review). The relationship between the menstrual cycle and cortisol secretion: Daily and stress-invoked cortisol patterns. *Anxiety, Stress & Coping*

“The relationship between the menstrual cycle and cortisol secretion: Daily and stress-invoked cortisol patterns”

6.1. Introduction

A great deal of research has demonstrated that menstrual cycle phases involve significant changes in hormone levels. Such changes during the menstrual, follicular, and luteal phases of the menstrual cycle, in patterns of eating, exercise, sleep, and health (Brown, Morrison, Calibuso, & Christiansen, 2008), together with the possible influences of other variables such as tobacco, oral contraceptive use, and stress (al'Absi, Hatsukami, & Davis, 2005; Boisseau et al., 2013; Huttlin, Allena, Tosuna, Allena, & al'Absi, 2015; Kajantie & Philips, 2006; Kudielka & Kirschbaum, 2005; Kudielka, Hellhammer, & Wüst, 2009) can invoke many physical and psychological changes in women.

With respect to psychological changes, cortisol, considered the stress hormone par excellence, is a key player. It is considered one of the main markers of the activated hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in response to a stressful event (Hellhammer, Wüst, & Kudielka, 2009). Given the hormonal changes that occur during the menstrual cycle, multiple studies have examined the ways in which cortisol levels are related to the distinct menstrual cycle phases as well as whether there is an association between these two factors (Duchesne & Pruessner, 2013; Gordon & Girdler, 2014; Kudielka et al., 2009; Lustyk, Olson, Gerrish, Holder, & Widman, 2010).

There is some controversy regarding cortisol secretion and its influence on menstrual cycle phases. Some studies have not found any relationship between cortisol levels and menstrual cycle phase (Fries, Dettenborn, & Kirschbaum, 2009; Wolfram, Bellingrath, & Kudielka, 2010), whereas others, did in fact detect phase-related differences in cortisol levels (Walder, Statucka, Daly, Axen, & Haber, 2012). These authors studied this relationship by measuring salivary cortisol levels, collecting a baseline cortisol sample 15 minutes after the arrival of the participants at the laboratory (9 am) and two subsequent samples at 10 am and 11

am. The participants completed various self-reported and neuropsychological measures between the last two samplings. The results showed that women in the luteal phase had higher cortisol levels in the three samples compared with those in women in the follicular phase, although this difference did not reach statistical significance. However, women in the follicular phase showed a delayed recovery of cortisol levels following stress.

Childs, Dlugos, & De Wit (2010) investigated cardiovascular, hormonal, and emotional responses using the Trier Social Stress Test (TSST). They first aimed to determine whether there were any differences between men and women in their response to stress, and, secondly, whether there were differences between women during the different menstrual cycle phases. The authors reported that there was an association between people who demonstrated greater subjective sensitivity to stress and an increase in salivary cortisol levels.

In a recent study, Gordon and Girdler (2014) examined the relationship between menstrual cycle phases and stress reactivity using the TSST by collecting neuroendocrine measures (including cortisol) and hemodynamic measures (blood pressure and heart rate). Significant associations between these factors and menstrual cycle phases were not found.

Other variables can also influence the stress response with respect to the menstrual cycle. With respect to oral contraceptives (OC), Kudielka et al. (2009) reviewed their possible influence, and the findings showed lower salivary cortisol levels in women taking OC. In other studies, Fries et al. (2009) concluded that the use of OC did not affect salivary cortisol levels but did affect the HPA axis, leading to higher concentrations of estradiol and progesterone and increased salivary cortisol levels in women in the luteal phase when performing the TSST. However, these results were not confirmed in a recent study conducted by Boisseau et al. (2013). These authors studied the effects of oral contraceptives, menstrual cycle phases, and exercise on a test of physical stress, and free salivary cortisol concentrations and free urinary cortisol/cortisone excretion. They collected in four samples at 9:00 am and then, 30, 60, and 90

minutes later. Findings demonstrated the use of oral contraceptives was associated with high diurnal cortisol levels, but with a low activation of the HPA axis in response to a physical stressor, regardless of the menstrual phase.

Among the studies that used the TSST to activate the HPA axis, there seems to be some agreement that when under stress, cortisol increases are greater in the luteal phase relative to the other phases. However, we do not know whether this increase is only due to the stressful situation or whether cortisol during the day levels are also elevated in this phase because cortisol levels have not been measured for both conditions in the same sample. Several studies have shown that there were no differences in daily cortisol secretion between the different menstrual cycle phases (Fries et al. 2009; Wolfram et al. 2010).

Although several studies have found an association between menstrual cycle and both baseline and stress-invoked cortisol levels, to our knowledge, no studies have investigated in the same sample whether menstrual cycle phases are related to both baseline daily cortisol levels and stress reactivity invoked by a stressful task, such as the TSST.

Kidd, Carvalho & Steptoe (2014), studied the association between daily cortisol level (namely total area under the curve; AUC_{day}), the cortisol awakening response (CAR), and the slope of the cortisol decline over the day with cortisol responses to laboratory stress. Stress was induced using the Stroop Color-Word and Mirror Tracing tests to women and men between 54-76 years of age. Five measurements of salivary cortisol were taken: the first recorded immediately after the stress tests, and then 20, 45, and 75 minutes after the tasks. The results showed no correlation between cortisol responses to laboratory stress and the CAR. Nevertheless, there was an association between the AUC_{day} and the response of cortisol levels to laboratory stress.

Therefore, the aim of our research was to test whether cortisol during the day levels of women at different menstrual cycle phases were associated with subsequent reactivity to stress

in the classic task of public speaking. We evaluated both cortisol during the day patterns (analyzing salivary cortisol levels every four hours over a full day) and cortisol levels in response to a stressful laboratory situation (TSST, in the form of virtual reality) in women at different menstrual cycle phase.

This design intended to clarify the changes in cortisol levels that occur in the menstrual cycle phases, and their possible relationship with an increased psychological stress response. The results should also improve our understanding of HPA axis function, both in regard to baseline cortisol levels and in response to a stressful laboratory situation.

6.2. Method

Participants

Forty-eight women with a mean age of 33.04 years ($SD = 6.87$) participated in this study. Group 1 was composed of 27 women in the follicular phase (cycle days 2-8) with a mean age of 32.89 years ($SD = 6.88$). Group 2 was composed of 21 women in the luteal phase (cycle days 18-26) with a mean age of 33.23 years ($SD = 7.01$).

Participants were recruited from the University of Granada through classroom visits, campus fliers, and posters in public institutions, newspapers, and local radio. The inclusion criteria were woman, age 18–50, literate, body mass index (BMI) between 18.5 and 24.9, regular menstrual cycles ranging from 25 to 35 days, no taking OC, and not presenting a physical or mental disease at the time of the study. We also collected information about the consumption of controlled drugs or recreational substances (alcohol, nicotine, amphetamines, barbiturates, methadone, muscle relaxants, or lithium). This information was obtained through a semi-structured interview conducted when the women called to participate in the study.

Potential participants attended an information session during which they filled out eligibility forms and signed informed consent forms. We excluded seven participants that had not regular cycles or with menopause, eight participants because of their overweight problems

or obesity, and seven participants due to illness or allergic problems. All participants were Spanish and had the same socioeconomic level. The menstrual phase of the participants estimated by gathering information about the date and duration of the last menses during semi-structured interviews in the experimental session. Finally, participants were assessed for psychopathological symptoms with the SCL-90-R Symptoms Inventory (Derogatis 1994; Spanish adaptation by Gonzalez de Rivera & De las Cuevas, 1988) to rule out potential psychopathology. All participants were included in the study, as none scored one and a half standard deviations above the mean.

Upon arrival at the laboratory, the participants were given information about the experiment and asked to sign an informed consent form approved by the Ethics Committee of the University of Granada. They performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and participated in a semi-structured interview which was administered immediately afterwards.

Instruments

The questionnaires below provide meaningful covariates that were used in the statistical analyses of psychological measures and cortisol levels.

Semi-structured interview. The subjects provided information on socio-demographic factors, daily life and sleep habits, medication, and history of psychiatric or psychological treatment. These items were similar to the questions included in the National Health Survey of Spanish Population.

Stress Vulnerability Inventory (SVI) (Beech, Burns, & Scheffield, 1986; Spanish adaptation validated by Robles-Ortega, Peralta-Ramirez, & Navarrete-Navarrete, 2006). This instrument consists of 22 items and evaluates an individual's predisposition to be affected by perceived stress. The Spanish adaptation by Robles-Ortega et al. (2006) shows a Cronbach's alpha of 0.87. As for convergent validity, the results show a significant positive correlation (p

< .01) with the following assessment scales: the State Trait Anxiety Inventory-R, the Beck Depression Inventory, the Somatic Symptom Scale, and the Survey of Recent Life Experiences.

Perceived Stress Scale (PSS) (Cohen, Kamarak, & Mermeistein, 1983; Spanish adaptation by Remor & Carrobles, 2001). The PSS is a self-report scale used to evaluate perceived stress levels and the degree to which people find their lives unpredictable, uncontrollable, or overwhelming (aspects that contribute to stress). The PSS consists of 14 items with five response alternatives. The highest score corresponds to the highest perceived stress level. The Spanish version of the PSS (14 items) has adequate reliability (internal consistency = 0.81 and test-retest = 0.73), concurrent validity, and sensitivity (Remor 2006). Here, we considered scores over 22 (i.e., the mean score for the Spanish population; Remor and Carrobles 2001) as reflecting high levels of perceived stress.

SCL-90-R Symptoms Inventory (Derogatis 1994; Spanish adaptation by Gonzalez de Rivera et al. 1988). This instrument was used to rule out potential psychopathology in the participants. This self-report questionnaire was developed to assess symptoms of psychopathology and includes 90 items with five response alternatives (0-4) on a Likert scale. Women respond according to how they have felt within the past seven days, including the day the inventory is administered. The inventory is scored and interpreted according to nine main dimensions (somatization, obsessive-compulsive symptoms, interpersonal sensitivity, depression, anxiety, hostility, phobic anxiety, paranoid ideation, and psychoticism) and three global indices of psychological distress (Global Severity Index [GSI], Positive Symptom Total [PS], and Positive Symptom Distress Index [PSDI]). In this study, these last three global indices were analyzed. This instrument is thought to have satisfactory reliability and validity (De las Cuevas et al. 1991).

Virtual reality version of the Trier Social Stress Test (TSST-VR)

This task is based on the traditional *Trier Social Stress Test* (TSST; Kirschbaum, Pirke, & Hellhammer, 1993) and was adapted into a virtual environment by Montero-López et al. (2015). It consists of the presentation of a virtual audience in a 3D display, with the sounds of the virtual environment conveyed to the participants through headphones and a microphone that is used to simulate the recording of the participant's speech (at the end of the study, it is revealed to the participants that their speech was not recorded). The virtual reality task contains the same phases as the traditional TSST.

The first phase (*anticipatory stress period*) consists of the initiation of the virtual environment wherein participants face a curtain and hear the sounds of the virtual room. For five minutes, participants must prepare a speech about their own qualities in which they expose their strengths and flaws and explain why they identify with them.

The second phase (*exposure period*) begins as the curtain rises and the audience appears. The participant must begin the speech, having been informed earlier that it should last five minutes and that they should be careful about both the content and form of the information they convey, as the audience would react according to the quality of the presentation. Special emphasis is placed on the requirement to speak continuously for the entire five minutes. Once the speech ends, the last stage (*the arithmetic task*) begins. This task consists of serially subtracting the number 13 from the number 1022 as quickly as possible for five minutes. Participants must re-start from 1022 whenever they make an error.

Procedure

Upon arrival at the laboratory, each participant was given information about the experiment and a consent form to be read and signed. Afterwards, the participant was interviewed and completed the following questionnaires: SVI, PSS, and SCL-90-R.

Subsequently, each participant performed the TSST-VR and the arithmetic task. At the end of the study, participants were given instructions to measure cortisol during the day levels

during the following day and were provided with the corresponding salivettes and a data form on which they could record the time of sample collection.

Assessment of cortisol response to stress (TSST-VR)

Salivary cortisol sample collection was performed using a Salivette® Cortisol kit (Sarstedt, Numbrecht, Germany, Ref.51.1534), which consists of two small tubes, one containing a small piece of cotton. Participants chewed the cotton for approximately 60 seconds, after which it was placed into the salivette for analysis. Samples were analyzed at the San Cecilio University Hospital using the electrochemiluminescence immunoassay “ECLIA” method. This method is designed for use in Roche Elecsys 1010/2010 automated analyzers with the Elecsys MODULAR ANALYTICS E170 module.

The first sample of cortisol (baseline cortisol) was taken after completing the semi-structured interview, the SVI, and the PSS, or in other words within the first 20 minutes of arrival at the laboratory. Immediately afterwards, the TSST-VR was explained to the participant, the second salivary cortisol sample (pre-exposure cortisol) was collected and the stressful task started (anticipatory stress to a situation of speech delivery and arithmetic task). Right after the end of arithmetic task, the third cortisol sample (post-exposure cortisol) was taken. Ten and 20 minutes later, the fourth (post-exposure cortisol +10’) and fifth (post-exposure cortisol +20’) cortisol samples were withdrawn. Participants were given interior design magazines to leaf through in the interval between the fourth and fifth drawing of salivary cortisol. A diagram of the protocol of the TSST-VR is shown in Figure 1.

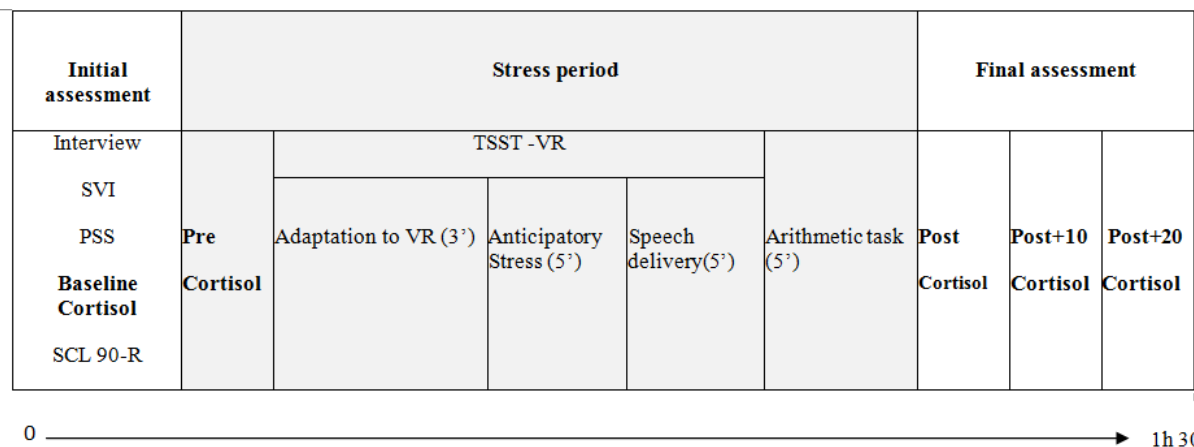


Figure 1: Diagram of the TSST-VR protocol

Assessment of cortisol during the day

To assess cortisol patterns during the day, each participant collected five samples of their salivary cortisol. The first sample (Cortisol 1) was collected 30 minutes after waking up (while still fasting), the second (Cortisol 2) at +4 hours, the third (Cortisol 3) at +8 hours, the fourth (Cortisol 4) at +12 hours, and the fifth (Cortisol 5) at +16 hours. During the half hour preceding each sample collection, the participants could not have anything to eat or drink except water and were not allowed to smoke.

Although cortisol levels are reportedly stable between 14:00 and 16:00 hours (Kudielka & Kirschbaum, 2005), Spanish metabolic and circadian rhythms differ from those of other European citizens due to the greater number of light hours and the distinctive schedule of meals. Therefore, following a pilot study, we determined that cortisol levels were stable between 15:30 pm and 18:00 pm, and all participants were subsequently tested in the afternoon within this temporal window (Santos-Ruiz et al. 2010).

Statistical analyses

To determine whether there were statistically significant differences between sociodemographic and psychological variables in the two groups, multiple ANOVAs were performed using menstrual cycle phase as the independent variable with two levels (follicular

and luteal) and the following dependent variables: age, schooling, tobacco, and scores on the Stress Vulnerability Inventory (SVI), the Perceived Stress Scale (PSS), and the different SCL-90-R subscales.

Several statistical analyses were performed to evaluate the influence of the potential confounders of cortisol levels. Bivariate correlations were calculated between the age of the participants and their cortisol during the day levels and between the age of the participants and cortisol levels at different times of exposure to the stressful task. Student's t-tests were also performed with the independent variables tobacco consumption (smoker/non-smoker) and the dependent variables cortisol during the day levels and cortisol levels in response to the stressor.

To determine whether there were statistically significant differences between the menstrual cycle phase of the participants and their daily stress levels, a 2x5 mixed ANCOVA was performed. The first factor included two levels (follicular phase group and luteal phase group) between independent groups, and the second was a within-subject factor of repeated measures with five time-points: 30 minutes after waking (cortisol 1), +4 hours (cortisol 2), +8 hours (cortisol 3), +12 hours (cortisol 4), and +16 hours (cortisol 5).

Finally, to determine whether there were differences between menstrual cycle phases and cortisol levels under stress (TSST-VR), a 2x4 mixed ANCOVA (with the baseline cortisol level as covariate) was performed. The first factor contained two levels (follicular phase group and luteal phase group) between independent groups, and the second within-subject factor included repeated measures (pre-exposure cortisol, post-exposure cortisol, post-exposure cortisol +10', and post-exposure cortisol +20'). In both repeated measures analyses, the Greenhouse-Geisser correction was applied. Data were analyzed using SPSS version 20. The analyzed data relative to levels of salivary cortisol showed a normal distribution.

For cortisol levels under stress and daily stress levels, we measured the area under the total response curve with respect to the ground (AUCg), providing information about the

changes occurred during the observation of the dependent variable (cortisol levels). Second, we measured the area under the curve with respect to increase (AUCi) which allowed for an assessment the overall intensity at which the recorded events occurred. Both areas were calculated using the trapezoid formula following (Pruessner, Kirschbaum, Gunther, Meinlschmid, & Hellhammer, 2003). Afterwards, we carried out a mixed ANOVA to determine whether there were any differences between the AUCg and the AUCi in the two groups (follicular phase and luteal phase). Furthermore, correlation analyses were used to test the relationship between the AUCi of the TSST-VR and AUCi of daily stress, and between the AUCg of the TSST-VR and the AUCg of daily stress.

6.3. Results

Sample description

Results did not show significant statistical differences between the follicular phase and luteal phase in the principal socio-demographic variables of stress and psychopathological symptoms. (Table 1).

Table 1: Means (M) and standard deviations (SD) of socio-demographic and psychological variables for the participants in both groups

	Follicular Mean ± SD	Luteal Mean ± SD	F	p
Age (Years)	32.89 ± 6.88	33.23 ± 7.01	.30	.86
Education (Years)	16.63 ± 3.04	16.81 ± 2.75	.45	-
Tobacco	18.8%	30%	.83	-
Stress Vulnerability Inventory	6.89 ± 4.61	5.15 ± 4.34	1.71	.19
Perceived Stress Scale	22.55 ± 7.90	20.73 ± 8.40	.56	.45
SCL-90-R				
Somatization	53.50 ± 10.93	49.09 ± 8.65	2.26	.14
Obsessions and Compulsions	54.80 ± 11.55	51.57 ± 9.23	1.09	.30
Interpersonal Sensitivity	51.76 ± 11.89	50.14 ± 11.07	.23	.63

Depression	49.15 ± 9.24	45.76 ± 9.95	1.46	.23
Anxiety	52.11 ± 10.30	48.38 ± 9.19	1.68	.20
Hostility	50.00 ± 9.54	46.38 ± 9.54	.37	.54
Phobic Anxiety	52.11 ± 10.30	48.38 ± 9.19	1.69	.21
Paranoia	51.88 ± 11.48	47.33 ± 12.83	1.65	.20
Psychoticism	48.96 ± 13.23	46.00 ± 12.50	.61	.43
Global Severity Index	40.42 ± 7.18	42.52 ± 8.60	.83	.36
Positive Symptom Total	54.73 ± 13.04	50.28 ± 12.01	1.45	.23
Positive Symptom Distress Index	45.58 ± 9.89	43.90 ± 7.66	.40	.52

Cortisol during the day

There were no statistically significant correlations between age and cortisol during the day levels. There were also no statistically significant differences in cortisol during the day levels between smoking and non-smoking women.

Cortisol response to psychological stress

With regard to the levels of cortisol response to the TSST-VR and potential confounders, i.e., age, and tobacco consumption, the results showed there were no statistically significant differences for both age and tobacco.

Cortisol during the day levels and menstrual cycle phases

Results showed that there was no interaction between the follicular and luteal groups with regard to cortisol during the day levels at any time of the day. Nor there were any statistically significant differences between the two phases of the menstrual cycle and the AUC_G and AUC_I.

Cortisol levels under stress (TSST-VR) at menstrual cycle phases

Considering that results showed differences in the level of baseline cortisol between the two groups [$F(3,48) = 5.56$; $p = 0.003$], this variable was included as a covariate in the post mixed ANOVA.

A significant interaction effect was found between the two menstrual phase groups and the salivary cortisol response to the TSST-VR [$F(3,48) = 3.24$; $p = 0.035$]. The between-groups analysis performed using cortisol levels at different time-points relative to the TSST-VR revealed statistical differences in the post-exposure cortisol levels ($p = 0.031$). Women in the luteal phase had higher levels of post-exposure cortisol (Mean \pm Standard Deviation, 6.28 ± 3.63) than the women in the follicular phase (4.40 ± 2.19). See Figure 2.

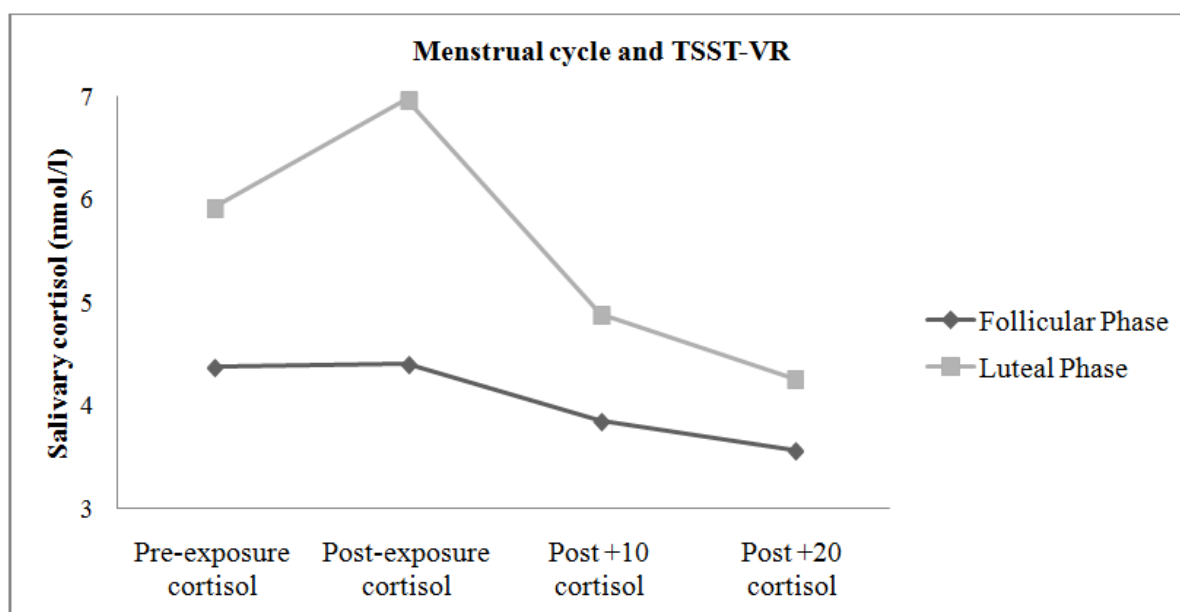


Figure 2: Levels of salivary cortisol during the TSST-VR according to phase in the menstrual cycle

Finally, results showed statistically significant differences in the AUCg between the luteal phase versus the follicular phase [$F(1,48) = 3.80$; $p = 0.05$], with the AUCg being higher in the luteal phase (211.70 ± 113.86) than in the follicular phase (157.37 ± 79).

6.4. Discussion

The aim of this research was to test whether there was a relationship between cortisol during the day patterns and stress-invoked cortisol levels in the different menstrual cycle phases. To accomplish this objective, after ensuring that the two menstrual phase groups were matched for most major psychological variables, daily stress was assessed using the cortisol during the day pattern (measured over a full day; baseline HPA axis activity). Furthermore, the response to psychosocial stress was captured by measuring cortisol levels during exposure to the TSST-VR (HPA axis reactivity to stress).

The results revealed no differences between the two groups (follicular and luteal phases) in cortisol during the day patterns. These findings are consistent with those of Kudielka & Kirschbaum (2003) and Wolfram et al. (2010) who likewise did not find any differences in cortisol levels for women in the follicular and luteal phases.

Despite there being no major menstrual phase-related differences in cortisol during the day levels, we detected differences when the women were exposed to the stressful TSST-VR task. These results are similar to those found by Walder et al. (2012), where women in the luteal phase had higher cortisol levels in the stressful task than did women in the follicular phase. This study differed from ours in several ways: the type of stressful task used in the laboratory and the schedule (they used a morning schedule and we used an afternoon schedule). Another difference was the way in which salivary cortisol samples were taken: in the study conducted by Walder et al. (2012), three samples were taken each hour (9:00 am, 10:00 am, and 11:00 am), while in ours we took five (taking into account the baseline cortisol level). Moreover, they collected the samples at varied time intervals, following the protocol previously described. Despite these differences, we arrived at similar conclusions.

With respect to the AUC_g and AUC_i, we found statistically significant differences for women in the luteal phase group who had higher cortisol levels at the four time-points (more

differentiated in the post-exposure cortisol) following exposure to the stressful situation (being the elevation in AUCg).

Kidd et al. (2014) found an association between cortisol responses to laboratory stress and salivary cortisol levels over the course of the day, independent of baseline cortisol levels in the laboratory. Nevertheless, their study has important differences in relation to ours, making it difficult to compare results from both studies. These differences were found in the women of their study, whose average age was 64 years old (meaning they were neither in the luteal nor the follicular phase). Moreover, there were participants who completed the stress task in the laboratory during a morning schedule (9:15 am) and others during an afternoon schedule (1:30 pm), while in our study all women completed the stress task at the same time (1:30 pm). Lastly, in this study the cortisol was collected throughout the day seven days after the stress task was completed in the laboratory, and always in the same schedule (when waking up, 30 minutes after waking up, 10:00-10:30 am, 4:00-4:30 pm, and 8:00-8:30 pm). However, in our study, we collected these levels the day after the stress task was done in the laboratory, and according to the time in which each participant woke up (30 minutes after waking up, and then, every four hours until going to bed).

The results of the present study show that in a situation of particular stress, women in the luteal phase of the menstrual cycle experience a greater increase in salivary cortisol levels, although this increase was not reflected in higher baseline cortisol levels. Thus, the menstrual cycle does not appear to influence the amount of perceived daily stress, although some differences are revealed upon exposure to a stressful situation.

Being in the luteal phase may cause these women to perceive the situation as being even more stressful. This would involve the increased activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, along with all of the consequences that this activation entails. This could in turn increase their stress levels and the risk of worsening physical and mental health.

Our findings may help to clarify how hormone levels affect women's health and psychological state, and therefore emphasize the importance of normal hormonal regulation.

CAPÍTULO VII: “ESTUDIO 3”

The effects of corticosteroids on cognitive flexibility and decision-making in women with lupus

Montero-López, E., Santos-Ruiz, A., Navarrete-Navarrete, N., Ortego-Centeno, N., Pérez-García, M., and Peralta-Ramírez, M.I. (2016). The effects of corticosteroids on cognitive flexibility and decision-making in women with lupus. *Lupus* (In press) (Anexo II)

“The effects of corticosteroids on cognitive flexibility and decision-making in women with lupus”

7.1. Introduction

Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) show a diverse symptomatology that manifests on both organic and neuropsychiatric levels. The prevalence of SLE is slightly below 1:1000 in women and is tenfold lower in men (Aringer and Hiepe, 2011; Petri et al., 2014; Santos-Ruiz, 2011).

The decision to treat SLE with corticosteroids depends on the symptomatology, activity and severity of the disease. However, while corticosteroid treatment is indispensable for controlling the disease in some cases, it does produce adverse effects, some of which can lead to major organ damage (Elder, Urowitz and Gladman; 2013; Petri et al., 2014; Ruiz-Irastorza, Danza, and Khamashta; 2012).

The adverse effects of corticosteroid treatment and organ damage in SLE patients have been broadly studied and reviewed and reveal major implications (Ruiz-Arruza et al., 2014; Ruiz-Irastorza et al., 2012; Sarnes et al., 2011). A few of the most characteristic side effects are adrenal damage (hypothalamic-pituitary-adrenal suppression cause thyroid dysfunction and sex hormones reduction), cardiovascular damage (hypertension or myocardial infarction), bone fractures, infections, cataracts, mood swings and sleep disorders.

The possible cognitive effects of corticosteroid use have also been studied. The majority of these studies have found no association between corticosteroid use and cognitive deficits in SLE patients (Bhangles, Kramer, and Rosenstein, 2013; Gladman et al., 2000; Kozora et al., 2008; Maneeton, Maneeton, and Louthrenoo, 2010; Monastero et al., 2001; Nishimura et al., 2015; Sanna, Bertolaccini, and Khamashta, 2008). To the best of our knowledge, only one study has identified corticosteroid use as a factor associated with cognitive impairment in SLE. This study followed SLE patients for three years, and made evaluations every four months. These

evaluations included standard medical history, physical examinations and cognitive testing. The results show that prednisone use was a factor associated with decreased cognitive function in SLE patients, as well as the presence of positive antiphospholipid antibodies, diabetes, increased depression and a lower education level. A few of the processes measured by Automated Neuropsychological Assessment Metrics (ANAM) were working memory, attention, non-verbal memory and visuospatial perception (McLaurin et al., 2005).

Possible cognitive impairment in SLE patients has also been studied and associated with other variables linked to the disease itself or to the patients' psychological condition. The majority of these studies did not find any association between cognitive dysfunction and clinical characteristics such as disease activity, disease duration and neuropsychiatric manifestations.¹⁰ An association was found, however, between psychological characteristics, such as stress, anxiety and depression, and cognitive impairment in SLE patients, namely with total attention accuracy, immediate visual memory, delayed visual memory and visual fluency, where greater stress indicated dysfunction in these processes (Peralta-Ramírez et cols., 2006; Peralta-Ramírez, Jiménez-Alonso, Godoy-García, and Pérez-García, 2004; Peralta-Ramírez, Jiménez-Alonso, and Pérez-García, 2009; Santos-Ruiz, 2011). Moreover, research findings show that SLE patients with cognitive impairment had affected verbal and visuospatial memory and visuoconstructional abilities associated with neuropsychiatric manifestations. This cognitive impairment was not associated with disease activity, disease duration or corticosteroid use (Monastero, 2001).

Even though cognitive deficits and neuropsychiatric symptoms in SLE have been studied broadly, the possible effects of corticosteroid use on other aspects of executive function in SLE patients, such as flexibility and decision-making, have not. Various studies in other diseases do show an association, however, between corticosteroid use and impairment in executive function (inhibition, working memory, shifting and planning) (Best, Miller, and

Jones, 2009) thus showing that corticosteroid use does have negative effects on working memory and the hippocampus, which in some cases leads to cerebral atrophy, regardless of dose and treatment duration or disease activity (Cerquiera et al., 2005; Lupien, Gillin, and Hauger, 1999). Only one study has compared SLE patients receiving corticosteroid treatment with others not receiving corticosteroid treatment and healthy women. They found that the patients receiving corticosteroid treatment have greater cerebral atrophy than healthy women. Furthermore, SLE patients receiving corticosteroid treatment display more severe cerebral atrophy than patients without SLE who receive corticosteroid treatment, regardless of dose or treatment duration (Hochberg, 1997).

In spite of these approximations, the effects of corticosteroid treatment on executive function in SLE patients have not been studied. Therefore, the aim of our research has been to study if corticosteroid use has any effects on cognitive flexibility and decision-making in women with SLE when compared with healthy women. We hypothesise that women with SLE who receive corticosteroid treatment will display poorer decision-making and cognitive flexibility than women with SLE who do not receive corticosteroid treatment and healthy women.

7.2. Method

Patients

One hundred twenty-one women participated in this study. They were divided in three groups. Group 1 (HW) was composed of 50 healthy women who were recruited via posters and Internet. Group 2 (SLE-CT) consisted of 38 women with SLE receiving corticosteroid treatment; group 3 (SLE-noCT) included 33 women with SLE not receiving corticosteroid treatment. The inclusion criteria for the women with SLE were to meet at least four ACR Classification Criteria for Diagnosis of SLE, to be over 18 years of age, to be literate and to not present any psychological disorders or antidepressants, hypnotics or narcoleptic drugs. Additionally,

participants from the SLE-noCT group had to have not received corticosteroid treatment for at least one year previous to the study. All the participants with SLE were patients from the Systemic Autoimmune Disease Unit (Internal Medicine Service) at the University Hospital ‘Virgen de las Nieves’ and the Clinical Hospital ‘San Cecilio’ in Granada, Spain. The inclusion criteria for the healthy women comprising the control group were the same as those for the SLE groups, except that, additionally, they presented no mental or physical illnesses. This information was obtained through a brief semi-structured interview conducted when the women contacted us to participate in the study.

The main socio-demographic, clinical (SLEDAI, SDI and years with SLE) and treatment variables data were collected and recorded from the women with SLE. All the patients could at least read and write and none of them presented any associated mental illnesses at the time of the study. All these patients and the healthy women gave their signed informed consent to take part in this study, which was approved by the ethics committee at our hospital and carried out in compliance with the Helsinki Declaration.

Instruments

All instruments used in the study were adapted versions validated in a Spanish population.

Trail Making Tests A and B (TMTA, TMTB). This is one of five stand-alone tests from the Delis-Kaplan Executive Function System (D-KEFS) (Delis, Kaplan, and Kramer, 2001). Trail Making Tests A and B are timed tests of cognitive flexibility and visual motor integration that assess speed in processing information, attention and cognitive flexibility. The score obtained after dividing TMTB by TMTA produces the cognitive flexibility index and is the best execution indicator for the TMT (Arbuthnott and Frank, 2000; Lamberty, Putnam, Chatel, Bieliauskas, and Adams, 1994; Ricker and Axelrod, 1994; Sánchez-Cubillo et al., 2009).

Iowa Gambling Task (IGT). This computerized task has been used to assess decision-making in a wide variety of studies (Bechara, 2004). It simulates essential components of decision-making common to everyday life, and the assessment of rewarding and punishing events under conditions of uncertainty and risk. In the task, subjects must choose among four decks of cards. The task is composed of five blocks, each comprising twenty trials. Two decks provide a high and immediate gain but great future losses (long-term loss), while the other two decks provide lower immediate gains but a smaller future loss (long-term gain). The purpose of the task is to try to earn as much money as possible and to incur minimal losses when it is impossible to win. Initially, participants do not know these deck characteristics, but the program provides feedback about the consequences of each choice made by the participants (Santos-Ruiz et al., 2012).

Stress Vulnerability Inventory (SVI). The SVI consists of 22 items and evaluates the individual's predisposition to be affected by perceived stress (Beech, Burns, and Scheefield, 1986). The Spanish adaptation shows a Cronbach's alpha of 0.87 (Robles-Ortega, Peralta-Ramírez, and Navarrete-Navarrete, 2006). As for convergent validity, the results show a significant positive correlation ($p < 0.01$) with the following assessment scales: STAI-R, Beck Depression Inventory, Somatic Symptom Scale and Survey of Recent Life Experiences (SRLE).

Perceived Stress Scale (PSS). The PSS is a self-report scale used to evaluate perceived stress levels and the degree to which people find their lives unpredictable, uncontrollable or overwhelming (aspects that contribute to stress) (Cohen, Kamarak, and Mermeistein, 1983; Remor and Carrobbles, 2001). It consists of 14 items with five response alternatives. The highest score corresponds to the highest perceived stress level. The Spanish version of the PSS (14 items) has adequate reliability (internal consistency=0.81 and test-retest=0.73), concurrent

validity and sensitivity. Here, we have considered those scores over 22 (i.e. the mean score for the Spanish population) as reflecting high levels of perceived stress.³⁴

SCL-90-R Symptoms Inventory (Derogatis, 1994; González de Rivera and De las Cuevas, 1988). We used this instrument to rule out potential psychopathology in the participants. This self-report questionnaire was developed to assess symptoms of psychopathology and it includes 90 items with five response alternatives (0-4) on a Likert scale. Subjects respond according to how they have felt within the past seven days, including the day the inventory is administered. The inventory is scored and interpreted according to nine main dimensions (somatisation, obsessive-compulsive symptoms, interpersonal sensitivity, depression, anxiety, hostility, phobic anxiety, paranoid ideation, and psychoticism) and three global indices of psychological distress (Global Severity Index (GSI), Positive Symptom Total (PS), and Positive Symptom Distress Index (PSDI)). In this study, we have analysed these last three global indices. This instrument is thought to have satisfactory reliability and validity (González de Rivera and De las Cuevas, 1988).

The SLE Disease Activity Index (SLEDAI). The SLEDAI was used to assess lupus activity (Bombardier, Gladman, Urowitz, Caron, and Chang, 1992). It consists of 24 descriptors with pre-assigned severity weights. The total SLEDAI score can range from 0 (no activity) to 105 (maximum activity). The SLEDAI has been shown to be sensitive to changes in lupus activity measured by the treating physician.

Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index (SDI). The SDI is a physician-rated index that assesses cumulative organ damage due either to the disease or to complications of therapy (Gladman et al., 1997). It includes 12 categories: ocular, neuropsychiatric, renal, pulmonary, cardiovascular, peripheral vascular, gastrointestinal, muscular-skeletal, skin, premature gonad failure, diabetes and cancer. Total scores range from 0 (no damage) to 48 (maximum damage).

Procedure

All the participants were scheduled individually at the Mind, Brain and Behaviour Research Centre at the University of Granada, Spain. Upon arrival to the laboratory they gave their signed informed consent. Their socio-demographic variables were then collected before carrying out the executive function tasks: the TMT (cognitive flexibility) and the IGT (decision-making). Subsequently, the psychological and stress tests were administered (SVI, SSP and SCL-90-R). Each session lasted approximately one and a half hours.

Statistical analyses

Results are presented as mean and standard deviation. To begin, ANOVAs were used for examining socio-demographic differences (age and education level) among the three groups (healthy women, SLE patients receiving corticosteroid treatment and SLE patients not receiving corticosteroid treatment). Also, Student's *t*-tests were used for comparing the clinical characteristics of SLEDAI, SDI and disease duration between both SLE groups. In addition, various ANOVAs were carried out for analysing differences in psychological variables (SVI, PSS and SCL-90-R) among all three groups. The independent variables were the three groups, i.e. healthy women, SLE patients receiving corticosteroid treatment and SLE patients not receiving corticosteroid treatment; the dependent variables were the scores on the SVI, PSS, and the SCL-90 subscales.

Finally, one-way ANOVAs were administered with the TMT (for cognitive flexibility) and the IGT (for decision-making) in order to check for any statistically significant differences in executive function between the three groups. Education level and SLEDAI were used as a covariate, as the groups were not evenly weighted in these variables, which can be closely tied to executive function. Differences were considered significant when $p = 0.05$. Additionally, correlation analyses were used to test the relationship between the psychological stress variables and executive function variables in each group, and correlation analyses were used to

test the relationship between the SLEDAI and the cognitive performance variables. Furthermore, were calculated Cohen's coefficients for check the size effect in IGT and TMT between the groups.

7.3. Results

Participants' socio-demographic and clinical characteristics

Socio-demographic and clinical data for the participants can be found in Table 1. The results showed statistically significant differences in education level and SLEDAI.

Table 1: Demographic and clinical characteristics in healthy women, SLE-noCT and SLE-CT

Variable	HW (n=50) Mean (SD)	SLE-noCT (n=38) Mean (SD)	SLE-CT (n=33) Mean (SD)	p*	Post hoc
Age	36.30(10.76)	38.63 (9.28)	34.33 (11.39)	0.225	-
Education, years	14.92 (3.14)	15 (3.32)	11.67 (3.55)	0.001**	SLE-CT<SLE-noCT=HW
SLEDAI	-	1.03 (1.28)	2.59 (3.17)	0.013*	SLE-CT>SLE-noCT
SDI	-	0.22 (0.66)	0.38 (0.73)	0.370	-
Disease duration, years	-	9.92 (8.63)	8.12 (5.92)	0.362	-
Prednisone dosage mg/day	-	-	6.35 (2.74)	-	-
Prednisone duration treatment, years (%)	-	<1year (31.8 %) >1year (50 %) Never: (18 %)	<1year: (4.2 %) >1year: (95.8 %)	-	-
Immunomodulators (%)	-	-	33.3%	-	-

Data are expressed as mean (S.D.). **p ≤ 0.01. *p ≤ 0.05

Psychological characteristics

Table 2 shows psychological characteristics for the three groups. The results showed statistically significant differences in SVI ($p < 0.001$) among the three groups. The SLE-CT group is the most vulnerable to stress (11.33 ± 4.87), followed by SLE-noCT (8.74 ± 5.11) and finally by the healthy women (5.96 ± 3.77).

There were significant differences in the SCL-90 R results for the healthy women when compared with the SLE groups. Both SLE groups scored higher than the healthy women in the following sub-scales: *somatisation* ($p = 0.005$), *obsessions and compulsions* ($p = 0.045$), *depression* ($p = 0.004$), *hostility* ($p = 0.013$). In *phobic anxiety* ($p = 0.005$), *psychoticism* ($p = 0.016$) and *positive symptom total* ($p = 0.001$) the SLE-CT group scored higher than SLE-noCT and healthy women.

Table 2: Psychological characteristics, in healthy women, and SLE-noCT and SLE-CT

Variable	HW (n=50)	SLE-noCT (n=38)	SLE-CT (n=33)	<i>p</i>	Post hoc
Perceived Stress-Scale	22.68 (8.20)	26.32 (8.33)	26.56 (8.20)	0.052	
Stress Vulnerability Inventory	5.96 (3.77)	8.74 (5.11)	11.33 (4.87)	0.001**	SLE-CT>SLE-noCT>HW
<i>Symptom Checklist SCL-90-R</i>					
Somatization	52.80 (9.31)	58.24 (8.01)	59 (10.11)	0.005*	SLE-CT=SLE-noCT>HW
Obsessions and compulsions	55.40 (11.34)	59.65 (7.33)	60.62 (9.84)	0.045*	SLE-CT=SLE-noCT>HW
	54.12 (11.44)	53.65 (10.95)	57.92 (10.24)	0.266	

Interpersonal sensitivity					
Depression	49.30(10.30)	54.97 (9.12)	56.69 (11.08)	0.004*	SLE-CT=SLE-noCT>HW
Anxiety	52.24 (9.72)	55.46 (8.27)	57.38 (10.10)	0.060	
Hostility	48.72 (9.81)	54.41 (9.08)	54.62 (11.92)	0.013*	SLE-CT=SLE-noCT>HW
Phobic Anxiety	43.20 (11.62)	45.43 (12.86)	53.12 (12.82)	0.005*	SLE-CT>SLE-noCT=HW
Paranoia	53.72 (12.91)	52.86 (11.97)	50.92 (10.30)	0.603	
Psychoticism	48.72 (13.19)	53.73 (11.07)	56.96 (11.66)	0.016*	SLE-CT>SLE-noCT=HW
Global Severity Index	42.40 (8.13)	43.57 (3.54)	45.12 (5.65)	0.214	
Positive Symptom Distress Index	55.36 (12.23)	60.70 (9.18)	59.85 (10.31)	0.055	
Positive Symptom Total	45.58 (9.20)	48.92 (7.73)	53.62 (10.07)	0.001**	SLE-CT>SLE-noCT=HW

Data are expressed as mean (S.D.) **. $p \leq 0.01$. *. $p \leq 0.05$

Executive function

The results showed statistically significant results on the IGT (decision-making) between both SLE groups and healthy women ($p = 0.006$). Healthy women (4.08 ± 20.38) scored higher on the decision-making task than SLE-CT (-7.13 ± 18.62) and SLE-noCT (-9.00 ± 23.35) (Figure 1). As the negative value indicates, SLE patients show poorer decision-making regardless of corticosteroid use.

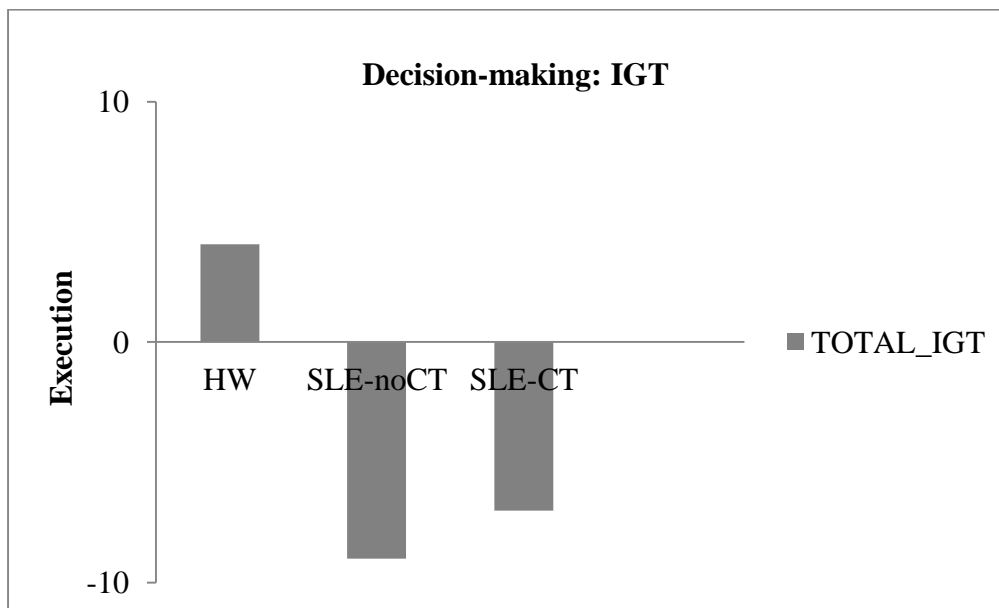


Figure 1: Making decision total in healthy women, and SLE-noCT and SLE-CT

Figure 2 shows the decision-making scores from each of the five trials for the three groups.

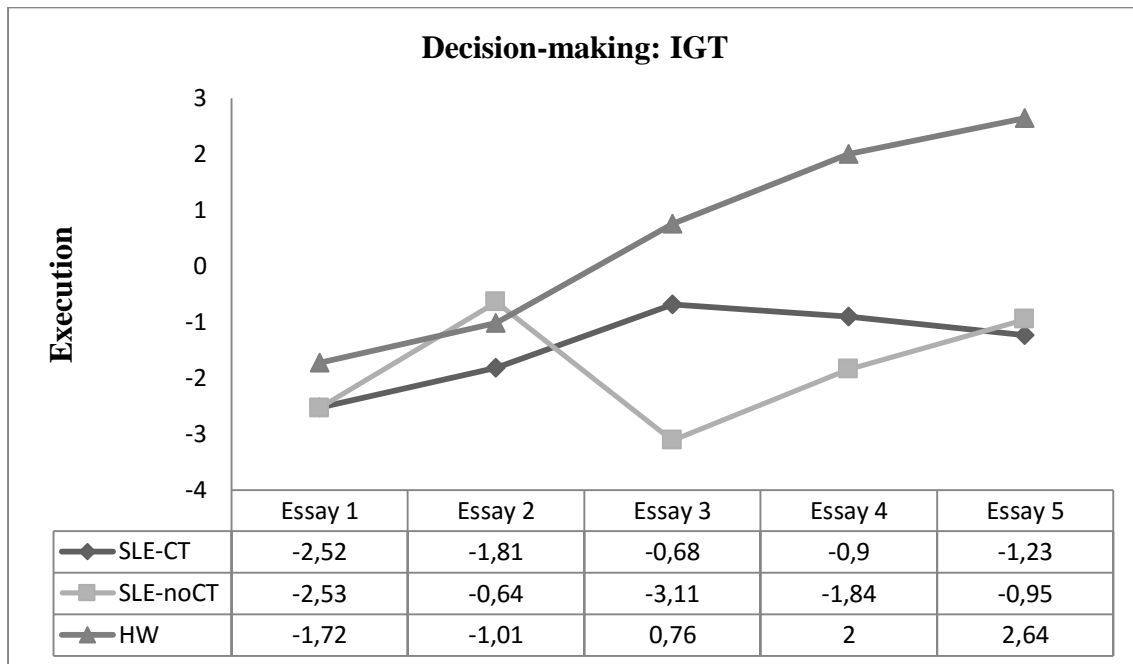


Figure 2: Decision-making in healthy women, SLE-noCT and SLE-CT

Cohen’s coefficient showed high effect on the IGT between healthy women and SLE-CT ($d = 0.67$) and median effect between SLE groups ($d=0.50$). Between healthy women and SLE-noCT groups, it had no effect ($d=0.19$).

Regarding cognitive flexibility, the results showed statistically significant differences on the TMT B/A (cognitive flexibility) among the three groups ($p = 0.030$). SLE-CT (2.57 ± 0.90) showed poorer scores than SLE-noCT (2.18 ± 0.65) and healthy women (2.06 ± 0.60) (Figure 3).

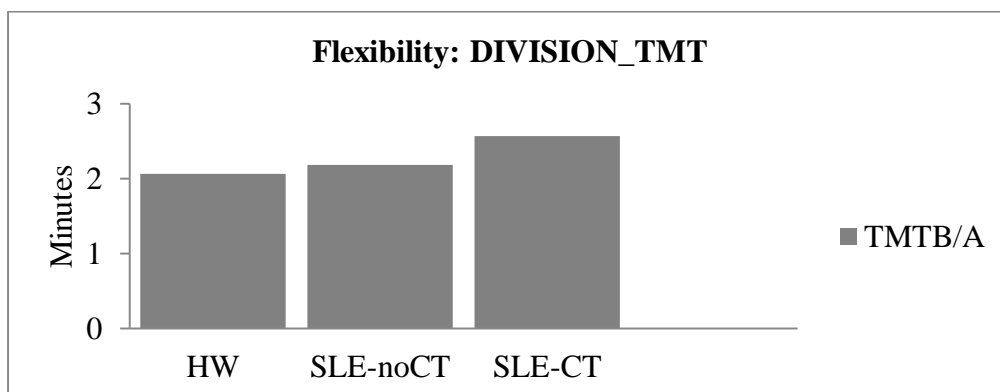


Figure 3: Cognitive flexibility in healthy women, and LES SIN and SLE-CT

Cohen's coefficient showed median effect on the TMT B/A between healthy women and SLE-CT ($d = 0.57$) and between healthy women and SLE-noCT ($d=0.60$). Between SLE groups it had no effect ($d=0.09$).

Finally, no significant correlations were found among psychological stress, psychopathology, SLEAI and SDI or the executive function variables.

7.4. Discussion

The aim of this research was to investigate if corticosteroid use is associated with impairment in two processes of executive function, i.e. cognitive flexibility and decision-making.

To this end, women with SLE receiving corticosteroid treatment, women with SLE not receiving corticosteroid treatment and healthy women were evaluated by testing cognitive flexibility and decision-making by using the Trail Making Test and the Iowa Gambling Task, respectively, while controlling for other variables such as the socio-demographic, clinical and psychological characteristics as well as disease-specific variables.

The results showed that women with SLE make poorer decisions than healthy women, regardless of corticosteroid use. This conduct, therefore, cannot be attributed to the medication. Notwithstanding, when comparing women with SLE receiving corticosteroid treatment with others who are not and with healthy women, a statistically significant difference does exist, namely that the first group scores the lowest. These results are in line with another study in which SLE patients scored higher than the control group on the TMTA and TMTB, thus displaying worse task execution (Niahimura et al., 2015). This also supports various studies reporting that corticosteroid use decreases both declarative and working memory. Furthermore, there are cases of atrophy in the hippocampus (Appenzeller, Carnevalle, Li, Costallat, and Cendes, 2006; Brown, 2009) . All these effects are reversible by lowering the dose or stopping corticosteroid treatment altogether (Brown, Vera, Frol, Woolston, and Johnson, 1997; Keenan, Jacobson, Soleymani, Mayes, and Yaldao, 1996).

The results show lower decision-making scores for both SLE groups. Consequently, we can infer that it is the disease itself and its effects on the nervous system that may be affecting a poor task execution. On the other hand, factors such as disease activity could also be affecting these results. This parameter, however, did not correlate with decision-making or cognitive flexibility in our study. Therefore, decision-making cannot be attributed to disease activity. In this regard, our data coincide with those of other studies reporting that SLEDAI is not a predictive factor of cognitive deficit in SLE (Carbotte, Denburg, and Denburg, 1995; Kozora, Thompson, West, and Kotzin, 1996). It is related indirectly, however, as SLEDAI is a marker of lupus activity, which in some instances requires corticosteroids, a treatment component used for decreasing disease activity. Therefore, controversy remains regarding an association between cognitive impairment and markers of disease activity (Kozora et al., 2008; Nishimura et al., 2015) as some studies find an association (Nishimura et al., 2015; Conti et al., 2012) while others, such as ours, do not (Carbotte et al., 1995; Kozora et al., 2008).

Regarding psychological conditions, there were differences in the majority of the stress and psychopathic symptoms variables between the women with SLE and the healthy women. These results can be expected however, because individuals suffering from a chronic disease experience pain, disability, major side effects from treatment and unpredictable aggravation of the disease, all of which can be extremely stressful and produce anxiety and depression. These results are consistent with other studies that report stress, anxiety and depression as possible factors that deteriorate symptomatology and quality of life in SLE patients (Coín-Mejías et al., 2007; Peralta-Ramírez and Pérez-García, 2007; Peralta-Ramírez et al., 2004; 2009).

When considering the present study and its findings, there are a few limitations that need to be taken into account. This is the first study to analyse the effects of corticosteroids on executive function in women with SLE. In future studies more executive function parameters should be included with a similar sample, such as behaviour production, working memory,

planning and inhibition, in order to assess if there are differences in the remaining executive function processes between women with SLE who receive corticosteroid treatment and others who do not receive corticosteroid treatment. On the other hand, it included high number variables to evaluate psychological characteristics and executive function of the participants; therefore we conducted Cohen's delta analyses to confirm the directionality of the findings. Additionally, our groups did not share the same education levels, however, as this could be important, we did make sure to control for this factor. This variable was included as a co-variable in the TMT and IGT analyses among groups, as we are aware that some studies identify a lower education level as a factor associated with cognitive degeneration in SLE patients (Monastero et al., 2001). At any rate, it is important to highlight the inherent difficulty in achieving equality in clinical populations.

In conclusion, the results from our study show that women with SLE display broader psychopathological symptoms, greater vulnerability to stress and poorer decision-making when compared with healthy women. Furthermore, as cognitive flexibility is lower in women with SLE who receive corticosteroid treatment than in healthy women and in women with SLE who do not receive corticosteroid treatment, the adverse effects of corticosteroid treatment on the cognitive flexibility of the first group should be considered. Whereas most studies have limited their research to the physical effects of corticosteroid treatment, the findings from our study are useful for studying the neuropsychological effects of corticosteroid treatment, as they provide more information regarding side effects, such as poorer decision-making and cognitive flexibility it is recommendable to initiate the use of prednisone only in cases of exacerbation of the disease (flares) and with to the lowest possible dose. In addition, patients should be treated with antimalarials and in the cases where is predictable prolonged treatment with corticoids, starting treatment with corticoids sparing drugs. Therefore, we recommend treatment aimed at avoiding corticoids, if it is possible.

Poor decision-making and diminished cognitive flexibility entail a series of clinical implications for patients that concern doctors, as well as patients and their families, such as inadequate adherence to treatment plans or difficulties making the necessary changes to effectively deal with the disease. These findings are important for the specialised medical professionals caring for these patients, because a better understanding of these cognitive deficits can make a substantial advance towards understanding and even solving some of the different problems encountered on a daily basis. Given our results, we recommend a neuropsychological evaluation before steroids treatment to control effects cognitive level as it is done a registration of blood sugar, blood pressure or control osteoporosis.

CAPÍTULO VIII: “ESTUDIO 4”

Analyses of hair and salivary cortisol for evaluating hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in patients with autoimmune disease

Montero-López, E., Santos-Ruiz, A., González, R., Navarrete-Navarrete, N., Ortego-Centeno, N., Martínez-Augustín, O., Rodríguez-Blázquez, M., y Peralta-Ramírez, M.I. (Under review) Analyses of hair and salivary cortisol for evaluating hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in patients with autoimmune disease. *Psychosomatic Medicine*

“Analyses of hair and salivary cortisol for evaluating hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in patients with autoimmune disease”

8.1. Introduction

The main systemic autoimmune diseases are characterized largely by affecting multiple organs and systems in a single patient, by their unknown etiology, and by periods of disease aggravation alternating with periods of disease inactivity (Jiménez-Alonso et al., 2011).

One of the changes seen in these patients is HPA axis dysregulation (Tzioufas et al., 2008). The HPA axis plays an important role in modulating autoimmune activity by secreting glucocorticoids (Charmandari et al., 2005; Heesen et al., 2007), hormones secreted in response to stress (McEwen, 2000). Psychological stress is also considered one of the main causes for the onset and aggravation of symptoms of various autoimmune diseases (McCray and Agarwal, 2001; Johnson et al., 2006; Peralta-Ramírez, et al., 2004; Stojanovich and Marisavljevich, 2008).

Cortisol, the main hormone produced in response to stress, has been widely used as an HPA axis activity biomarker, and elevated levels of cortisol have been related to important physical and psychological consequences. Traditionally, saliva, blood, and urine analyses are conducted to establish the amount of cortisol segregated at a precise time within the past 24 hours. However, a new procedure has recently been developed that uses the patient's hair for establishing cortisol levels and is thus able to provide information regarding stress levels for up to days or months (Meyer and Novak, 2012) and is considered an objective and retrospective measure of chronic stress (Gow et al., 2010). Furthermore, this technique controls for the variability that evaluating cortisol from a specific point in time supposes, as the results from isolated measures can be easily influenced by individual and environmental characteristics, study procedures (Wolfram et al., 2013), the time of day (Adam et al., 2006), and food consumption (Gibson et al., 1999).

Different studies have investigated HPA axis dysregulation in patients with autoimmune diseases, such as that by Jung et al. (2015), which was the first to evaluate the relation of salivary cortisol levels with depression, stress, and disease activity in patients with SLE compared to healthy controls. The results showed similar levels in perceived stress and salivary cortisol in both groups, but higher levels of alpha-amylase, which represents autonomous nervous system (ANS) function in patients with SLE. These results showed ANS and HPA axis dysregulation in patients with SLE.

Similar results were found in a study by Härle et al. (2006), which measured sympathetic nervous system (SNS) activity through serum neuropeptide Y, and HPA axis activity through serum cortisol and plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH), in patients with SLE, patients with rheumatoid arthritis (RA), and healthy controls. The results showed that patients with SLE and patients with RA had greater SNS activation and lesser HPA axis activation than the healthy controls, and therefore concluded that SNS and HPA axis dysregulation is present in patients with autoimmune disease.

On the other hand, various studies have analyzed HPA axis function in patients with SS by measuring salivary cortisol levels. Van der Goes et al. (2011) compared salivary cortisol levels during the day and the erythrocyte sedimentation rate (ESR) in patients with SLE, patients with SS, and healthy persons. The results showed that SLE and SS patients with high ESR had lower Cortisol Awakening Response (CAR) than patients with low ESR. However, the authors concluded that HPA axis dysfunction in the patients with SLE and SS was not clear, because there were no differences in cortisol levels when compared to healthy persons. In a later study, Miller et al. (2012) evaluated salivary cortisol between 10 and 12 am in patients with SS and healthy persons and found no differences between the two groups.

As we can see, no consensus has been reached regarding HPA axis response in patients with autoimmune disease, because it has not been studied in many specific diseases, and

because the findings from those studies show different directionality regarding activation. Furthermore, the methods used for analyzing salivary cortisol, urine, and plasma show values for isolated measures regarding HPA axis activation, not retrospective measures. From our point of view, researching HPA axis modulation is essential for gaining a better understanding of the relation between psychological stress and autoimmune-disease aggravation.

Consequently, the objective of our investigation has been to study HPA axis activation between women with autoimmune disease compared to healthy women on two levels: by analyzing salivary cortisol during the day as a transverse measure and hair cortisol as a retrospective measure of chronic stress. For the latter, we analyze hair cortisol concentrations from the three preceding months, and psychological stress levels through self-report measures.

8.2. Method

Participants

Sixty-six women participated in this study. Thirty were healthy and had a mean age of 44.70 years ($SD = 11.65$). Thirty-six had an autoimmune disease and a mean age of 47.41 years ($SD = 9.37$). Within this second group, 11 women had SLE, 12 SS, 9 uveitis and 4 SSc.

The healthy women were recruited through posters in public institutions, newspapers, and local radio. The inclusion criteria were age 18–65, literate, and not presenting a physical or mental disease at the time of the study. This information was obtained through a semi-structured interview conducted when the women called to participate in the study.

The women with autoimmune disease were recruited through posters and leaflets in consultation rooms by medical staff from the Systemic Autoimmune Disease Units (Internal Medicine Service) at the Virgen de las Nieves University Hospital and the San Cecilio Clinical Hospital, both located in Granada, Spain. The inclusion criteria were age 18–65, literate, diagnosed according to medical diagnostic criteria with systemic lupus erythematosus,

Sjögren's syndrome, systemic sclerosis, or uveitis, no corticosteroid treatment for a minimum of one year previous to the study, and not presenting psychiatric disorders.

Procedure

A brief interview was conducted by telephone with each woman interested in participating in the study to ensure they met the inclusion criteria for either the healthy group or the autoimmune disease group. Once accepted, the participants were provided information regarding the study. They then read and signed the informed consent form, which had been approved by both hospitals' ethics committees and was in accordance with the recommendations of the Helsinki Declaration. Subsequently, the women were interviewed, and then they completed the perceived stress and psychopathological symptomatology questionnaires.

Afterwards, the procedure for collecting salivary cortisol samples during the day was explained to the participants. They were then given a kit containing 5 Salivette® tubes, a detailed instruction-sheet explaining sample collection, and a record sheet for indicating the time the sample was collected. Finally, a lock of head hair was cut, which upon analysis would provide cortisol levels from the previous 3 months. Two days later the participants were to deliver the salivary cortisol samples to the laboratory.

Instruments

The questionnaires below provide meaningful covariates that were used in the statistical analyses of psychological measures and cortisol levels.

Semi-structured interview: The subjects provided information on socio-demographic factors, daily life and sleep habits, medication, and history of psychiatric or psychological treatment.

Perceived Stress Scale (PSS) (Cohen, Kamarak, and Mermeistein, 1983; Spanish adaptation by Remor and Carrobbles, 2001): The PSS is a self-report scale used to evaluate

perceived stress levels and the degree to which people find their lives unpredictable, uncontrollable, or overwhelming (aspects that contribute to stress). The PSS consists of 14 items with five response alternatives. The highest score corresponds to the highest perceived stress level. The Spanish version of the PSS (14 items) has adequate reliability (internal consistency=0.81 and test-retest=0.73), concurrent validity, and sensitivity (Remor, 2006). Here, we considered scores over 22 (i.e., the mean score for the Spanish population; Remor and Carrobes, 2001) as reflecting high levels of perceived stress.

SCL-90-R Symptoms Inventory (Derogatis, 1994; Spanish adaptation by Gonzalez de Rivera et al., 1988): This self-report questionnaire was developed to assess symptoms of psychopathology and includes 90 items with five response alternatives (0-4) on a Likert scale. Subjects respond according to how they have felt within the past seven days, including the day the inventory is administered. The inventory is scored and interpreted according to nine main dimensions (somatization, obsessive-compulsive symptoms, interpersonal sensitivity, depression, anxiety, hostility, phobic anxiety, paranoid ideation, and psychoticism) and three global indices of psychological distress (Global Severity Index [GSI], Positive Symptom Total [PS], and Positive Symptom Distress Index [PSDI]). In this study, these last three global indices were analyzed. This instrument demonstrates satisfactory levels of reliability and validity (De las Cuevas et al., 1991).

Stress measures

Measurement of cortisol during the day

Salivary cortisol sample-collection was performed using a Salivette® Cortisol kit (Sarstedt, Numbrecht, Germany, Ref.51.1534), which consists of two small tubes, one which contains a small piece of cotton. Participants chewed the cotton for approximately 60 seconds, after which it was placed back into the same tube for analysis. Samples were analyzed at the San Cecilio Clinical Hospital using the electrochemiluminescence immunoassay “ECLIA”

method. This method was designed for use in Roche Elecsys 1010/2010 automated analyzers with the Elecsys MODULAR ANALYTICS E170 module.

To assess cortisol patterns during the day, each participant collected five samples of their salivary cortisol. The first sample (Cortisol 1) was collected 30 minutes after waking up (while still fasting), the second (Cortisol 2) at +4 hours, the third (Cortisol 3) at +8 hours, the fourth (Cortisol 4) at +12 hours, and the fifth (Cortisol 5) at +16 hours. During the half hour preceding each sample collection, the participants could not have anything to eat or drink except water and were not allowed to smoke.

Measurement of hair cortisol

Hair samples consisting of approximately 150 strands of hair were collected from the posterior vertex. The hair was cut with scissors as close to the scalp as possible. The hair was then wrapped in a piece of aluminum foil to protect it from light and humidity and stored in an envelope at room temperature. Later, the samples were sent for analysis to the Faculty of Pharmacy at the University of Granada.

In our study, hair segments proximal to the scalp with a length no greater than 3 cm were collected (assuming an average growth rate of 1 cm/month, a 3 cm segment contains cortisol that has been deposited over approximately the last 3 months). The sample was weighed and ground to a fine powder to break up the hair's protein matrix and increase the surface area for extraction using a ball mill (Bullet Blender Storm, Swedesboro NJ, USA). Cortisol from the interior of the hair shaft was extracted into HPLC-grade methanol by incubation of the sample for 72 hours at room temperature in the dark with constant inversion using a rotator. After incubation, the supernatant was evaporated until completely dry using a vacuum evaporator (Centrivac, Heraeus, Hanau, Germany) and the extract was reconstituted in 150 μ L of phosphate buffered saline (PBS) at pH 8.0. The reconstituted sample was immediately frozen at -20°C for later analysis (Sauvé, 2007; Chen et al., 2013; Meyer et al., 2014).

The hair cortisol sample was measured using the Salivary ELISA Cortisol kit© (Alpco Diagnostics®, Windham, NH) as per the manufacturer's directions with the reagent provided.

Statistical analyses

Student's *t*-tests were conducted to control for differences between both groups (the autoimmune disease group and the healthy group) regarding socio-demographic variables (age and education level) and psychological variables (SLC-90-R and PSS).

A mixed 2×5 ANOVA was then conducted to check for statistically significant differences between both groups regarding cortisol levels during the day. The first factor includes two levels (healthy group and autoimmune disease group) between the independent groups. The second was a repeated-measures within-subject factor at five time points: (Cortisol 1) collected 30 minutes after waking up (while still fasting), (Cortisol 2) at +4 hours, (Cortisol 3) at +8 hours, (Cortisol 4) at +12 hours, and (Cortisol 5) at +16 hours. The Greenhouse-Geisser Correction was applied in the repeated-measures analyses.

Further, the area under the total response curve with respect to ground (AUCg) was measured in all participants, which provided information regarding the changes that resulted during observation of the dependent variable (cortisol levels during the day). The AUCg was calculated using the trapezoid formula from Pruessner et al. (2003). A Student's *t*-test was carried out to check for differences between both groups concerning AUCg.

Finally, a Student's *t*-test was conducted to check for differences in hair cortisol levels between both groups. All data were analyzed with SPSS version 20.

8.3. Results

Sample description

Table 1 presents the participants' socio-demographic and psychological variables. Socio-demographic, perceived stress, and psychopathological symptomatology variables are comparable for both groups, except in the SCL-90-R somatization subscale, in which the autoimmune disease group shows higher scores than the healthy group.

Table 1: Means and standard deviations (SD) of socio-demographic and psychological variables for the participants in both groups.

Measures	Healthy Group (<i>n</i> = 30)	Autoimmune Group (<i>n</i> = 36)	<i>t</i>	<i>p</i>
	Mean (SD)	Mean (SD)		
Age (years)	44.70 (11.65)	47.41 (9.37)	0.23	.64
Education (years)	15.33 (3.57)	15.26 (3.10)	0.01	.93
Perceived Stress Scale	25.47 (5.93)	27.11 (9.91)	0.59	.44
<i>Symptom Checklist SCL-90-R</i>				
Somatization	51.73 (27.48)	75.48 (23.41)	11.63	.001*
Obsessions and compulsions	78.43 (21.97)	77.72 (26.72)	0.01	.91
Interpersonal sensitivity	71.33 (28.21)	68.04 (35.78)	0.15	.70
Depression	66.77 (28.46)	65.28 (34.30)	0.03	.86
Anxiety	71.07 (20.75)	66.64 (31.51)	2.16	.15
Hostility	65.97 (22.85)	62.92 (33.16)	0.16	.69
Phobic Anxiety	48.37 (38.77)	54.32 (38.93)	0.32	.57
Paranoia	65.27 (32.75)	55.40 (38.28)	1.06	.31
Psychoticism	69.43 (32.74)	62.32 (36.74)	0.58	.45

Note: *t*: t-student value; **p* ≤ 0.05.

Cortisol during the day

The statistical analyses show that there was no significant time \times group interaction effect. Regarding the levels of cortisol during the day, the analyses between groups showed significant differences in Cortisol 2 ($F_{(1,50)} = .339$; $p = .010$); namely, higher levels in the autoimmune disease group ($M = 8.04$ nmol/L; $SD = 2.88$) than in the healthy group ($M = 5.78$ nmol/L; $SD = 3.13$). Significant differences between groups were also found in Cortisol 5 ($F_{(1,50)} = 1.081$; $p = .035$): higher levels of cortisol in the autoimmune disease group ($M = 5.70$ nmol/L; $SD = 2.60$) than in the healthy group ($M = 3.69$ nmol/L; $SD = 3.74$). See Figure 1.

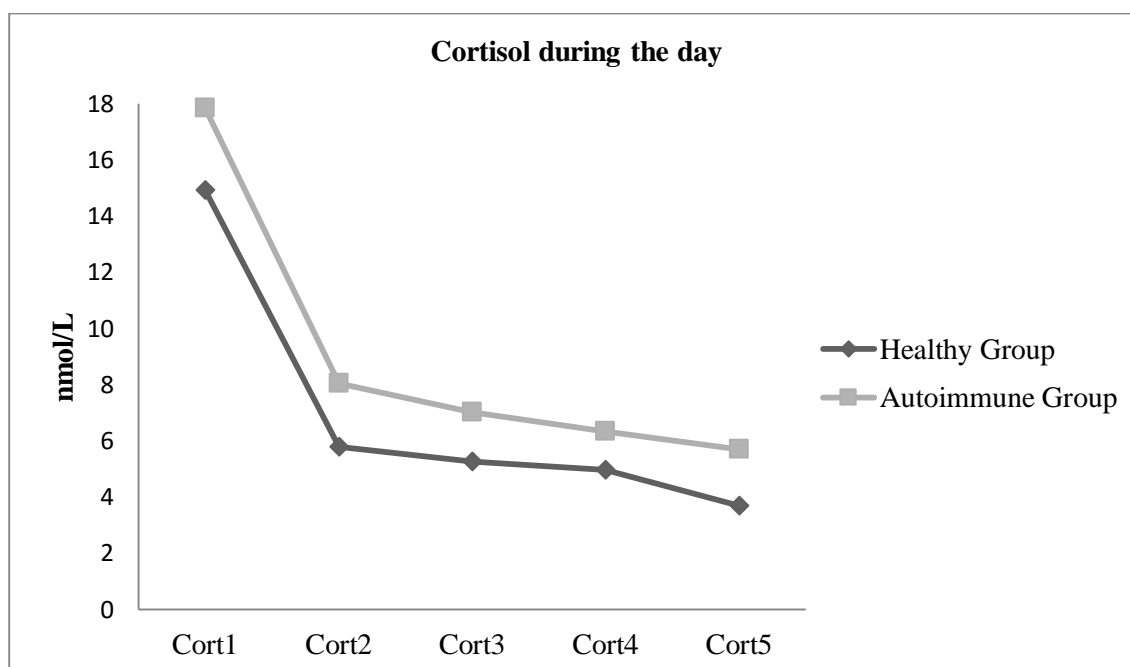


Figure 1: Cortisol during the day in the healthy group and in the autoimmune disease group. *Note:* Cort1: Cortisol 1; Cort2: Cortisol 2; Cort3: Cortisol 3; Cort4: Cortisol 4; Cort5: Cortisol 5.

Regarding the AUCg cortisol levels, statistically significant differences were found ($F_{(1,50)} = .001$; $p = .016$): the autoimmune disease group showed higher levels than the healthy group. See Figure 2.

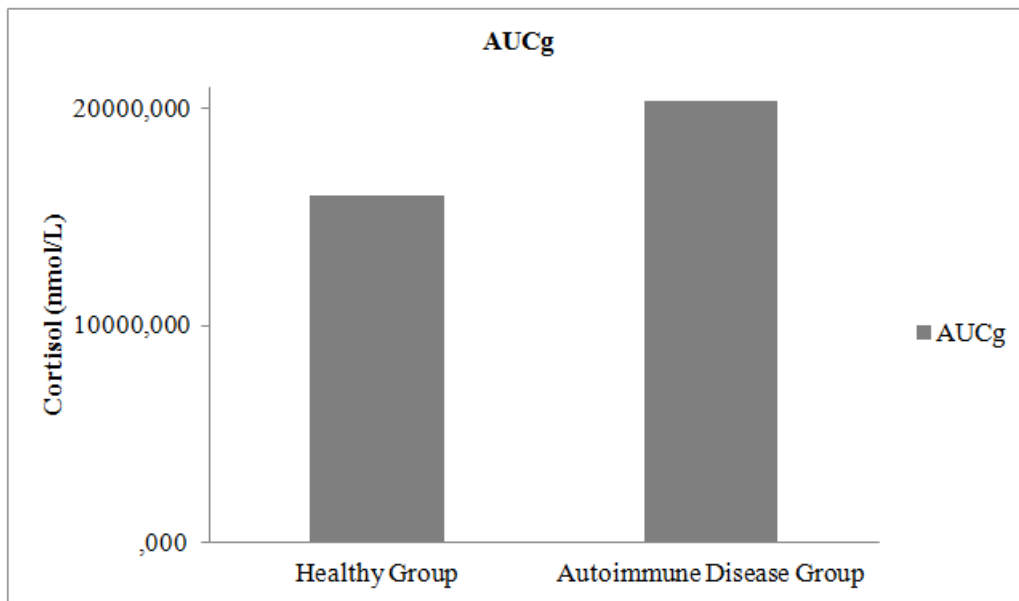


Figure 2: Cortisol 1, Cortisol 2, Cortisol 3, Cortisol 4 and Cortisol 5 values calculated as area under the curve with respect to ground for the healthy group and for the autoimmune disease group. Note: AUCg: Area under the curve with respect to ground.

Hair cortisol

The results showed statistically significant differences between both groups regarding hair cortisol concentrations ($F_{(1,66)} = 11.296$; $p = .001$); namely, the autoimmune disease group ($M = 205.46$ pg/mg; $SD = 154.83$) showed higher concentrations than the healthy group ($M = 95.18$ pg/mg; $SD = 99.74$). See Figure 3.

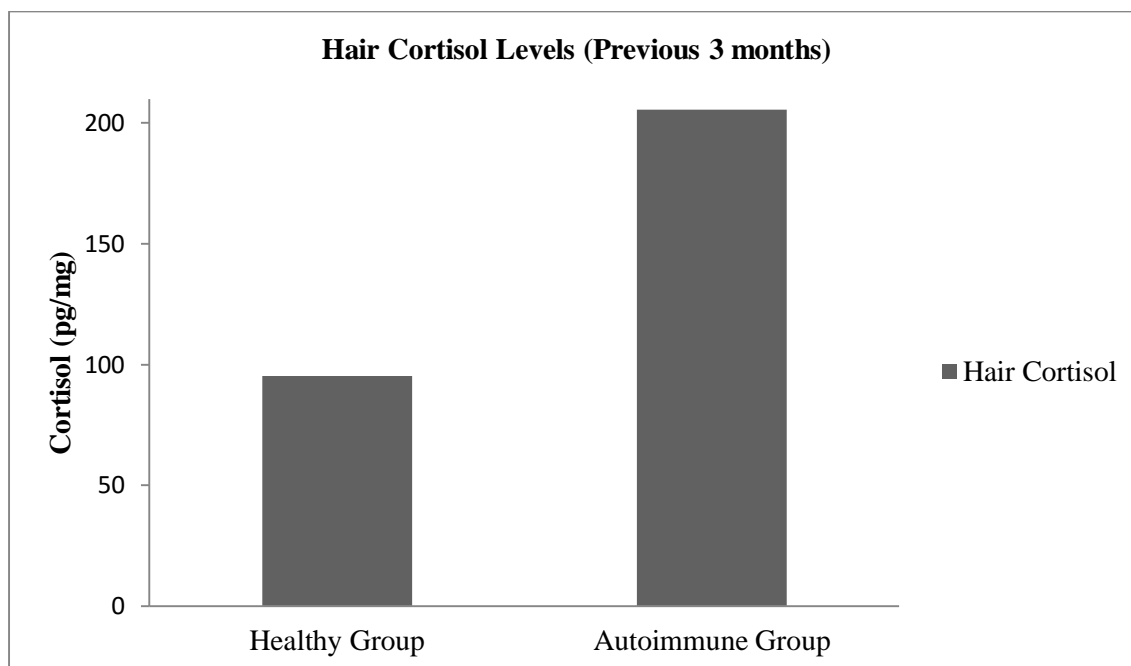


Figure 3: Hair cortisol levels from the previous three months for the healthy group and the autoimmune disease group.

8.4. Discussion

The objective of our research was to study HPA axis activation among women with autoimmune disease compared to healthy women on two levels: by analyzing the salivary cortisol levels during one day as a transverse measure and hair cortisol as a retrospective measure of chronic stress. For the latter, we analyzed hair cortisol measures containing concentrations from the three preceding months, and psychological stress levels through self-report measures.

All socio-demographic and psychological variables were comparable for both groups, except in the somatization subscale, in which the autoimmune disease group showed higher scores, which is foreseeable when comparing healthy persons to others with disease. The results regarding HPA axis activation, however, showed significant differences in cortisol levels during the day and in AUCg; specifically, higher levels in the autoimmune disease group than in the healthy group. These results indicate HPA axis hyper-activation in patients with

autoimmune disease that could be caused by the dysregulated immune system present in these diseases.

Similarly, Jung et al. (2015) found that patients with SLE had higher levels of alpha-amylase than healthy controls. Notwithstanding, no differences in salivary cortisol levels were found between patients with SLE and healthy controls; however, unlike our study, the patients with SLE who participated in that study were undergoing corticosteroid treatment, and that could affect the results and how HPA axis activation was interpreted in those SLE patients. The differences in results between both studies could be explained by the fact that our study included patients with other autoimmune diseases in addition to patients with SLE, and none of our patients had received corticosteroid treatment for a minimum of one year preceding the study, so as to guarantee elimination of corticosteroids in the patients' systems and the hypertrophy of the adrenal glands that results from corticosteroid use (Ruiz-Arruza et al., 2014).

On the other hand, our results differ from those of Tzioufas et al. (2008) and Johnson et al. (2006), whose studies showed basal ACTH and cortisol levels significantly lower in patients with SS than in healthy controls. These results are probably caused by only using isolated measures of cortisol for evaluating the HPA axis, measures influenced by each individual's circadian rhythms (Johnson et al., 2006).

The evaluation of salivary cortisol was also used in a study by van der Goes et al. (2011) concerning patients with primary SS and patients with SLE. This study found that the ESR modulated HPA axis activation in those patients, thus patients with elevated ESR had lower CAR than patients with low ESR. In our study we did not evaluate the ESR, however, this variable could explain the differences in cortisol levels during the day between the autoimmune disease group and the healthy group.

Regarding hair cortisol levels accumulated during the preceding three months, the results showed the same as those for salivary cortisol levels; namely, that cortisol levels were

higher in women with autoimmune disease than in healthy women. As the psychological stress and psychopathological symptomatology variables were comparable in both groups, the results point toward elevated HPA axis activity in women with autoimmune disease. In this regard, ours is the first study to include salivary and hair cortisol measures for evaluating and comparing HPA axis activation in women with autoimmune disease who are not undergoing corticosteroid treatment, with healthy women.

Our results concerning salivary cortisol and hair cortisol indicate that the autoimmune disease group presents HPA axis hyper-activity; the HPA axis behaves similarly both long and short-term and its activity is greater in women with autoimmune disease than in healthy women. These findings are similar to those from studies included in the review by Meyer and Novak, (2012), in which long-term HPA axis activity measured by hair cortisol levels and short-term HPA axis activity measured by salivary cortisol are related under certain conditions.

Considering our results, it would be interesting to evaluate a larger sample of patients with autoimmune disease with a broader scope of autoimmune pathologies, as well as other hormones, such as alpha-amylase, that are directly involved in regulating the HPA axis and sympathetic adrenomedullary system (SAM), as both of these are key components in the response to stress and carry out an important modulator role in the immune system.

The results from our research confirm, through higher levels of cortisol during the day and higher hair cortisol concentrations from the preceding three months, greater long and short-term HPA axis activation in women with autoimmune disease than in healthy women. Perceived stress and psychopathological symptomatology levels do not influence this hyper-response, because those variables were comparable in both groups. These findings provide novel information on HPA axis behavior in persons with autoimmune disease.

CAPÍTULO IX: “ESTUDIO 5”

**Mecanismos explicativos del empeoramiento de las pacientes autoinmunes a causa del
estrés psicológico**

“Mecanismos explicativos del empeoramiento de las pacientes autoinmunes a causa del estrés psicológico”

9.1. Introducción

Actualmente, se ha producido un incremento en el interés de la relación entre estrés psicológico y enfermedades autoinmunes (McCray y Agarwal, 2011). Diferentes revisiones y estudios muestran la relación del estrés psicológico con factores tanto hormonales como etiológicos en la patogenia de la enfermedad autoinmune (Jessop, Richards, y Harbuz, 2004; Sapolsky, Romero, y Munck, 2000; Shoenfeld y cols., 2008). Una característica común a todas ellas, es el efecto exacerbador que tiene el estrés empeorando la sintomatología de las mismas, y otras veces, precipitando la enfermedad (Stojanovich, 2010). Este efecto ha sido investigado en lupus eritematoso sistémico (LES), y en otras enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjögren (SS) y la esclerosis sistémica (SSc), entre otras.

Los principales resultados de estudios sobre el efecto del estrés en LES, muestran que el estrés cotidiano, y no los eventos vitales estresantes se relacionan con empeoramiento de la sintomatología (Pawlak y cols., 2003; Peralta-Ramírez y cols., 2004). Además, las fluctuaciones en la cantidad de estrés y su interacción con el gen 5-HT1A-1019G alelo, se relacionan en mayor grado con dicho empeoramiento, y no tanto con un alto estrés mantenido y prolongado (Birmingham y cols., 2006). Asimismo, se ha comprobado que ante situaciones de estrés, se produce una alteración en el patrón de respuesta inmunológica en pacientes con LES versus personas sanas (Jung, Nam, Kim, and Suh, 2015; Roussou, Iacovou, Weerakoon, y Ahmed, 2013; Takahashi y cols., 2014).

Con respecto al SS, los estudios muestran que antes del inicio de la enfermedad, los niveles de estrés de los pacientes son elevados y pueden estar causados por sucesos vitales negativos, experiencias adversas en la infancia y/o ausencia de estrategias de afrontamiento adaptativas, presentando mayor tasa de trastornos psicológicos en comparación con pacientes

con LES y personas sanas (Hyphantis, Mantis, Voulgari, Tsifetaki, y Drosos, 2010; Shelomkova y cols., 2013). Además, suelen presentar dificultades de adaptación a sucesos vitales estresantes siendo un factor de riesgo de padecer trastornos mentales (Andersson, Manthorpe, and Theander, 2001; Karaiskos y cols., 2009; Sjögren, Leanderson, y Kristenson, 2006).

Los estudios que existen sobre los efectos del estrés en SSc, coinciden en que el estrés es un factor de riesgo del inicio y exacerbación de la enfermedad; al igual que ocurre en el LES y el SS (Chen, Huang, Qiang, Wang, y Han, 2008; Hui, Johnston, Brodsky, Tafur, y Kim Ho, 2009; Matsuura y cols., 2011; Newton, Thombs & Groleau, 2012).

Sin embargo, a pesar de la evidencia del efecto del estrés en las enfermedades autoinmunes, los mecanismos subyacentes al empeoramiento de esta enfermedad no están claros (Freirer y cols., 2010). Diferentes estudios han presentado conclusiones divergentes sobre el grado de activación del sistema nervioso simpático (SNS) y del eje hipotalámico-hipofisario adrenal (HHA), principales ejes implicados en la respuesta al estrés. Por un lado, la activación del SNS en respuesta al estrés en enfermedades autoinmunes, ha mostrado ser similar a la de personas sanas (Finan & Zautra, 2013; Glück y cols., 2000; Hogarth y cols., 2002) incluso algunos estudios han mostrado una mayor activación del tono simpático en reposo en autoinmunes (Straub, Dhabhar, Bijlsma, y Cutolo, 2005).

Con respecto al eje HHA, según la hipótesis de Munck, Guyre, y Holbrook (1984) cuando hay una adecuada secreción de glucocorticoides, se produce un aumento de la inmunidad innata, como respuesta adaptativa al estrés; sin embargo, en situaciones en las que no hay una inmunosupresión adecuada, no se restablecen los niveles basales inmunológicos, lo que puede conducir a la autoinmunidad debido a una desregulación entre el SNS y el eje HHA. En esta línea, hay estudios que afirman que a causa del estrés se altera el eje HHA, produciendo resistencia a los glucocorticoides y un desequilibrio de las citoquinas, que explicaría las recaídas

de las enfermedades autoinmunes y secreción inadecuada de cortisol (Delevaux, Chamoux, and Aumaître, 2013; Schubert y cols., Pool y cols., 2004; Shalimar, Deepak, Bhatia, Aggarwal, and Pandey, 2006; Silverman y Sternberg, 2012; Van der Goes y cols., 2011). Sin embargo, no hay un consenso unánime en estos resultados ya que en un estudio posterior no se han encontrado estos desequilibrios (Finan & Zautra, 2013). Esto podría explicarse a través del estudio de Straub (2014) donde la activación del eje HHA en pacientes con artritis reumatoide (AR) era similar a personas sanas, no siendo estos los resultados esperados, puesto que son pacientes con inflamación. Debido a esta activación similar que tienen los pacientes con AR del eje HHA, el SNS se activa de forma crónica, para compensar, lo produce una desincronización entre ambos ejes. Esta desincronización está mediada por un control neuroendocrino inmunológico (Straub, Cutolo, Buttgereit, and Pongratz, 2010).

En definitiva, no existe conclusión unificada sobre el comportamiento de los mecanismos inmunológicos implicados en la respuesta al estrés, causantes de las exacerbaciones de las enfermedades autoinmunes (Freirer y cols., 2010). Por tanto, el objetivo de nuestro estudio fue estudiar cómo interactúan los ejes de respuesta al estrés en mujeres con LES, SS y SSc con respecto a mujeres sanas evaluando; por un lado el SNS, mediante la conductancia dérmica, y por otro el eje HHA, mediante el cortisol en saliva. Esta evaluación se llevará a cabo en una situación de estrés de laboratorio para medir estrés agudo. En segundo lugar, se evaluará el estrés cotidiano mediante niveles de cortisol en saliva diurnos y diferentes cuestionarios.

9.2. Método

Pacientes

En este estudio han participado noventa y siete mujeres: 37 mujeres controles sanas (CS), 21 mujeres con SS (SS), 21 mujeres con LES (LES) y 18 mujeres con SSc (SSc). Las mujeres de los tres grupos autoinmunes estaban diagnosticadas por el personal médico y eran

pacientes de la Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (Servicio de Medicina Interna) en el Hospital Universitario "Virgen de las Nieves" y el "Hospital Clínico San Cecilio" de Granada, España. Los criterios de inclusión para las mujeres autoinmunes fueron: ser mayor de edad, saber leer y escribir, no presentar trastornos psicológicos severos y no haber recibido tratamiento corticoideo durante al menos un año anterior al estudio. Las mujeres sanas, presentaron los mismos criterios de inclusión, excepto presentar enfermedad física. Todas las participantes leyeron la hoja informativa del estudio y firmaron el consentimiento informado para participar en este estudio, que fue aprobado por el comité ético y llevado a cabo conforme con la Declaración de Helsinki.

Instrumentos

Entrevista semiestructurada: Para recogida de datos sociodemográficos, clínicos y criterios de inclusión del estudio.

Inventario de Vulnerabilidad al Estrés (VE) (Beech, Burns, y Scheefield, 1986; en versión española validada por Robles-Ortega, Peralta-Ramírez y Navarrete-Navarrete, 2006): Evaluó la predisposición a ser afectados por el estrés percibido.

Escala de Estrés Percibido (EEP) (Cohen, Kamarak, and Mermeistein, 1983; adaptación española de Remor & Carrobles, 2001): Evaluó el nivel de estrés percibido y el grado en que las personas encuentran que sus vidas son impredecibles, incontrolables o abrumadoras.

Inventario de síntomas SCL-90-R (Derogatis, 1994; adaptación española por González de Rivera y cols., 1988): Evaluó síntomas psicopatológicos en nueve dimensiones específicas (somatización, obsesión-compulsión, sensibilidad interpersonal, depresión, ansiedad, hostilidad, ansiedad fóbica, ideación paranoide y psicoticismo).

Cuestionario SF-36 (Ware & Sherbourne, 1992; adaptación española de Alonso, Prieto y Antó, 1995): Compuesto por 36 ítems que miden ocho dimensiones (función física, función

social, rol físico, dolor corporal, salud mental general, rol social, vitalidad y percepción de la salud general).

Cuestionario de Slater-Usuh-Steed (SUS) (Usuh, Catena, Arman y Slater, 2000): Evaluó la sensación presencia al entorno virtual.

Trier Social Stress Test adaptada a la realidad virtual (TSST-RV)

Es una tarea de estrés psicosocial utilizada en laboratorio para investigar la respuesta al estrés. En el presente estudio se utilizó la adaptación de la TSST (Kirschbaum y cols., 1993) a un entorno de realidad virtual, ya utilizada en el Estudio 1 de esta tesis doctoral y en estudios anteriores por nuestro grupo de investigación (Montero-López y cols., 2016; Santos-Ruiz y cols., 2010; Santos-Ruiz y cols., 2012).

Evaluación de la reactividad simpática: Conductancia dérmica

La conductancia dérmica se registró por medio de dos electrodos de tamaño estándar Ag/AgCl, en la palma de la mano, y conectados a Biopac MP150WSW. Los datos fueron registrados antes de TSST-VR (medida basal de 5 minutos) y durante tres períodos de la visualización de los escenarios virtuales: estrés anticipatorio (5 minutos), discurso (5 minutos) y tarea aritmética (5 minutos).

Evaluación del eje HHA: Cortisol en saliva

Para evaluar la respuesta al estrés agudo se recogieron cinco muestras de cortisol en saliva mediante Salivette® (Sarstedt, Numbrecht, Alemania, Ref.51.1534). Se analizaron en el laboratorio del hospital Clínico San Cecilio, utilizando el método de electroquimioluminiscencia inmunoensayo "ELISA". La primera muestra se recogió después de 30 minutos de la llegada al laboratorio (cortisol basal = C1). Más tarde, tras las instrucciones de la TSST-VR se obtuvo la segunda muestra (cortisol pre-exposición = C2). Posteriormente, la tercera muestra (cortisol después de la exposición = C3) se recogió tras la finalización de

TSST-VR. Las muestras cuarta y quinta se obtuvieron diez minutos (C4) y veinte minutos (C5) después de la finalización de la TSST-RV.

Para evaluar los patrones de cortisol diurno, cada participante recogió cinco muestras de su cortisol salivar. La primera muestra (CD1) se recogió 30 minutos después del despertar (en ayunas), y el resto de muestras cada cuatro horas (CD2, CD3, CD4, y CD5), a lo largo del día hasta la hora de acostarse. Las participantes fueron instruidas para no comer, fumar o beber, excepto agua, durante la media hora anterior a cada toma de muestra.

Procedimiento

El estudio se programó de acuerdo a la curva de cortisol diurno, entre las 15:00-18:00 horas, cuando los niveles de cortisol en la saliva son más estables en población española (Santos-Ruiz y cols., 2010).

Una vez que las participantes llegaron al laboratorio, se les informó sobre el experimento y se les proporcionó el formulario de consentimiento para ser leído y firmado. El protocolo de inducción al estrés se puede observar en la Figura 1.

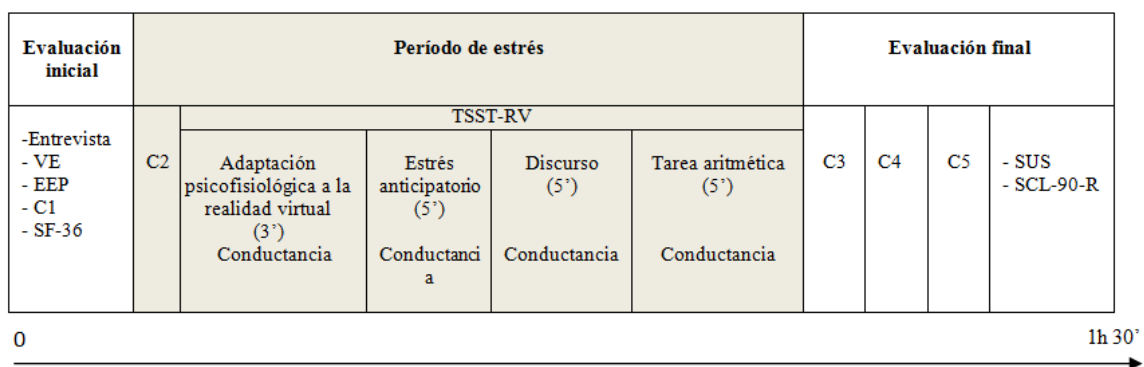


Figura 1: Diagrama del protocolo de la TSST-RV. *Nota:* VE: Inventario de Vulnerabilidad al Estrés; EEP: Escala de Estrés Percibido; C1: cortisol basal; C2: cortisol pre-exposición; TSST-RV: Trier Social Stress adaptada a realidad virtual; C3: cortisol medido después de la exposición; C4: cortisol medido 10 minutos después de la exposición al estresor; C5: cortisol medido 20 minutos después de la exposición al estresor; SUS: cuestionario de presencia virtual.

Al finalizar la tarea, se les explicaba el procedimiento a seguir, para la recogida de muestras diurnas de cortisol en saliva, proporcionándoles un kit de 5 salivettes, una hoja con

las instrucciones de recogida y una hoja de registro horario. Se les explicaba que durante un día (desde que se despertaran hasta la hora de acostarse), se recogerían muestras de saliva para medir sus niveles de cortisol diurno. Para evaluar los patrones de cortisol diurno, cada participante recogió cinco muestras de su cortisol salivar.

Análisis estadísticos

En primer lugar para comprobar si había diferencias entre los cuatro grupos (variable independiente) y edad, escolaridad, puntuaciones obtenidas en los cuestionarios psicológicos administrados y el cuestionario de realidad virtual (variables dependientes) se llevaron a cabo diferentes análisis de varianzas (ANOVAs).

Para comprobar si existían diferencias en la conductancia durante los tres momentos de TSST-RV (estrés anticipatorio, discurso y tarea aritmética) y los cuatro grupos, se realizó un ANCOVA 4x3. La medida basal de conductancia fue incluida como covariable.

Para comprobar si había diferencias entre los cuatro grupos, CS, SS, LES y SSc en la activación del eje HHA ante la TSST-RV, en los diferentes momentos de recogida de las muestras de cortisol durante la TSST-RV (C2, C3, C4 y C5) se llevó a cabo un ANCOVA 4x4. El C1 fue incluido como covariable.

Para analizar si había diferencias entre los cuatro grupos de participantes y los niveles de cortisol diurno (CD1, CD2, CD3, CD4 y CD5) se realizó un ANOVA mixto 4x5.

En todos los análisis de medidas repetidas se aplicó la corrección de Greenhouse-Greisser, y en los análisis en los que se encontró interacción, se realizó una comparación intragrupo mediante el estadístico de Bonferroni, para comprobar si existían diferencias en cada uno de los momentos evaluados en los cuatro grupos de forma individualizada o entre sujetos en los niveles de cortisol diario.

Además, para los niveles de cortisol en la TSST-RV y los niveles de cortisol diurno, se calculó mediante la fórmula trapezoide de Pruessner y cols. (2003) el *área bajo la curva de*

respuesta total con respecto al suelo (AUCg) que proporciona información acerca de los cambios que se produjeron durante la observación de la variable dependiente (niveles de cortisol). Se midió también, el *área bajo la curva con respecto al incremento* (AUCi), que proporciona información de la intensidad global con la que se produjeron los eventos registrados. Una vez calculados, se realizaron diferentes ANOVAs para comprobar diferencias entre los 4 grupos (CS, SS, LES y SSc) en el AUCg y AUCi.

9.3. Resultados

Descripción de la muestra

Los datos sociodemográficos, psicológicos y de grado de presencia virtual de cada grupo se encuentran en la Tabla 1. Los grupos mostraron diferencias entre variables sociodemográficas como la edad y la escolaridad, así como en somatización y depresión y diferentes escalas de calidad de vida.

Tabla 1: Medias y desviaciones típicas de los datos sociodemográficos, psicológicos y de realidad virtual de los cuatro grupos de comparación.

Variables	Grupo CS <i>M±DT</i>	Grupo SS <i>M±DT</i>	Grupo LES <i>M±DT</i>	Grupo SSc <i>M±DT</i>	F	p	Post- hoc
1. Sociodemográficas:							
Edad (años)	36,31±9,31	48,95±10,35	40,38±7,46	50,28±10,30	21,22	0,001*	CS, LES≠SS, SSc
Escolaridad (años)	17,19±2,92	14,86±3,76	16,05±2,52	12,94±4,12	10,99	0,001**	MS≠SSc
Tabaco (%)	40,62 %	14,28 %	38,09 %	5,55 %	1,74	0,066	-
2. SCL-90-R:							
Somatización	51,50±11,53	64,05±10,52	56,62±7,48	58,29±11,11	5,95	0,001**	CS≠SS, LES, SSc
Obsesión/compulsión	53,13±12,61	61,16±12,64	58,86±7,92	61,35±8,71	3,17	0,028	-
Sensitividad interpersonal	50,78±11,7	58,26±12,89	54,62±13,54	56,47±10,60	1,72	0,168	-
Depresión	48,34±9,59	57,84±13,76	54,29±10,26	57±11,68	3,83	0,013*	CS≠SS
Ansiedad	50,88±10,07	58,26±11,37	55,19±10,40	53,24±9,78	2,11	0,104	-
Hostilidad	48±9,01	54,53±10,92	52,76±9,61	51,47±10,93	1,98	0,122	-
Ansiedad fóbica	41,78±11,68	51,16±16,03	46,14±12,70	48,94±14,18	2,25	0,087	-
Paranoia	48,09±12,70	55,47±11,95	51,19±13	50,41±10,35	1,46	0,230	-
Psicoticismo	45,63±12,02	55,21±14,05	53,76±11,84	54,29±10,28	3,61	0,016*	CS≠SS
3. Estrés:							
Inventario Vulnerabilidad al estrés	6,06±4,08	11,14±5,95	9,14±5,48	9,08±4,88	4,61	0,005*	CS≠SS
Escala de Estrés percibido	21,69±7,65	27±10,48	27,19±8,96	26,22±10,84	2,16	0,098	-
4. SF-36:							

Función física	94,50±19,40	67,14±29,85	77,38±23,69	62,65±26,64	9,66	0,001**	CS≠SS, SSc
Función social	83,33±22,82	60,71±27,18	64,88±28,12	58,89±25,68	4,89	0,003	CS≠SS, SSc
Rol físico	91,67±21,10	48,81±49,03	47,62±43,95	36,76±46,03	9,58	0,001**	CS≠SS, LES, SSc
Dolor corporal	75,86±22,63	42,10±23,35	50,52±27,96	50,47±29,32	8,50	0,001**	CS≠SS, LES, SSc
Salud mental general	69,73±11,77	53,90±22,50	57,14±19,27	56,94±20,61	3,91	0,011*	CS≠SS
Rol social	62,22±40,80	49,21±46,69	50,79±49,01	52,94±47,22	0,44	0,728	-
Vitalidad	60,50±16,15	43,10±24,41	47,62±19,40	38,53±24,92	5,06	0,003*	CS≠SS, SSc
Percepción de salud general	75,33±15,47	39,48±21,92	50,33±19,27	38,88±18,41	21,43	0,000**	CS≠SS, LES, SSc
5. Realidad virtual:							
SUS (Presencia virtual)	4,41±1,74	4,49±2,06	4,49±1,68	3,07±1,98	0,838	0,475	-

Nota: Grupo CS=mujeres control sanas; grupo SS=mujeres con síndrome de Sjögren; grupo LES=mujeres con lupus; grupo SSc= mujeres con esclerosis sistémica; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$

Reactividad simpática: Conductancia dérmica durante la TSST-RV

El ANCOVA mixto no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos, con respecto a la conductancia en los tres momentos de la TSST-RV (estrés anticipatorio, discurso y tarea aritmética).

Activación del eje HHA: Cortisol en saliva durante la TSST-RV

Los resultados mostraron un efecto de interacción momento×grupo ($F(9,85)=2,04$; $p=0,050$) entre los cuatro grupos en los diferentes momentos. El grupo de CS presentó una activación normal frente al estresor, mientras que los grupos SS y LES no se activaron. El grupo SSc, aunque en menor medida, también se activó frente al estresor. Estos resultados se pueden ver en la Figura 2.

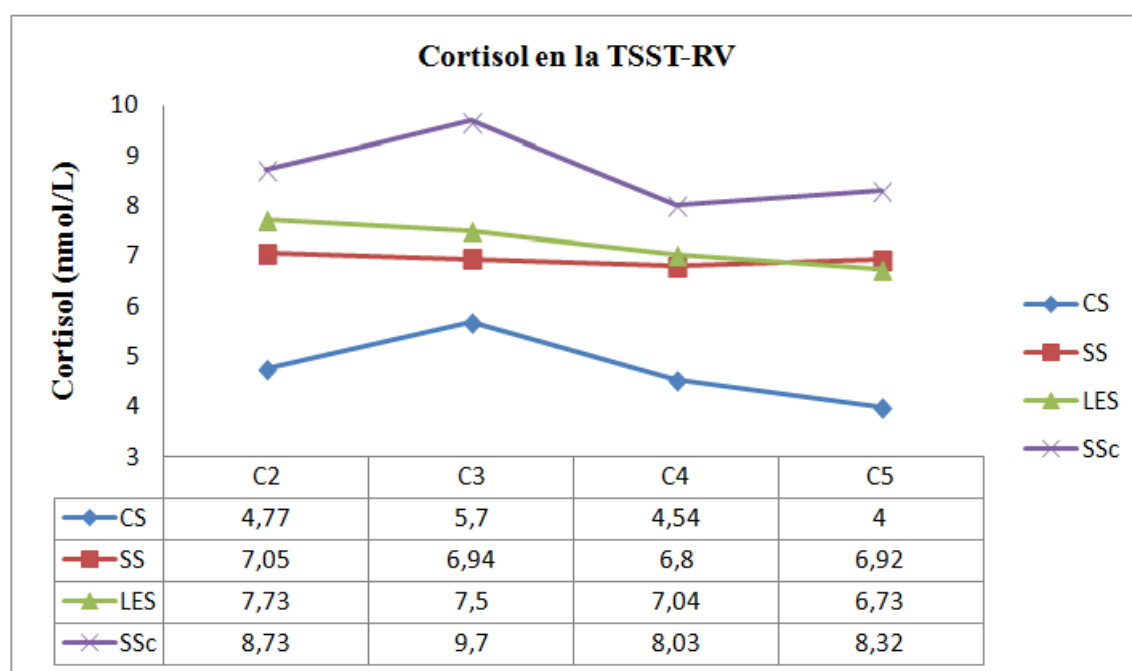


Figura 2: Niveles de cortisol en la TSST-RV. *Nota:* C2= cortisol pre-exposición; C3= cortisol después de la exposición; C4= cortisol post +10'; C5= cortisol post +20'; CS= mujeres sanas; SS= mujeres con SS; LES= mujeres con LES; SSc= mujeres con SSc.

Los análisis intrasujetos mostraron diferencias estadísticamente significativas en CS, entre C2 y C3 ($p=0,024$), C3 y C4 ($p<0,001$), C3 y C5 ($p<0,001$), y entre C4 y C5 ($p=0,019$).

También se encontraron diferencias intrasujetos en SSc, entre C3 y C4 ($p=0,021$). No se encontraron diferencias intragrupo entre los diferentes momentos en los grupos SS y LES.

Con respecto el AUC de los niveles de cortisol en la TSST-RV, los análisis mostraron diferencias en el AUCg ($F(3,85)=5,35$; $p=0,002$) y en el AUCi ($F(3,85)=3,48$; $p=0,019$). Los resultados mostraron diferencias entre CS ($p=0,002$) y SSc, siendo más elevada en SSc.

Niveles de cortisol diurno

Los resultados mostraron un efecto de interacción momento \times grupo ($F(9,63)=2,32$; $p=0,024$) significativo. (Ver Figura 3)

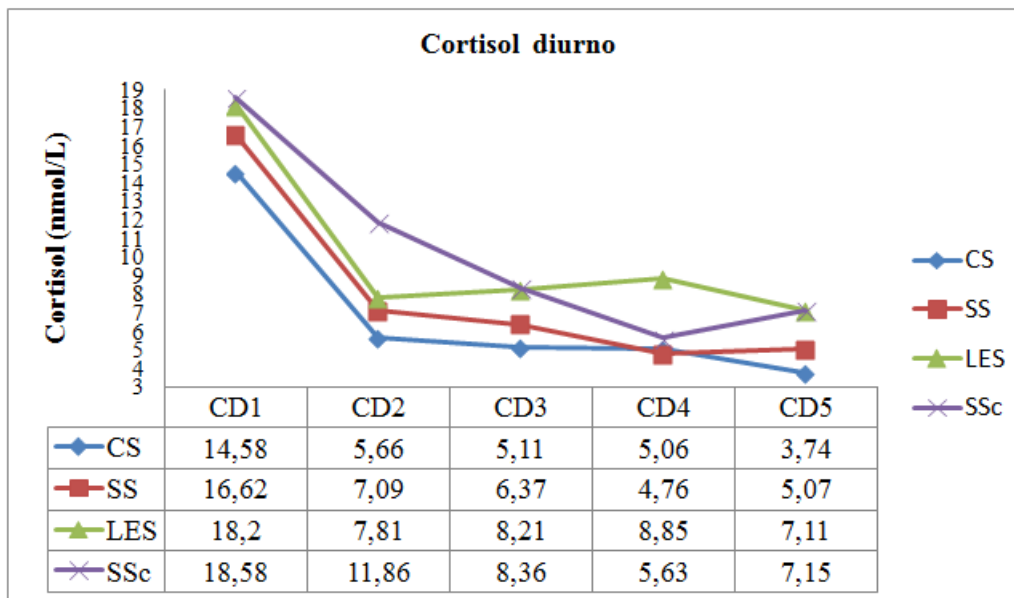


Figura 3: Curva de cortisol diurno de los cuatro grupos. *Nota:* CD1= cortisol 30' después del despertar; CD2= cortisol +4horas; CD3= cortisol +8horas; CD4= cortisol +12horas; CD5= cortisol +16horas (antes de dormir); CS= mujeres sanas; SS= mujeres con SS; LES= mujeres con LES; SSc= mujeres con SSc.

Análisis posteriores mostraron que existían diferencias significativas entre los grupos en todos los momentos excepto en el CD1. En concreto, los resultados mostraron diferencias significativas entregrupos en CD3 ($p=0,029$) y CD5 ($p=0,023$) entre CS y LES. Estas diferencias se mostraron en niveles mayores de cortisol en las mujeres con LES con respecto a las sanas.

También se encontraron diferencias entre los grupos CS y SSc en CD2 ($p < 0,001$), CD3 ($p = 0,037$) y CD5 ($p = 0,034$) donde SSc presentaron mayores niveles de cortisol que las sanas.

En el AUC de los niveles de cortisol diurnos, hubo diferencias en el AUCg ($F(3,86) = 6,87$; $p < 0,001$). Análisis posteriores mostraron diferencias significativas entre CS y LES ($p = 0,003$) y en el AUCg entre CS y SSc ($p = 0,003$), siendo más elevadas en LES y SSc que en CS.

9.4. Discusión

El objetivo de este estudio fue investigar cómo interactúan los ejes de respuesta al estrés en mujeres con LES, SS y SSc en comparación con CS durante la TSST-RV, donde se midió la activación del SNS mediante la conductancia dérmica y la activación del eje HHA mediante el cortisol en saliva, como medidas de estrés agudo. Asimismo, se analizó el comportamiento del eje HHA a través del patrón de cortisol en saliva diurno de mujeres autoinmunes con respecto a mujeres sanas, como medida de estrés cotidiano. Además, los cuatro grupos fueron evaluados en estrés, psicopatología, calidad de vida y presencia en el entorno virtual.

Con respecto a las variables psicopatológicas y relacionadas con la salud, los resultados son los esperables al comparar personas con enfermedad con respecto a personas sanas ya que se encuentran diferencias en las variables de *somatización*, *dolor corporal*, *percepción de la salud general* y *rol físico*, de este modo las mujeres autoinmunes están más afectadas que las mujeres sanas. Cabe destacar que el grupo SS muestra peores puntuaciones que el grupo CS, en *salud mental*, *depresión*, *psicoticismo* y *vulnerabilidad al estrés*. Estos resultados siguen la misma línea de otros estudios donde pacientes con SS tienen una tasa más elevada de trastornos psicológicos (Hyphantis y cols., 2010; Shelomkova y cols., 2013). Además, el grupo SS junto con el grupo SSc presentan diferencias con respecto al grupo CS, en *función física*, *función social* y *vitalidad*. Estos resultados se podrían atribuir a la sintomatología propia del SS y de la

SSc y probablemente también a la edad, ya que en estos dos grupos es mayor que en CS y LES, siendo la edad un factor relacionado con la calidad de vida (Chiu y cols., 2008).

Con respecto a la activación del SNS en una situación de estrés agudo encontramos que no había interacción en la respuesta de conductancia entre los cuatro grupos. Nuestros hallazgos coinciden con otros estudios (Finan & Zautra, 2013; Glück y cols., 2000), donde la activación del SNS medida por la conductancia dérmica no presenta diferencias entre las mujeres autoinmunes y las mujeres sanas.

Con respecto a la activación del eje HHA en una situación de estrés agudo, los resultados encontrados fueron diferentes en mujeres sanas frente a las mujeres autoinmunes. Las mujeres sanas presentaban un patrón de respuesta de la curva de cortisol similar a otros estudios de la TSST-RV (Annersted y cols., 2013; Santos-Ruiz y cols., 2010), mientras que en los grupos LES y SS, no se incrementaban los niveles de cortisol en respuesta a la TSST-RV. Estos resultados indican que el eje HHA no responde de forma adecuada, y los niveles de cortisol se mantienen en niveles basales durante toda la TSST-RV, sin producirse el disparo del eje HHA. Por último, el grupo SSc presentaba un patrón de respuesta similar al grupo CS. Estas diferencias existen también en los índices AUC_g y AUC_i durante la TSST-RV, entre CS y SSc, siendo estas últimas quienes muestran unos AUC mayores. Estos resultados pueden explicarse según la hipótesis de Munck y cols. (1984) debido a una alteración del eje, la cual no produce la inmunosupresión que debe haber tras la exposición a un estresor, y cuando las situaciones de estrés aparecen repetidamente, se produce la respuesta de autoinmunidad. Nuestros hallazgos concuerdan con otros estudios realizados con pacientes autoinmunes y controles sanos (Jacobs y cols., 2001; Matsuura y cols., 2011; Pawlak y cols., 1999) donde hallaron diferencias en las respuestas inmunológicas en pacientes autoinmunes.

Por tanto, las mujeres con LES o SS muestran una disfunción del eje HHA, ya que no presentan un patrón normal de respuesta de la curva de cortisol frente al estresor, ya que no se

produce reactividad al mismo. Sin embargo, estos resultados no son extrapolables a todas las enfermedades autoinmunes ya que en la SSc sí encontramos activación del eje HHA con la secreción de cortisol, aunque esta es menor que la de CS.

Con respecto a los niveles de cortisol diario también encontramos diferencias entre CS con los grupos LES y SSc. Los dos grupos de autoinmunes mostraban niveles más elevados de cortisol diurno que CS, en concreto en el cortisol recogido ocho horas después del despertar y en la última muestra de cortisol del día (antes de acostarse). Además, en SSc los niveles cortisol recogidos cuatro horas después del despertar, son más elevados que en CS. Estos hallazgos indican, que pacientes autoinmunes muestran más fluctuaciones de los niveles de cortisol en los diferentes momentos del día, presentando por tanto mayores niveles que en personas sanas. Estudios previos también han investigado patrones de cortisol diurnos como Van der Goes y cols. (2011) encontraron una correlación negativa en los niveles de cortisol del despertar con la tasa de sedimentación eritrocítica (ESR) en pacientes con LES y SS. Por tanto, el hecho de que en nuestro estudio, los niveles de cortisol diario sean más elevados en mujeres autoinmunes que en mujeres sanas, podría ser modulado por la ESR.

Además, se debe tener en cuenta que las muestras de saliva están influenciadas por los ritmos circadianos de cada persona (Johnson, Kostandi, y Moutsopoulos, 2006), por eso una de las limitaciones de este estudio ha sido no incluir otras medidas como la α -amilasa o la ESR, para aportarnos más información sobre patrones alterados y diferentes de la curva de cortisol tanto de patrones de respuesta al estrés como patrones de cortisol diurno. Por otro lado, sería interesante poder profundizar más en esta línea incluir más grupos de enfermedades autoinmunes para estudiar de forma pormenorizada el comportamiento de los ejes de respuesta al estrés, así como aumento del número muestral.

En conclusión, nuestros hallazgos muestran una desregulación entre los ejes de respuesta al estrés en pacientes autoinmunes. Esta alteración genera patrones de respuesta al

estrés psicológico diferentes según la enfermedad autoinmune que se estudie; LES, SS o SSc. Además, no es generalizable a todas las enfermedades autoinmunes. Esto nos lleva a comprender la diversidad de resultados encontrados en el efecto del estrés en las enfermedades autoinmunes ya que unos autores dan más peso a la importancia del estrés cotidiano y otros a los eventos vitales estresantes (Da Costa y cols., 1999; Dobkin y cols., 1998; Peralta-Ramírez y cols., 2004), sin embargo, es posible que la clave esté en la respuesta que cada enfermedad autoinmune tiene ante las diferentes situaciones estresantes. De este modo, es interesante la sugerencia que plantean Finan y Zautra (2013) afirmando que deben tenerse en cuenta según la enfermedad autoinmune estudiada, los diferentes efectos biopsicosociales de progresión de la enfermedad. Por tanto, en el abordaje clínico para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, debe incluirse un seguimiento y control de los niveles de estrés de las pacientes autoinmunes, teniendo en cuenta que según la enfermedad autoinmune, estrés psicológico afectará de manera diferente al funcionamiento tanto del SNS como del eje HHA pero con un efecto igual de perjudicial en su calidad de vida.

CAPÍTULO X: “DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo de esta tesis doctoral fue estudiar los mecanismos que expliquen el empeoramiento de la sintomatología de pacientes con enfermedades autoinmunes a causa del estrés psicológico. Para ello, se realizaron cinco estudios divididos en tres bloques: metodología, variables influyentes y relación entre estrés-autoinmunidad.

En el primer bloque de *Metodología*, se realizó el Estudio 1 con el objetivo de determinar el protocolo de TSST-RV que produciría mayor activación del SNS y del eje HHA, en personas sanas. En resumen, nuestros resultados parecen apoyar el uso de los protocolos de la TSST-RV, siendo un paradigma útil para investigar la modulación de los ejes principales que intervienen en la respuesta al estrés al igual que confirman estudios previos (Jösso y cols., 2009; Kelly y cols., 2007; Kotlar y cols., 2008, Santos-Ruiz y cols., 2010). Los resultados derivados de este estudio nos permiten tomar decisiones sobre qué protocolo utilizar cuando el objetivo del estudio es investigar específicamente uno de los dos ejes. En concreto, es preferible utilizar un protocolo de gafas para activar el SNS y la proyección de la imagen en 3D sobre una pantalla para activar el eje HHA, especialmente si la muestra de estudio está compuesta por mujeres principalmente. En caso de estudio en hombres, el protocolo de gafas es más recomendado para el análisis de ambos ejes. Por último, si el estudio a realizar incluye los dos ejes de respuesta al estrés y de ambos sexos, nuestros hallazgos indican que el uso de una imagen en 3D proyectada sobre una pantalla es el protocolo recomendado de TSST-VR. Los resultados derivados de este estudio nos han permitido determinar el tipo de protocolo a desarrollar en la evaluación de la activación de los ejes de respuesta al estrés en las pacientes autoinmunes.

En el segundo bloque de *Variables Influyentes*, se llevaron a cabo dos estudios. En el estudio 2 se comprobó en mujeres sanas la influencia de las fases del ciclo menstrual tanto en el estrés cotidiano (a través de los niveles de cortisol salivar diario) como en el estrés agudo (a través de los niveles de cortisol salivar en respuesta a la TSST-RV). Los resultados mostraron

que en una situación de estrés de laboratorio (TSST-RV), las mujeres en la fase lútea experimentan mayor aumento en los niveles de cortisol, lo que revela la posible influencia de la fase del ciclo menstrual ante una situación estresante específica. En este sentido, las mujeres que se encuentran en fase lútea pueden ser más vulnerables al percibir la situación como más estresante que las mujeres que se encuentran en fase folicular. En esta línea, el estudio de Walder y cols. (2012), mujeres en fase lútea presentaban niveles más elevados de cortisol durante una tarea estresante que mujeres que se encontraban en fase folicular. Por otro lado, nuestro estudio no encontró asociación entre las respuestas de cortisol al estrés de laboratorio y los niveles de cortisol salivales en el transcurso del día, como el estudio de Kidd y cols. (2014). Una posible explicación de estas diferencias en los resultados podría atribuirse a la diferencia en el diseño y en el procedimiento utilizados en ambos estudios. Las mujeres participantes en el estudio de Kidd y cols. (2014) tenían una media de 64 años de edad, por lo eran menopáusicas, y los horarios de recogida de las muestras de cortisol diario y de la tarea de estrés eran diferentes a los de nuestro estudio. Nuestros resultados no mostraron diferencias entre las diferentes fases del ciclo menstrual y los niveles de cortisol diurno, por lo que se hallan en consonancia con los de Kudielka y Kirschbaum (2003) y Wolfram y cols. (2010) quienes no encontraron influencia de la fase del ciclo menstrual en el estrés diario. Los hallazgos encontrados en el estudio 2 implicarían el aumento de la activación del eje HHA, junto con todas las consecuencias que conlleva dicha activación durante la fase lútea, haciendo a las mujeres más vulnerables al estrés y a sus efectos, con riesgo de empeoramiento de la salud física y mental. Este estudio podría ayudar a aclarar cómo los niveles hormonales pueden influir en la mujer.

En el estudio 3, dados los efectos del estrés y cortisol sobre variables de función ejecutiva y toma de decisiones, se tuvo como objetivo analizar la posible influencia del tratamiento con corticoides sobre estas variables en pacientes con LES. Los resultados

mostraron un efecto diferenciado en flexibilidad cognitiva entre las pacientes con LES que tomaban corticoides (con peores puntuaciones) con respecto a las pacientes con LES sin tratamiento corticoideo y a las mujeres sanas. Estos resultados van en la misma línea de diferentes estudios que confirman cómo los corticoides producen una disminución en otras variables neuropsicológicas como la memoria declarativa y de trabajo, siendo reversible cuando se disminuye la dosis o bien se suprime el tratamiento corticoideo (Brown y cols., 2007; Keenan y cols., 1996). Este efecto podría aparecer por la atrofia que los corticoides producen en el hipocampo (Appenzeller y cols., 2006; Brown, 2009). Por otro lado, el estudio de Nishimura y cols. (2015) encontró que pacientes LES presentaban peor ejecución en flexibilidad cognitiva, evaluada mediante el *Trail Making Test*, frente a controles sanos. Con respecto a la toma de decisiones, los resultados muestran que pacientes con LES (estén o no tomando corticoides) presentan una peor toma de decisiones que las personas sanas, por lo que este déficit no se puede atribuir a este tratamiento. Esto parece indicar que sería la enfermedad en sí la que afectaría a la toma de decisiones. Sin embargo, la actividad de la enfermedad no se correlacionó ni con la toma de decisiones ni con la flexibilidad cognitiva. En este sentido nuestros datos coinciden con los de otros estudios (Carbotte y cols., 1995; Kozora y cols., 1996) que mostraron que el SLEDAI no es un factor predictor de déficit cognitivo en LES. Sin embargo, sí se relaciona de forma indirecta, ya que el SLEDAI es un marcador de actividad lúpica, siendo necesario en algunas ocasiones el uso de corticoides, uno de los componentes del tratamiento, para disminuir la actividad de la enfermedad. Por lo tanto, aún sigue habiendo controversia sobre la asociación entre deterioro cognitivo y marcadores de actividad de la enfermedad; existiendo estudios que encuentran tal relación (Conti y cols., 2012; Kozora y cols., 2008). Con respecto al estado psicológico, se encontraron diferencias de pacientes con LES y mujeres sanas en la mayoría de las variables relacionadas tanto con estrés como con diferentes síntomas psicopatológicos. Estos resultados coinciden con, otros estudios que relacionan el estrés,

ansiedad y depresión como posibles factores de empeoramiento de la sintomatología y calidad de vida de las pacientes con LES (Coín-Mejías y cols., 2007; Peralta-Ramírez y cols., 2004, 2007, 2009). Estos hallazgos aportan una importante información sobre los efectos de los corticoides en el componente neuropsicológico de las pacientes, lo que tendría implicaciones negativas sobre el funcionamiento cotidiano de éstas.

El tercer bloque contiene los estudios 4 y 5 de esta tesis doctoral, en los que se investiga sobre la relación entre *estrés* y *autoinmunidad*. En el Estudio 4, se investigó la activación del eje HHA entre mujeres con enfermedades autoinmunes (LES, SS, SSc y uveítis) en comparación con mujeres sanas a dos niveles: mediante el cortisol en saliva durante un día como medida de estrés cotidiano y mediante el cortisol en pelo como medida retrospectiva de estrés crónico. Para esta última evaluación, analizamos las concentraciones de cortisol en pelo de los últimos 3 meses. Los niveles de estrés psicológico de las participantes se evaluaron con medidas de autoinforme. Los resultados mostraron que los niveles de cortisol en saliva y en pelo eran más elevados en las mujeres autoinmunes que en mujeres sanas, apuntando a una hiperactivación del eje HHA. En esta línea, nuestros resultados no coinciden con los de Jung y cols. (2015), ya que éstos encontraron que pacientes con LES tenían mayores niveles de α -amilasa que controles sanos pero no encontraron diferencias en los niveles de cortisol entre pacientes con LES y controles sanos. Una posible explicación es que ellos no excluyeron a pacientes con tratamiento corticoideo, hecho que modularía la respuesta de las glándulas suprarrenales modificando por tanto la activación del eje HHA en estos (Ruiz-Arruza et al., 2014). En nuestro estudio, para evitar que nuestros resultados pudiesen estar influidos por una hipertrofia de las glándulas suprarrenales y garantizar la eliminación en el organismo del tratamiento corticoideo, las pacientes autoinmunes llevaban sin tener tratamiento corticoideo en el último año. Por otro lado, nuestros resultados discrepan de los encontrados por Johnson y cols. (2006) y Tzioufas y cols. (2008), ya que encontraron niveles de cortisol basal y de ACTH

significativamente más bajos en pacientes con SS que en controles sanos. Estos resultados probablemente puedan deberse a que solo se tomaron medidas de cortisol salivar en momentos puntuales para evaluar el eje HHA, y es conocido que estas medidas están muy influenciadas por los ritmos circadianos de cada persona (Johnson y cols., 2006). La evaluación del cortisol en saliva también fue usada en el estudio de van der Goes y cols. (2011) con pacientes con SS primario y LES, encontrando que lo que modula la activación del eje HHA en estos pacientes era la tasa de sedimentación eritrocítica (ESR) de modo que pacientes con una elevada ESR tenían la respuesta del cortisol al despertar más baja que los pacientes con baja ESR. Por tanto, el hecho de que en nuestro estudio, los niveles de cortisol diarios sean más elevados en mujeres autoinmunes que en mujeres sanas, podría estar modulado por la ESR, que no fue incluida en nuestro estudio. Con respecto a los niveles de estrés crónico (cortisol en pelo acumulado a lo largo de los últimos 3 meses), dado que ambos grupos estaban igualados en las variables de estrés y psicopatológicas, los resultados indicarían una elevada función del eje HHA en mujeres autoinmunes. Estos hallazgos coinciden con los estudios incluidos en la revisión de Meyer y Novak (2012), donde mostraron que la actividad a largo plazo del eje HHA, medida por los niveles de cortisol en pelo, y la actividad a corto plazo del eje HHA, medida por los niveles de cortisol en saliva, se relacionan bajo algunas condiciones. Todo esto nos aporta información novedosa sobre el comportamiento del eje HHA en personas con enfermedades autoinmunes.

Por último, el estudio 5, se llevó a cabo teniendo en cuenta todos los resultados anteriores, por lo que se utilizó el protocolo de TSST-RV de pantalla (tal y como nos sugería el primer estudio de esta tesis doctoral) y su objetivo fue investigar cómo interactúan los ejes de respuesta al estrés en mujeres con diferentes enfermedades autoinmunes (LES, SS y SSc) en comparación con mujeres sanas durante la TSST-RV, registrando la activación del SNS mediante la conductancia dérmica y la activación del eje HHA mediante el cortisol en saliva, como medidas de estrés agudo de laboratorio. Se controlaron las variables influyentes,

recogiendo datos sobre las fases del ciclo menstrual de las participantes, y en el caso de las pacientes autoinmunes, solo se incluyeron para este estudio, aquellas que llevaban al menos un año sin tratamiento corticoideo. Asimismo, se analizó el comportamiento del eje HHA a través del patrón de cortisol en saliva diurno de mujeres autoinmunes con respecto a mujeres sanas, como medida de estrés cotidiano (medidas ya recogidas en el estudio 4). Además, los cuatro grupos fueron evaluados en las variables de estrés, psicopatología, calidad de vida y presencia en el entorno virtual. Con respecto a las variables psicopatológicas y relacionadas con la salud, los resultados son los esperables al comparar personas con enfermedad con respecto a personas sanas ya que se encuentran diferencias en las variables de *somatización*, *dolor corporal*, *percepción de la salud general* y *rol físico*, estando más afectadas las mujeres autoinmunes que las mujeres sanas. Cabe destacar que las pacientes con SS muestran peores puntuaciones que las mujeres sanas, en *salud mental*, *depresión*, *psicoticismo* y *vulnerabilidad al estrés*. Estos resultados siguen la misma línea de otros estudios donde pacientes con SS tienen una tasa más elevada de trastornos psicológicos (Hyphantis y cols., 2010; Shelomkova y cols., 2013). Con respecto a la activación del SNS en la TSST-RV encontramos que no había diferencias en la respuesta de conductancia dérmica entre los cuatro grupos, mostrando por tanto similar activación. Nuestros hallazgos coinciden con otros estudios (Finan y Zautra, 2013; Glück y cols., 2000), donde la activación del SNS medida por la conductancia no presentaba diferencias entre las mujeres autoinmunes y las mujeres sanas. Sí encontramos diferencias con respecto al eje HHA, ya que los resultados encontrados mostraron que las mujeres sanas presentaban un patrón de respuesta de la curva de cortisol normal durante la TSST-RV, mientras que en los grupos LES y SS, no se incrementaban los niveles de cortisol en la TSST-RV. Estos resultados indican que la respuesta del el eje HHA no es igual a la de personas sanas, manteniéndose en niveles basales durante toda la TSST-RV, sin producirse el disparo del eje HHA. Cabe destacar que el grupo SSc presentaba un patrón de respuesta similar al grupo de personas sanas. Con

respecto a los índices de AUCg y AUCi durante la TSST-RV, se encontraron diferencias entre mujeres sanas y SSc quienes mostraron unos niveles de AUC mayores. Estos resultados pueden explicarse según la hipótesis de Munck y cols. (1984) que defiende que, debido a una alteración del eje HHA, no se produce la inmunosupresión adecuada en respuesta a un estresor, de este modo, cuando este fallo en inmunosupresión se produce repetidamente en situaciones de estrés, puede aumentar el riesgo de autoinmunidad. Esto estaría también apoyado por otros estudios realizados con pacientes autoinmunes y controles sanos (Jacobs y cols., 2001, Matsuura y cols., 2011; Pawlak y cols., 1999) donde hallaron diferencias en las respuestas inmunológicas en pacientes autoinmunes frente al estrés psicológico. Por otro lado, aunque nuestros resultados muestran que en mujeres con LES o SS una disfunción del eje HHA, por no presentar un patrón típico de respuesta de la curva de cortisol frente al estresor, estos resultados no son extrapolables a todas las enfermedades autoinmunes, ya que en la SSc sí encontramos activación del eje HHA en respuesta al estrés, aunque esta sea menor que en mujeres sanas.

En resumen, existen patrones de respuesta al estrés psicológico diferentes según la enfermedad autoinmune que se estudie; LES, SS o SSc. Esto nos lleva a comprender la diversidad de resultados encontrados en el efecto del estrés en las enfermedades autoinmunes ya que unos autores dan más peso a los eventos vitales estresantes y otros al estrés cotidiano (Da Costa y cols., 1999; Dobkin y cols., 1998; Peralta-Ramírez y cols., 2004), sin embargo, es posible que la clave esté en la respuesta que cada enfermedad autoinmune tiene ante las diferentes situaciones estresantes. De este modo, aunque hay acuerdo en la desregulación de los ejes de respuesta al estrés es interesante la sugerencia que plantean Finan y Zautra (2013) quienes afirman que deben tenerse en cuenta según la enfermedad autoinmune estudiada, los diferentes efectos biopsicosociales de progresión de la enfermedad.

Los resultados encontrados en esta tesis doctoral presentan una serie de limitaciones a tener en cuenta para futuras investigaciones como podrían ser estudiar la respuesta al estrés en

entornos más ecológicos que nos permitieran generalizar los resultados a otros ambientes, también sería interesante evaluar la respuesta psicofisiológica del estrés mediante otros registros del SNS como la tasa cardíaca y el pulso. Por otro lado, sabiendo la importancia del ciclo menstrual en la respuesta al estrés, sería interesante seleccionar un método más fiable para determinar la fase del ciclo menstrual en el que se encuentran las participantes e incluir un mayor tamaño muestral en los grupos de pacientes autoinmunes así como otras enfermedades autoinmunes.

CAPÍTULO XI: “CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS”

11.1. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se derivan de los estudios llevados a cabo en esta tesis doctoral son las siguientes:

1. Con respecto al estudio de metodología para determinar qué protocolo de la TSST-RV es más adecuado para estudiar la respuesta al estrés en el laboratorio, la TSST-RV mediante pantalla es el protocolo recomendado ya que produce mayor activación de los dos ejes implicados en la respuesta al estrés (sistema nervioso simpático y eje HHA) tanto en hombres como en mujeres.
2. Con respecto a las variables influyentes, en el estudio 2 se encontró que la variable “fase del ciclo menstrual de la mujer” influye en la respuesta al estrés provocado en una situación de estrés de laboratorio. En concreto, las mujeres que se encuentran en la fase lútea del ciclo menstrual, presentan niveles más elevados de cortisol en saliva, con respecto a las que se encuentran en la fase folicular del ciclo. Sin embargo, los niveles de cortisol en saliva diurno, no están determinados por las fases del ciclo menstrual.
3. En relación a la variable “tratamiento corticoideo”, podemos concluir que el tratamiento farmacológico con corticoides, afecta a la flexibilidad cognitiva y toma de decisiones de mujeres con lupus, por lo que se debe tener en cuenta que existen más efectos secundarios de los tratamientos con corticoides que indirectamente, también se pueden relacionar con su respuesta al estrés.
4. Con respecto a estrés y autoinmunidad en el que se engloban los estudios 4 y 5 llegamos a varias conclusiones. En el estudio 4, llegamos a la conclusión de que las mujeres con LES, SS y SSc tienen niveles más elevados de cortisol en pelo (estrés crónico) y en saliva (estrés cotidiano) que las mujeres sanas. En el estudio 5, comprobamos que existen diferencias en los patrones de respuesta al estrés entre pacientes autoinmunes y personas sanas. En concreto, en una situación de estrés de laboratorio (TSST-RV), las

mujeres con LES, SS y SSc presentan unos patrones de respuesta diferente a las mujeres sanas, reflejados en la desincronización entre el sistema nervioso simpático y el eje HHA. De este modo, las mujeres con enfermedad autoinmune, muestran una activación similar del sistema nervioso simpático a las mujeres sanas, sin embargo, el eje HHA se activa de manera diferente que en las mujeres sanas.

11.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

Las principales perspectivas futuras de investigación derivadas de esta tesis doctoral son las siguientes:

1. Estudiar otras hormonas como la prolactina, la tasa sedimentación eritrocítica (ESR), dehidroandosterona y la α -amilasa para explicar las diferencias que hay en los patrones de respuesta al estrés y en sus patrones de cortisol diurno entre mujeres con LES, mujeres con SS y SSc.
2. Comprobar la implicación de mediadores inmunológicos como las citoquinas IL-6, IL-4 e IL-10 en el empeoramiento de la sintomatología de pacientes con LES, SS, SSc a causa del estrés psicológico.
3. Desde el diagnóstico de la enfermedad autoinmune, hacer un seguimiento de los niveles de cortisol en pelo cada 3 meses que permita predecir y prevenir el empeoramiento de la sintomatología. Asimismo, comprobar el papel del estrés psicológico como precipitante de las enfermedades autoinmunes
4. Evaluar si en pacientes con SS y SSc existe también afectación neuropsicológica a causa del tratamiento corticoideo como ocurre en pacientes con LES.
5. Realizar evaluaciones neuropsicológicas en pacientes autoinmunes desde el diagnóstico de la enfermedad y en el caso de pacientes con tratamiento corticoideo y con deterioro, llevar a cabo rehabilitación neuropsicológica.

6. Desarrollar terapias psicológicas eficaces de afrontamiento al estrés que disminuyan los niveles de estrés percibido y cotidiano así como los niveles de cortisol en pacientes autoinmunes, con el objetivo de disminuir el riesgo de brotes de la enfermedad causados por el estrés psicológico.
7. Desarrollar estos estudios en hombres que padezcan LES, SS y SSc puesto que aunque la prevalencia de estas enfermedades sea baja en hombres, igualmente es necesario el abordaje psicológico para una mayor adaptación al proceso de la enfermedad.

INTERNACIONAL PhD

1. SUMMARY

This doctoral thesis consists of eleven chapters that are structured in four sections: a) introduction (chapters I, II and III), b) justification and objectives (chapter IV), c) empirical studies (chapters V, VI, VII, VIII and IX), and d) general discussion, conclusions and future research (chapter X and XI).

The first part presents the theoretical introduction of this thesis, and is divided in three chapters. In chapter I, the psychological stress is defined; we present the main theoretical models and the human physiological stress response. Chapter II exposes how the stress response is evaluated using self-report, psychophysiological and endocrine assessment. At the end of the chapter, we present the main stressors used in the laboratory during the research of the response to stress and its effects. In chapter III, we summarize the principal characteristics of systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (SS) and systemic sclerosis (SSc) including signs, symptoms, treatment and the effect of psychological stress in these three diseases. We finish this introductory section, with the exposure the principal theories that try to explain the relationship between stress and autoimmunity, and so the underlying mechanisms involved in the worsening of the symptoms in the autoimmunity diseases due to the psychological stress.

The second part includes the chapter IV with the justification, the different hypothesis and the description of the main objective and related specific objectives of each study that we have performed in this thesis.

The third part is composed of five chapters (V, VI, VII, VIII and IX) and each includes the empirical studies that have been performed. Chapter V shows a study on the methodology to determine which of the two protocols of the Trier Social Stress Test (TSST) adapted to virtual reality (screen or goggles) produces higher activation of the sympathetic nervous system (SNS) and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) in healthy people. The objective of validation between the two protocols was to check greater stress response and use it in the rest

of the studies. The results showed that the TSST protocol adapted to virtual reality by screen (TSST-VR) produced the greatest activation of the SNS and HPA axis.

Chapters VI and VII include the studies of the two influential variables: the first one studied was the menstrual cycle phase, and the second the pharmacological treatment with corticosteroids, which despite not being related to psychological stress, it can affect the performance of the autoimmune patients. In this way, chapter VI includes a study of the possible influence of the phases of menstrual cycle in the secretion of cortisol levels and so the HPA axis. We studied in healthy women in different parts of the menstrual cycle obtaining the diurnal patterns of cortisol in saliva and the same after TSST-VR. Results showed that the response pattern caused by the stressful situation in the laboratory were higher for women in the luteal phase in contrast with women during follicular phase, they did not have significant differences in the daily cortisol levels. In chapter VII we studied the possible effects of the corticosteroids treatment in cognitive flexibility (measured with the Trail Making Test) and the decision-making (measured with the Iowa Gambling Test) among SLE patients. Lupus patients with corticosteroids treatment showed lower cognitive flexibility and worse decision-making in comparison with lupus patients without corticosteroids treatment and healthy women.

Chapter VIII includes the study of the differences in the activation of the HPA axis in women with autoimmune diseases (SLE, SS and SSc) and healthy women analyzing daily salivary cortisol levels and cortisol levels of the last three months measured with the technique of hair cortisol. The results showed that autoimmune women had significant higher levels of both measures compared to healthy woman.

In chapter IX we present the last study of the empirical study section. This final one includes the rest and is the principal one of this PhD. Dissertation. In precedent studies we have determined the methodology to be used, the most influential variables, level of activation of the HPA axis of autoimmune patients in their daily life. So, this study analyzed the stress response

to the level of the SNS (measuring skin conductance) and to the level of the HPA axis (measuring salivary cortisol) in a laboratory situation (TSST-RV with screen projection), also the daily levels of salivary cortisol were analyzed, to check all with healthy and autoimmune women (SLE, SS, SSc) without corticosteroids treatment. These measures were used to determine the presence of altered mechanisms in the response to the psychological stress that can explain the worsening of the symptoms in patients with autoimmune diseases. The results showed that the SNS activation was similar in healthy women and in the autoimmune patients, but there were differences in the response of the HPA axis, both in the response pattern to TSST-VR and daily cortisol patterns reflected in the cortisol levels in saliva.

The last section includes the chapter X, with the general discussion of the principal findings obtained in the five studies of this thesis, highlighting the principal clinical implications and the better understanding of the underlying mechanisms of stress in the autoimmune diseases. Chapter XI summarizes the principal conclusions and future perspectives of research.

2. CONCLUSIONS

The main conclusions that we derive from the empirical studies showed in this Ph.D. Dissertation are the following:

1. The methodology to determine which protocol of the TSST-VR is the most appropriate to study the stress response in the laboratory, the TSST-VR with screen projection is the recommended one, because it produces the greatest activation in the axis involved in the stress response (SNS and HPA axis) both in men and women.
2. Taking into account the influential variables, the study 2 found that the variable “menstrual cycle phase of the women” has a definite influence in the stress response provoked in a laboratory situation. Specifically, women that are in the luteal phase of the menstrual cycle showed the highest levels of cortisol in saliva opposed to women in the follicular phase of the cycle. However, the daily levels of cortisol in saliva are not determined by the phases of the menstrual cycle.
3. Studying the “corticosteroid treatment” variable. We can conclude that the pharmacological treatment with corticosteroids affects the cognitive flexibility and the decision-making in women with lupus. Thus, we have to take care that there exists more secondary effects in the corticosteroids treatment that, in an indirect form, affects the stress response.
4. Relating stress and autoimmune, from the studies 4 and 5 we reach the following conclusions. In the study 4 women with SLE, SS and SSc had higher levels of hair cortisol (chronic stress) and salivary cortisol (daily stress) than healthy women. In the study 5, we checked for differences in the pattern of stress response with autoimmune patients and healthy women. Specifically the stressful situation in laboratory (TSST-VR), women with SLE, SS and SSc showed different patterns of response compared with healthy women, with a desynchronization between the SNS and the HPA axis.

Thus, women with autoimmune disease showed similar activation of the sympathetic nervous system compared with healthy women. Nevertheless, the activation of the HPA axis was different in autoimmune women.

3. FUTURE PERSPECTIVES

The principal future perspectives of research derived from this Ph.D. dissertation are the following:

1. To study other hormones as prolactin, the erythrocyte sedimentation rate (ESR), the dehydroepiandrosterone and the α -amylase, to explain the differences of the stress response patterns and the daily cortisol patterns between women with SLE, SS and SSc.
2. To check the implication of the immune mediators as the cytokines IL-6, IL-4 and IL-10 in the worsening of the symptoms of patients with SLE, SS, SSc due psychological stress.
3. Since the diagnosis of the autoimmune disease to check the cortisol levels (every 3 months) for predict and prevent the worsening of the symptoms, at the same time, to check the role of psychological stress as the eliciting factor in the autoimmune diseases.
4. To evaluate if the patients with SS and SSc neuropsychological impairment due corticosteroids treatment such us the SLE patients.
5. To perform neuropsychological evaluations autoimmune patients since the diagnosis of the disease. To realize neuropsychological rehabilitation, in the case of patients with corticosteroid treatment and with deterioration.
6. To development effective psychological coping stress therapies to decrease the self perceived stress and the daily stress, nevertheless to regulate cortisol levels in

autoimmune patients with the aim of decrease the risk of peaks in the disease elicited by the psychological stress.

7. To perform the studies in men with SLE, SS and SSc, despite the prevalence of these diseases is low in men, it is equally important to threat it from a psychological point of view to adapt better to the evolution of the disease.

REFERENCIAS

- Adams Jr, S.G., Dammers, P.M., Saia, T.L., Brantley, P.J., & Gaydos, G.R. (1994). Stress, depression, and anxiety predict average symptom severity and daily symptom fluctuation in systemic lupus erythematosus. *Journal of Behavioral Medicine, 17*(5), 459-477.
- Adam, E.K., Hawkley, L.C., Kudielka, B.M., & Cacioppo, J.T. (2006). Day-to-day dynamics of experience–cortisol associations in a population-based sample of older adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 103*(45), 17058-17063.
- al'Absi, M., Bongard, S., Buchanan, T., Pincomb, G. A., Licinio, J., & Lovallo, W. R. (1997). Cardiovascular and neuroendocrine adjustment to public speaking and mental arithmetic stressors. *Psychophysiology, 34*(3), 266-275.
- al'Absi, M., Hatsukami, D., & Davis, G.L. (2005). Attenuated adrenocorticotrophic responses to psychological stress are associated with early smoking relapse. *Psychopharmacology, 181*(1), 107-117.
- Alonso, J., Prieto, L., & Antó, J. M. (1995). La versión española del SF-36 Health Survey (Cuestionario de Salud SF-36): un instrumento para la medida de los resultados clínicos. *Med Clin (Barc), 104*(20), 771-776.
- Andersson, S. I., Manthorpe, R., & Theander, E. (2001). Situational patterns in coping with primary Sjögren's syndrome. *Psychology, Health & Medicine, 6*(1), 29-40.
- Annerstedt, M., Jönsson, P., Wallergård, M., Johansson, G., Karlson, B., Grahn, P., & Währborg, P. (2013). Inducing physiological stress recovery with sounds of nature in a virtual reality forest—results from a pilot study. *Physiology & Behavior, 118*, 240–250.
- Arbuthnott, K., & Frank, J. (2000). Trail making test, part B as a measure of executive control: validation using a set-switching paradigm. *Journal of clinical and experimental neuropsychology, 22*(4), 518-528.
- Aringer M, Hiepe F. Systemic lupus erythematosus.(2011) *Z Rheumatol, 70*, 313-323.

- Appenzeller, S., Carnevalle, A. D., Li, L. M., Costallat, L. T., & Cendes, F. (2006). Hippocampal atrophy in systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*, 65(12), 1585-1589.
- Bachen, E. A., Manuck, S. B., Cohen, S., Muldoon, M. F., Raible, R., Herbert, T. B., & Rabin, B. S. (1995). Adrenergic blockade ameliorates cellular immune responses to mental stress in humans. *Psychosomatic Medicine*, 57(4), 366-372.
- Bhangle, S. D., Kramer, N., & Rosenstein, E. D. (2013). Corticosteroid-induced neuropsychiatric disorders: review and contrast with neuropsychiatric lupus. *Rheumatology international*, 33(8), 1923-1932.
- Bechara, A. (2004). The role of emotion in decision-making: Evidence from neurological patients with orbitofrontal damage. *Brain and cognition*, 55(1), 30-40.
- Beech, H. R., Sheffield, B. F., & Burns, L. E. (1986). *Tratamiento del estrés: un enfoque comportamental*. Madrid: Editorial Alhambra.
- Belloch, A., Sandín, B., & Ramos, F. (2009). El estrés. *Manual de psicopatología* (pp.22-26), vol. 2, McGraw-Hill España.
- Bensabat, S., & Seyle, H. (1987). *Stress: Grandes especialistas responden*. Bilbao: Ediciones Mensajero.
- Best, J. R., Miller, P. H., & Jones, L. L. (2009). Executive functions after age 5: Changes and correlates. *Developmental Review*, 29(3), 180-200.
- Birmingham, D.J., Nagaraja, H.N., Rovin, B.H., Spetie, L., Zhao, Y., Li, X., ... & Hebert, L.A. (2006). Fluctuation in self-perceived stress and increased risk of flare in patients with lupus nephritis carrying the serotonin receptor 1A-1019 G allele. *Arthritis & Rheumatism*, 54(10), 3291-3299.
- Blumenfeld, M. (1978). Psychological aspects of systemic lupus erythematosus. *Primary Care*, 5, 159-171.

- Boisseau, N., Enea, C., Diaz, V., Dugué, B., Corcuff, J.B., & Duclos, M. (2013). Oral contraception but not menstrual cycle phase is associated with increased free cortisol levels and low HPA axis reactivity. *Journal of Endocrinological Investigation*, 36(11), 955-964.
- Bombardier, C., Gladman, D. D., Urowitz, M. E. A., Caron, D., & Chang, C. H. (1992). the Committee on Prognosis Studies in SLE. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum*, 35(6), 630-40.
- Brenner, K., Liu, A., Laplante, D.P., Lupien, S., Pruessner, J.C., Ciampi, A., & King, S. (2009). Cortisol response to a psychosocial stressor in schizophrenia: blunted, delayed, or normal?. *Psychoneuroendocrinology*, 34(6), 859–868.
- Bricou, O., Taïeb, O., Baubet, T., Gal, B., Guillevin, L., & Moro, M.R. (2007). Stress and coping strategies in systemic lupus erythematosus: a review. *Neuroimmunomodulation*, 13(5-6), 283-293.
- Brown, E. S. (2009). Effects of glucocorticoids on mood, memory, and the hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1179(1), 41-55.
- Brown, E. S., Vera, E., Frol, A. B., Woolston, D. J., & Johnson, B. (2007). Effects of chronic prednisone therapy on mood and memory. *Journal of affective disorders*, 99(1), 279-283.
- Brown, S.G., Morrison, L.A., Calibuso, M.J., & Christiansen, T.M. (2008). The menstrual cycle and sexual behavior: relationship to eating, exercise, sleep, and health patterns. *Women & Health*, 48(4), 429-444.
- Buske-Kirschbaum, A., Jobst, S., Wustmans, A., Kirschbaum, C., Rauh, W., & Hellhammer, D. (1997). Attenuated free cortisol response to psychosocial stress in children with atopic dermatitis. *Psychosomatic Medicine*, 59(4), 419–426.

- Cacioppo, J. T. (1994). Social neuroscience: Autonomic, neuroendocrine, and immune responses to stress. *Psychophysiology*, *31*(2), 113-128.
- Calvo-Aranda, E., & Muñoz-Fernández, S. (2011). Síndrome de Sjögren. *Jano: Medicina y humanidades*, (1775), 53-59.
- Cao, H., Lin, J., Olsen, N., & Zheng, S. G. (2015). Biomarkers for Primary Sjögren's Syndrome. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics (In press)*. *University Science B*, *9*(11), 853-856.
- Carbotte, R. M., Denburg, S. D., & Denburg, J. A. (1995). Cognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus is independent of active disease. *The Journal of Rheumatology*, *22*(5), 863-867.
- Cautela, J.R., & Groden, J. (1985). *Técnicas de relajación*. Barcelona: Martínez Roca.
- Cerqueira, J. J., Pêgo, J. M., Taipa, R., Bessa, J. M., Almeida, O. F., & Sousa, N. (2005). Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors. *The Journal of Neuroscience*, *25*(34), 7792-7800.
- Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G., (2005). Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* *67*, 259-284.
- Chen, Y., Huang, J. Z., Qiang, Y., Wang, J., & Han, M. M. (2008). Investigation of stressful life events in patients with systemic sclerosis. *Journal of Zhejiang University Science B*, *9*(11), 853-856.
- Chen, Z., Li, J., Zhang, J., Xing, X., Gao, W., Lu, Z., & Deng, H., (2013). Simultaneous determination of hair cortisol, cortisone and DHEAS with liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry in negative mode. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* *929*, 187-194.

- Childs, E., Dlugos, A., & De Wit, H. (2010). Cardiovascular, hormonal, and emotional responses to the TSST in relation to sex and menstrual cycle phase. *Psychophysiology*, 47(3), 550-59.
- Chrousos, G. P. (2000). The role of stress and the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: Neuro-endocrine and target tissue-related causes. *International Journal of Obesity*, 24(Suppl. 2), S50–S55.
- Conti, F., Alessandri, C., Perricone, C., Scivo, R., Rezai, S., Ceccarelli, F., ... & Valesini, G. (2012). Neurocognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus: association with antiphospholipid antibodies, disease activity and chronic damage. *PLoS One*, 7(3), e33824.
- Cohen, S., Kamarck, T., & Mermelstein, R. (1983). A global measure of perceived stress. *Journal of health and social behavior*, 385-396.
- Crespo, M., & Labrador, F. J. (2003). *Estrés. Síntesis*.
- D'Anna-Hernandez, K. L., Ross, R. G., Natvig, C. L., Laudenslager, M. L., (2011). Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic–pituitary axis activity throughout pregnancy: comparison to salivary cortisol. *Physiol. Behav.* 104, 348-353.
- Da Costa, D., Dobkin, P.L., Pinard, L., Fortin, P.R., Danoff, D.S., Esdaile, J.M., & Clarke, A.E. (1999). The role of stress in functional disability among women with systemic lupus erythematosus: a prospective study. *Arthritis Care and Research*, 12, 112-119.
- De las Cuevas, C., González de Rivera, J. L., Henry- Benitez, M., Monterrey, A. L., Rodríguez-Pulido, F., & Gracia- Marco, R. (1991). Análisis factorial de la versión española del SCL-90-R en la población general. *Anales de Psiquiatría*, 7, 93–96.

- Delis, D. C., Kaplan, E., & Kramer, J. H. (2001). *Delis-Kaplan executive function system: Technical manual*. Psychological Corporation.
- Delevaux, I., Chamoux A, & Aumaître O (2013). Stress and autoimmunity. *Rev Med Interne*, 34(8), 487-492.
- De Rivera, L. (2010). Psicometría del estrés. En: *Los síndromes de estrés* (pp. 191-202). Madrid : Síntesis.
- Derogatis, L. R., & Unger, R. (2010). Symptom checklist-90-revised. *Corsini encyclopedia of psychology*.
- Dobkin, P.L., Fortin, P.R., Joseph, L., Esdaile, J.M., Danoff, D.S., & Clarke, A.E. (1998). Psychosocial contributors to mental and physical health in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 11(1), 23-31.
- Dohrenwend, B. S., & Dohrenwend, B. P. (1978). Some issues in research on stressful life events. *The Journal of nervous and mental disease*, 166, 7-15.
- Dohrenwend, B. S., & Dohrenwend, B. P. (1981). Life stress and illness: Formulation of the issues. *Stressful life events and their contexts*, 1, 1-27.
- Dohrenwend, B. S., Dohrenwend, B. P., Dodson, M., & Shrout, P. E. (1984). Symptoms, hassles, social supports, and life events: Problem of confounded measures. *Journal of abnormal psychology*, 93(2), 222-230.
- Duchesne, A., & Pruessner, J.C. (2013). Association between subjective and cortisol stress response depends on the menstrual cycle phase. *Psychoneuroendocrinology*, 38(12), 3155-3159.
- Eder, L., Urowitz, M. B., & Gladman, D. D. (2013). Damage in lupus patients—what have we learned so far?. *Lupus*, 22(12), 1225-1231.
- Esler, M., Eikelis, N., Schlaich, M., Lambert, G., Alvarenga, M., Kaye, D., & Lambert, E. (2008). Human sympathetic nerve biology: parallel influences of stress and

- epigenetics in essential hypertension and panic disorder. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148, 338–348.
- Finan, P.H. & Zautra A.J. (2013). Rheumatoid arthritis: Stress affects rheumatoid arthritis, but via what mechanisms? *Nature Reviews Rheumatology* 9, 569-570
- Fiocco, A. J., Joober, R., & Lupien, S. J. (2007). Education modulates cortisol reactivity to the Trier Social Stress Test in middle-aged adults. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 1158–1163.
- Fernández Seara, J.L., & Mielgo Robles, M. (2001). *EAE Escala de Apreciación al Estrés*. Madrid: TEA.
- Foley, P., & Kirschbaum, C. (2010). Human hypothalamus–pituitary–adrenal axis responses to acute psychosocial stress in laboratory settings. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(1), 91-96.
- Folkman, S., & Lazarus, R. S. (1988). *Ways of Coping Questionnaire: Sampler Set: Manual, Instrument, Scoring Guide*. Consulting Psychologists Press.
- Freier, E., Weber, C. S., Nowotny, U., Horn, C., Bartels, K., Meyer, S., ... & Muzzulini, J. (2010). Decrease of CD4+ FOXP3+ T regulatory cells in the peripheral blood of human subjects undergoing a mental stressor. *Psychoneuroendocrinology*, 35(5), 663-673.
- Fries, E., Dettenborn, L., & Kirschbaum, C. (2009). The cortisol awakening response (CAR): Facts and future directions. *International Journal of Psychophysiology*, 72(1), 67-73.
- García-Carrasco, M., Ramos-Casals, M., Rosas, J., Pallares, L., Calvo-Alen, J., Cervera, R., ... & Ingelmo, M. (2002). Primary Sjögren syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients. *Medicine*, 81(4), 270- 280.
- García-Serna, B. (2014). *¿Qué es la esclerodermia?*. Asociación Española de Esclerodermia.

- Gibson, E.L., Checkley, S., Papadopoulos, A., Poon, L., Daley, S., & Wardle, J. (1999). Increased salivary cortisol reliably induced by a protein-rich midday meal. *Psychosomatic medicine*, *61*(2), 214-224.
- Gladman, D. D., Urowitz, M. B., Goldsmith, C. H., Fortin, P., Ginzler, E., Gordon, C., ... & Petri, M. (1997). The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, *40*(5), 809-813.
- Gladman, D. D., Urowitz, M. B., Slonim, D., Glanz, B., Carlen, P., Noldy, N., ... & MacKinnon, A. (2000). Evaluation of predictive factors for neurocognitive dysfunction in patients with inactive systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, *27*(10), 2367-2371.
- Glück, T., Oertel, M., Reber, T., Zietz, B., Schölmerich, J., & Straub, R.H. (2000). Altered function of the hypothalamic stress axes in patients with moderately active systemic lupus erythematosus. I. The hypothalamus-autonomic nervous system axis. *The Journal of rheumatology*, *27*(4), 903-910.
- González de Rivera, J. L., & De las Cuevas, C. (1988). Versión española del cuestionario SCL-90-R. *Tenerife: Universidad de la Laguna*.
- Gordon, J.L., & Girdler, S.S. (2014). Mechanisms underlying hemodynamic and neuroendocrine stress reactivity at different phases of the menstrual cycle. *Psychophysiology*, *51*(4), 309-18.
- Gow, R., Thomson, S., Rieder, M., Van Uum, S., Koren, G., (2010). An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci. Int.* *196*, 32-37.
- Granger DA, Kivlighan KT, El-Sheikh M, Gordis E, Stroud LR. Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1098: 122-44.

- Greenspan, J. S., Daniels, T. E., Talal, N., & Sylvester, R. A. (1974). The histopathology of Sjögren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 37(2), 217-229.
- Handa, R., Deepak, K. K., Bhatia, M., Aggarwal, P., & Pandey, R. M. (2006). Autonomic dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international*, 26(9), 837-840.
- Harbuz, M. S., Richards, L. J., Chover-González, A. J., Marti-Sistac, O., & Jessop, D. S. (2006). Stress in autoimmune disease models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1069(1), 51-61.
- Härle, P., Straub, R. H., Wiest, R., Mayer, A., Schölmerich, J., Atzeni, F., ..., Sarzi-Puttini, P., (2006). Increase of sympathetic outflow measured by neuropeptide Y and decrease of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis tone in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: another example of uncoupling of response systems. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 51-56.
- Heesen, C., Gold, S. M., Huitinga, I., Reul, J. M. H. M., (2007). Stress and hypothalamic–pituitary–adrenal axis function in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis—a review. *Psychoneuroendocrinology* 32, 604-618.
- Hemmeter, U., Störmer, R., Mager, R., Kuntze, M., Mueller-Spahn, F., Hennig, J., & Bullinger, A. (2005). Modification of virtual reality combined with a mental task stimulates cortisol in volunteers. *Neuropsychobiology*, 51, 165–172.
- Hellhammer, D. H., Wüst, S., & Kudielka, B. M. (2009). Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, 34(2), 163-171.

- Hochberg, M. C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 40(9), 1725-1725.
- Holmes, T. H., & Rahe, R. H. (1967). The social readjustment rating scale. *Journal of psychosomatic research*, 11(2), 213-218.
- Hogarth MB, Judd L, Mathias CJ. (2002). Cardiovascular autonomic function in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 11,308-12.
- Hui, K.K., Johnston, M.F., Brodsky, M., Tafur, J., & Kim Ho, M. (2009). Scleroderma, stress and CAM utilization. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6(4), 503-506.
- Huttlin, E.A., Allen, A.M., Tosun, N.L., Allen, S.S., & al'Absi, M. (2015). Associations between adrenocortical activity and nicotine response in female smokers by menstrual phase. *Addictive Behaviors*, 50, 135–39
- Hyphantis, T., Mantis, D., Voulgari, P. V., Tsifetaki, N., & Drosos, A.A. (2010). The psychological defensive profile of primary Sjogren's syndrome patients and its relationship to health-related quality of life. *Clinical and experimental Rheumatology*, 29(3), 485-493.
- Jacobs, R., Pawlak, C.R., Mikeska, E., Meyer-Olson, D., Martin, M., Heijnen, C.J., ... & Schmidt, R. E. (2001). Systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients differ from healthy controls in their cytokine pattern after stress exposure. *Rheumatology*, 40(8), 868-875.
- Jessop, D. S., Richards, L. J., & Harbuz, M. S. (2004). Brief Review Effects of Stress on Inflammatory Autoimmune Disease: Destructive or Protective?. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, 7(4), 261-266.

- Jiménez-Alonso, J., Hidalgo-Tenorio, C., Sabio, J. M., Ruiz-Irastorza, G., Ramos-Casals, A., Robles, A., ...& Pallarés, L. (2011). Guías clínicas de enfermedades autoinmunes sistémicas. Grupo de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (GEAS). Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). *Lupus Eritematoso Sistémico*.
- Johnson, E. O., Kostandi, M., Moutsopoulos, H. M., (2006). Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Sjögren's Syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1088, 41-51.
- Jönsson, P., Wallergård, M., Österberg, K., Hansen, Å. M., Johansson, G., & Karlson, B. (2010). Cardiovascular and cortisol reactivity and habituation to a virtual reality version of the Trier Social Stress Test: A pilot study. *Psychoneuroendocrinology*, 35(9), 1397-1403.
- Jung, J.Y., Nam, J.Y., Kim, H.A., & Suh, C.H. (2015). Elevated Salivary Alpha- Amylase Level, Association Between Depression and Disease Activity, and Stress as a Predictor of Disease Flare in Systemic Lupus Erythematosus: A Prospective Case–Control Study. *Medicine*, 94(30).
- Kajantie, E., & Phillips, D.I. (2006). The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, 31(2), 151-178.
- Kanda, N., Tsuchida, T., & Tamaki, K. (1999). Estrogen enhancement of anti– double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 42(2), 328-337.
- Kanner, A. D., Coyne, J. C., Schaefer, C., & Lazarus, R. S. (1981). Comparison of two modes of stress measurement: Daily hassles and uplifts versus major life events. *Journal of behavioral medicine*, 4(1), 1-39.

- Karaiskos, D., Mavragani, C.P., Makaroni, S., Zinzaras, E., Voulgarelis, M., Rabavilas, A., & Moutsopoulos, H.M. (2009). Stress, coping strategies and social support in patients with primary Sjögren's syndrome prior to disease onset: a retrospective case-control study. *Annals of the rheumatic diseases*, 68(1), 40-46.
- Keenan, P. A., Jacobson, M. W., Soleymani, R. M., Mayes, M. D., & Yaldoo, D. T. (1996). The effect on memory of chronic prednisone treatment in patients with systemic disease. *Neurology*, 47(6), 1396-1402.
- Kelly, O., Matheson, K., Martínez, A., Merali, Z., & Anisman, H. (2007). Psychosocial stress evoked by a virtual audience: relation to neuroendocrine activity. *CyberPsychology & Behavior*, 10(5), 655-662.
- Kidd, T., Carvalho, L.A., & Steptoe, A. (2014). The relationship between cortisol responses to laboratory stress and cortisol profile in daily life. *Biological Psychology*, 99, 34-40.
- Kirschbaum, C., Bartussek, D., & Strasburger, C. J. (1992). Cortisol responses to psychological stress and correlations with personality traits. *Personality and Individual Differences*, 13, 1353-1357.
- 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), 76-81.
- Kidambi, S., Raff, H., & Findling, J.W. (2007). Limitations of nocturnal salivary cortisol and urine free cortisol in the diagnosis of mild Cushing's syndrome. *European Journal of Endocrinology*, 157(6), 725-731.
- 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), 76-81.

- Kotlyar, M., Donahue, C., Thuras, P., Kushner, M. G., O'Gorman, N., Smith, E. A., & Adson, D. E. (2008). Physiological response to a speech stressor presented in a virtual reality environment. *Psychophysiology*, *45*(6), 1034-1037.
- Kozora, E., Hanly, J. G., Lapteva, L., & Filley, C. M. (2008). Cognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus: past, present, and future. *Arthritis & Rheumatism*, *58*(11), 3286-3298.
- Kozora, E., Thompson, L. L., West, S. G., & Kotzin, B. L. (1996). Analysis of cognitive and psychological deficits in systemic lupus erythematosus patients without overt central nervous system disease. *Arthritis & Rheumatism*, *39*(12), 2035-2045.
- Kozora, E., Ellison, M.C., Waxmonsky, J.A., Wamboldt, F.S., & Patterson, T.L. (2005). Major life stress, coping styles, and social support in relation to psychological distress in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, *14*(5), 363-372.
- Kudielka, B.M., Hellhammer, J., Hellhammer, D.H., Wolf, O.T., Pirke, K.M., Varadi, E., & Kirschbaum, C. (1998). Sex differences in endocrine and psychological responses to psychosocial stress in healthy elderly subjects and the impact of a 2-week dehydroepiandrosterone treatment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *83*, 1756–1761.
- Kudielka, B.M., & Kirschbaum, C. (2003). Awakening cortisol responses are influenced by health status and awakening time but not by menstrual cycle phase. *Psychoneuroendocrinology*, *28*(1), 35-47.
- Kudielka, B. M., & Kirschbaum, C. (2005). Sex differences in HPA axis responses to stress: A review. *Biological Psychology*, *69*, 113–132.
- Kudielka, B. M., Hellhammer, D. H., Kirschbaum, C., Harmon-Jones, E., & Winkielman, P. (2007). Ten years of research with the Trier Social Stress Test—

- revisited. *Social neuroscience: Integrating biological and psychological explanations of social behavior*, 56-83.
- Kudielka, B.M., Hellhammer, D.H., & Wüst, S. (2009). Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology*, 34(1), 2-18.
- Krijn, M., Emmelkamp, P. M., Olafsson, R. P., & Biemond, R. (2004). Virtual reality exposure therapy of anxiety disorders: A review. *Clinical psychology review*, 24(3), 259-281.
- Kwakkenbos, L., Willems, L. M., van den Hoogen, F. H., van Lankveld, W. G., Beenackers, H., van Helmond, T. F., ... & van den Ende, C. H. (2014). Cognitive-Behavioural Therapy Targeting Fear of Progression in an Interdisciplinary Care Program: A Case Study in Systemic Sclerosis. *Journal of clinical psychology in medical settings*, 21(4), 297-312.
- Labrador, F. J. (1996). *El estrés: Nuevas técnicas para su control*. Planeta DeAgostini.
- Lamberty, G. J., Putnam, S. H., Chatel, D. M., Bieliauskas, L. A., & Adams, K. M. (1994). A Preliminary Report. *Cognitive and Behavioral Neurology*, 7(3), 230-234.
- La Viola, J.J., Jr. (2000). A discussion of cybersickness in virtual environments. *SIGCHI Bulletin*, 32(1), 47-56.
- Lazarus, R., & Folkman, S.E. (1986). *Estrés y procesos cognitivos*. Barcelona: Martínez-Roca.
- Ling, Y., Brinkman, W. P., Nefs, H. T., Qu, C., & Heyndericky, I.(2013). The effect of perspective on presence and space perception. *PLoS ONE*, 8(11), e78513.
- Ling, Y., Brinkman, W. P., Nefs, H. T., Qu, C., & Heyndericky, I. (2012). Effects of stereoscopic viewing on presence, anxiety, and cybersickness in a virtual reality environment for public speaking. *Presence*, 21(3), 254-267.

- Ling, Y., Nefs, H. T., Morina, N., Heynderickx, I., & Brinkman, W. P. (2014). A meta-analysis on the relationship between self-reported presence and anxiety in virtual reality exposure therapy for anxiety disorders. *PLoS ONE*, *9*(5), e96144.
- Luciano, N., Valentini, V., Calabrò, A., Elefante, E., Vitale, A., Baldini, C., & Bartoloni, E. (2015). One year in review 2015: Sjögren's syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology*, *33*, 259-271.
- Lupien, S. J., Gillin, C. J., & Hauger, R. L. (1999). Working memory is more sensitive than declarative memory to the acute effects of corticosteroids: A dose-response study in humans. *Behavioral neuroscience*, *113*(3), 420.
- Lustyk, M.K.B., Olson, K.C., Gerrish, W.G., Holder, A., & Widman, L. (2010). Psychophysiological and neuroendocrine responses to laboratory stressors in women: implications of menstrual cycle phase and stressor type. *Biological Psychology*, *83*(2), 84-92.
- Malbos, E., Boyer, L., & Lançon, C. (2013). [Virtual reality in the treatment of mental disorders]. *Presse medicale (Paris, France: 1983)*, *42*(11), 1442-1452.
- Maneeton, B., Maneeton, N., & Louthrenoo, W. (2010). Cognitive Deficit in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, *28*(1), 77.
- Masi, A. T., Rodnan, G. P., Medsger Jr, T. A., Altman, R., D'Angelo, W., & Fries, J. (1980). Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*, *23*(5), 581-590.

- Matsuura, E., Ohta, A., Suematsu, R., Inoue, H., Koarada, S., Tada, Y., ... & Nagasawa, K. (2011). Functional disturbance of the stress-adaptation system in patients with scleroderma. *Modern rheumatology*, 21(4), 397-405.
- McCray, C. J., Agarwal, S. K., (2011). Stress and autoimmunity. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 31, 1-18.
- McEwen, B. S., (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 886, 172-189.
- McLaurin, E. Y., Holliday, S. L., Williams, P., & Brey, R. L. (2005). Predictors of cognitive dysfunction in patients with systemic lupus erythematosus. *Neurology*,64(2), 297-303.
- Meyer, J., Novak, M., Hamel, A., Rosenberg, K., (2014). Extraction and analysis of cortisol from human and monkey hair. *J. Vis. Exp.* 83.
- Meyer, J. S., Novak, M. A., (2012). Minireview: hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology* 153, 4120-4127.
- Miller, B. E., Deutsch, O., Redlich, M., Konttinen, Y. T., Benoliel, R., Zaks, B., ..., Aframian, D. J., (2012). Sialochemistry and cortisol levels in patients with Sjogren's syndrome. *Oral Dis.* 18, 255-259.
- Mikdashi, J. A. (2007). Proposed response criteria for neurocognitive impairment in systemic lupus erythematosus clinical trials. *Lupus*, 16(6), 418-425.
- Monastero, R., Bettini, P., Del Zotto, E., Cottini, E., Tincani, A., Balestrieri, G., ... & Padovani, A. (2001). Prevalence and pattern of cognitive impairment in systemic lupus erythematosus patients with and without overt neuropsychiatric manifestations. *Journal of the neurological sciences*, 184(1), 33-39.
- Montero-López, E., Santos-Ruiz, A., García-Ríos, M.C., Rodríguez-Blázquez, R., Pérez-García, M., & Peralta-Ramírez M.I. (2016). A virtual reality approach to the Trier

- Social Stress Test: Contrasting two distinct protocols. *Behavior research methods*, *1*, 223-232.
- Morina, N., Brinkman, W., Hartanto, D., & Emmelkamp, P.M.G. (2014). Sense of presence and anxiety during virtual social interactions between a human and virtual humans. *PeerJ*, *2*, e337.
- Moya Albiol, L., & Salvador, A. (2001). Empleo de estresores psicológicos de laboratorio en el estudio de la respuesta psicofisiológica al estrés.
- McCray, C. J., & Agarwal, S. K. (2011). Stress and autoimmunity. *Immunology and allergy clinics of North America*, *31*(1), 1-18.
- Munck, A., & Náray-Fejes-Tóth, A. (1994). Glucocorticoids and stress: permissive and suppressive actions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *746*(1), 115- 130.
- Navarrete-Navarrete, N., Peralta-Ramírez, M.I., Sabio-Sánchez, J.M., Coín, M.A., Robles-Ortega, H., Hidalgo-Tenorio, C., ... & Jiménez-Alonso, J. (2010). Efficacy of cognitive behavioral therapy for the treatment of chronic stress in patients with lupus erythematosus: a randomized controlled trial. *Psychotherapy and Psychosomatics*, *79*(2), 107-115.
- Newton, E. G., Thombs, B. D., & Groleau, D. (2012). The experience of emotional distress among women with scleroderma. *Qualitative health research*, *22*(9), 1195-1206.
- Nicolson, N., Storms, C., Ponds, R., & Sulon, J. (1997). Salivary cortisol levels and stress reactivity in human aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *52*(2), M68-M75.
- Nishimura, K., Omori, M., Katsumata, Y., Sato, E., Gono, T., Kawaguchi, Y., ... & Ishigooka, J. (2015). Neurocognitive impairment in corticosteroid-naïve patients with active

- systemic lupus erythematosus: a prospective study. *The Journal of rheumatology*, 42(3), 441-448.
- Organización Mundial de la Salud. (1993). Extraído de www.who.int/es/
- Otto, R., & Mackay, I.R. (1967). Psycho-social and emotional disturbance in systemic lupus erythematosus. *The Medical Journal of Australia*, 2,(11), 488.
- Parker, K. J., Schatzberg, A. F., & Lyons, D. M. (2003). Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Hormones and Behavior*, 43, 60–66.
- Pawlak, C. R., Jacobs, R., Mikeska, E., Ochsmann, S., Lombardi, M. S., Kavelaars, A., ... & Schedlowski, M. (1999). Patients with systemic lupus erythematosus differ from healthy controls in their immunological response to acute psychological stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 13(4), 287-302.
- Pawlak, C.R., Witte, T., Heiken, H., Hundt, M., Schubert, J.O.R., Wiese, B., ... & Heijnen, C. J. (2003). Flares in patients with systemic lupus erythematosus are associated with daily psychological stress. *Psychotherapy and psychosomatics*, 72(3), 159-165.
- Peralta-Ramírez, M.I., Coín-Mejías, M.A., Jiménez-Alonso, J., Ortego-Centeno, N., Callejas-Rubio, J.L., Caracuel-Romero, A., & Pérez-García, M. (2006). Stress as a predictor of cognitive functioning in lupus. *Lupus*, 15(12), 858-864.
- Peralta-Ramírez, M.I., Jiménez-Alonso, J., Godoy-García, J.F., Pérez-García, M., & Group Lupus Virgen de las Nieves. (2004). The effects of daily stress and stressful life events on the clinical symptomatology of patients with lupus erythematosus. *Psychosomatic medicine*, 66(5), 788-794.
- Peralta-Ramírez, M. I., Jiménez-Alonso, J., & Pérez-García, M. (2009). Which stressors are responsible for the worsening in the clinical symptomatology of lupus?. *Health*, 1(04), 313.

- Peralta-Ramírez, M. I., Navarrete-Navarrete, N., & Pérez-García, M. (2006). La importancia del estrés psicosocial y su abordaje psicológico y educativo en lupus. En *Educación social, formación, realidad y retos*. Coord. Añaños-Brediñana, F. T. Grupo Editorial Universitario. Granada, 5, 471-482.
- Pertaub, D. P., Slater, M., & Barker, C. (2002). An experiment on public speaking anxiety in response to three different types of virtual audience. *Presence: Teleoperators and Virtual Environments*, 11(1), 68–78.
- Petri, M., Bechtel, B., Dennis, G., Shah, M., McLaughlin, T., Kan, H., & Molta, C. (2014). Burden of corticosteroid use in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Delphi panel. *Lupus*, 23(10), 1006-1013.
- Pool, A. J., Whipp, B. J., Skasick, A. J., Alavi, A., Bland, J. M., & Axford, J. S. (2004). Serum cortisol reduction and abnormal prolactin and CD4+/CD8+ T-cell response as a result of controlled exercise in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus despite unaltered muscle energetics. *Rheumatology*, 43(1), 43-48.
- Pruessner, J. C., Gaab, J., Hellhammer, D. H., Lintz, D., Schommer, N., & Kirschbaum, C. (1997). Increasing correlations between personality traits and cortisol stress responses obtained by data aggregation. *Psychoneuroendocrinology*, 22(8), 615–625.
- 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), 916–31.
- Ramos-Casals, M., García-Carrasco, M., Cervera, R., Font, J., & Ingelmo, M. (2005). Significado clínico de las alteraciones analíticas en el síndrome de Sjögren. *Revista Española de Reumatología*, 32(3), 134-146.

- Remor, E. (2006). Psychometric properties of a European Spanish version of the Perceived Stress Scale (PSS). *The Spanish journal of psychology*, 9(01), 86-93.
- Remor, E. A., & Carrobbles, J. A. (2001). The Perceived Stress Scale. Psychometric Study with Spanish HIV+ Sample. In *22nd International Conference STAR* (pp. 12-14).
- Ricker, J. H., & Axelrod, B. N. (1994). Analysis of an oral paradigm for the Trail Making Test. *Assessment*, 1(1), 47-51.
- Robles, H., & Peralta, M. I. (2006). *Programa para el control del estrés*. Madrid: Pirámide.
- Roussou, E., Iacovou, C., Weerakoon, A., & Ahmed, K. (2013). Stress as a trigger of disease flares in SLE. *Rheumatology international*, 33(5), 1367-1370.
- Ruiz-Arruza, I., Ugarte, A., Cabezas-Rodríguez, I., Medina, J. A., Moran, M. A., Ruiz-Irastorza, G.(2014). Glucocorticoids and irreversible damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 53, 1470-1476.
- Ruiz-Irastorza, G., Danza, A., & Khamashta, M. (2012). Glucocorticoid use and abuse in SLE. *Rheumatology*, ker410.
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, 37(5), 589-601.
- Sanchez-Cubillo, I., Perianez, J. A., Adrover-Roig, D., Rodriguez-Sanchez, J. M., Rios-Lago, M., Tirapu, J. E. E. A., & Barcelo, F. (2009). Construct validity of the Trail Making Test: role of task-switching, working memory, inhibition/interference control, and visuomotor abilities. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 15(3), 438.
- Sandín, B. (2009). El estrés. En Belloch, A., Sandín, B., & Ramos, F. *Manual de psicopatología* (pp.10-22), vol. 2, McGraw-Hill España.

- Sánchez-Román, J., Castillo-Palma, M. J., García-Hernández, F. J. (2010). *Enfermedades autoinmunes sistémicas (Manual de información para pacientes y familiares)*. Asociación de Autoinmunes y Lúpicos de Sevilla (ALUS).
- Sanna, G., Bertolaccini, M. L., & Khamashta, M. A. (2008). Neuropsychiatric involvement in systemic lupus erythematosus: current therapeutic approach. *Current pharmaceutical design*, 14(13), 1261-1269.
- Santos-Ruiz, A. M. (2012). *Mecanismos alterados de la respuesta al estrés en pacientes con lupus eritematoso sistémico*. Granada: Universidad de Granada.
- Santos-Ruiz, A., Peralta-Ramírez, M. I., García-Ríos, M. C., Muñoz, M. A., Navarrete-Navarrete, N., & Blázquez-Ortiz, A. (2010). Adaptation of the trier social stress test to virtual reality: psycho-physiological and neuroendocrine modulation. *Journal of CyberTherapy and Rehabilitation*, 3(4), 405-415.
- Sarnes, E., Crofford, L., Watson, M., Dennis, G., Kan, H., & Bass, D. (2011). Incidence and US costs of corticosteroid-associated adverse events: a systematic literature review. *Clinical therapeutics*, 33(10), 1413-1432.
- Sapolsky, R. M. (2008). *¿Por qué las cebras no tienen úlcera?: La guía del estrés*. Alianza editorial.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions 1. *Endocrine reviews*, 21(1), 55-89.
- Sauvé, B., Koren, G., Walsh, G., Tokmakejian, S., Van Uum, S. H., (2007). Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure. *Clin. Invest. Med.* 30, 183-191.
- Schubert, C., Lampe, A., Rumpold, G., Fuchs, D., König, P., Chamson, E., & Schüssler, G. (1999). Daily psychosocial stressors interfere with the dynamics of urine

- neopterin in a patient with systemic lupus erythematosus: an integrative single- case study. *Psychosomatic medicine*, 61(6), 876-882.
- Schubert, T., Friedmann, F., & Regenbrecht, H. (2001). The experience of presence: Factor analytic insights. *Presence: Teleoperators and Virtual Environments*, 10, 266–281.
- Schubert, C., Lampe, A., Geser, W., Noisternig, B., Fuchs, D., König, P., ... & Schüßler, G. (2003). Daily psychosocial stressors and cyclic response patterns in urine cortisol and neopterin in a patient with systemic lupus erythematosus. *Psychoneuroendocrinology*, 28(3), 459-473.
- Schubert, C., Geser, W., Noisternig, B., Fuchs, D., Welzenbach, N., König, P., ... & Lampe, A. (2012). Stress system dynamics during “life as it is lived”: an integrative single-case study on a healthy woman. *PloS one*, 7(3), e29415.
- Shirotsuki, K., Izawa, S., Sugaya, N., Yamada, K.C., Ogawa, N., Ouchi, Y., & Nomura, S. (2009). Salivary cortisol and DHEA reactivity to psychosocial stress in socially anxious males. *The International Journal of Psychophysiology*, 72, 198–203.
- Selye, H. (1964). *La tensión en la vida: (el stress)*. Compañía General Fabril Editora.
- Sestak, A. L., Fürnrohr, B. G., Harley, J. B., Merrill, J. T., & Namjou, B. (2011). The genetics of systemic lupus erythematosus and implications for targeted therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(Suppl 1), 37-43.
- Shalimar HR, Deepak KK, Bhatia M, Aggarwal P, Pandey RM. Autonomic dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology Int* 2006; 26:837-840.
- Shelomkova, O., Veltishchev, D., Lisitsyna, T., Vasiliev, V., Kovalevskaya, O., Seravina, O., ... & Nasonov, E. (2013). Mental disorders and stress in Sjogren's syndrome patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72, 917-917.
- Shoenfeld, Y., Zandman-Goddard, G., Stojanovich, L., Cutolo, M., Amital, H., Levy, Y., ... & Carvalho, J. D. (2008). The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental

- factors involved in autoimmune diseases--2008. *The Israel Medical Association Journal*, 10(1), 8.
- Silverman MN, Sternberg EM. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1261:55-63.
- Sjögren, E., Leanderson, P., & Kristenson, M. (2006). Diurnal saliva cortisol levels and relations to psychosocial factors in a population sample of middle-aged Swedish men and women. *International journal of behavioral medicine*, 13(3), 193-200.
- Skoluda, N., Strahler, J., Schlotz, W., Niederberger, L., Marques, S., Fischer, S., ... & Nater, U. M. (2015). Intra-individual psychological and physiological responses to acute laboratory stressors of different intensity. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 227-236.
- Sjörs, A., Larsson, B., Karlson, B., Osterberg, K., Dahlman, J., & Gerdle, B. (2010). Salivary cortisol response to acute stress and its relation to psychological factors in women with a chronic trapezius myalgia-a pilot study-. *Psychoneuroendocrinology*, 35(5), 674-685.
- Smith, P.P., & Gordon, C. (2010). Systemic lupus erythematosus: clinical presentations. *Autoimmunity Reviews*, 10(1), 43-45.
- Sociedad Española de Reumatología. ¿Qué es el síndrome de Sjögren?
- Sociedad Española de Reumatología. ¿Qué es la esclerosis sistémica?
- Solomon, G.F. (1998). Immune & Nervous System Interactions. *Malibu: Fund for Psychoneuroimmunology*.
- Stojanovich, L. (2010). Stress and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 9(5), A271-A276.
- Stojanovich, L., & Marisavljevich, D. (2008). Stress as a trigger of autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*, 7(3), 209-213.

- Straub, R. H., Dhabhar, F. S., Bijlsma, J. W., & Cutolo, M. (2005). How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 52(1), 16-26.
- Straub, R. H. (2014). Rheumatoid arthritis: Stress in RA: a trigger of proinflammatory pathways?. *Nature Reviews Rheumatology*, 10(9), 516-518.
- Straub, R. H., Cutolo, M., Buttgerit, F., & Pongratz, G. (2010). Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. *Journal of internal medicine*, 267(6), 543-560.
- Takahashi, H., Washio, M., Kiyohara, C., Tada, Y., Asami, T., Ide, S., ... & Horiuchi, T. (2014). Psychological stress in a Japanese population with systemic lupus erythematosus: Finding from KYSS study. *Modern Rheumatology*, 24(3), 448- 452.
- Teixidó Gómez, F. (2003). *Biología de las emociones. Editorial Filarias.*
- Thomas, S., Bacon, A. K., Sinha, R., Uhart, M., & Adinoff, B. (2012). Clinical laboratory stressors used to study alcohol-stress relationships. *Alcohol Research: current reviews*, 34(4), 459-467.
- Thombs, B. D., van Lankveld, W., Bassel, M., Baron, M., Buzza, R., Haslam, S., ... & Worrone-Sauve, M. (2010). Psychological health and well-being in systemic sclerosis: State of the science and consensus research agenda. *Arthritis care & research*, 62(8), 1181-1189.
- Tsokos, G. C. (2011). Systemic Lupus Erythematosus. *The New England journal of medicine*, 365(22), 2110-2121.
- Tzioufas, A. G., Tsonis, J., Moutsopoulos, H. M., (2008). Neuroendocrine dysfunction in Sjögren's syndrome. *Neuroimmunomodulation* 15, 37-45.
- Usoh, M., Catena, E., Arman, S., & Slater, M. (2000). Using presence questionnaires in reality. *Presence: Teleoperators and Virtual Environments*, 9(5), 497-503.

- van der Goes, M.C., Bossema, E.R.,..., & Hartkamp, A. (2011). Cortisol during the day in patients with systemic lupus erythematosus or primary Sjögren's Syndrome. *Journal of Rheumatology*, 38, 85-88.
- van Holland, B. J., Frings-Dresen, M. H., Sluiter, J. K. (2012). Measuring short-term and long-term physiological stress effects by cortisol reactivity in saliva and hair. *Int. Arch Occup. Environ. Health* 85, 849-852.
- Vargas-Hitos, J.A., Sabio, J. M., Martínez-Egea, I., Jiménez-Jáimez, E., Rodríguez-Guzmán, M., Navarrete-Navarrete, N., ... & Jiménez-Alonso, J. (2014). Influence of psychological stress on headache in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology*, 41(3), 453-457.
- Vinkers, C.H., Penning, R., Hellhammer, J., Verster, J.C., Klaessens, J.H., Olivier, B.M., & Kalkman, C.J. (2013). The effect of stress on core and peripheral body temperature in humans. *Stress*, 5, 520–530.
- Vila-Castelar, J. (2000). *Una introducción a la psicofisiología clínica*. Madrid: Pirámide.
- Walder, D.J., Statucka, M., Daly, M.P., Axen, K., & Haber, M. (2012). Biological sex and menstrual cycle phase modulation of cortisol levels and psychiatric symptoms in a non clinical sample of young adults. *Psychiatry Research*, 197(3), 314-321.
- Ward, M.M., Marx, A.S., & Barry, N.N. (2002). Psychological distress and changes in the activity of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 41(2), 184-188.
- Ware Jr, J. E., & Sherbourne, C. D. (1992). The MOS 36-item short-form health survey (SF36): I. Conceptual framework and item selection. *Medical care*, 473-483.
- Welch, T. R., Brickman, C., Bishof, N., Maringhini, S., Rutkowski, M., Frenzke, M., & Kantor, N. (1998). The phenotype of SLE associated with complete deficiency of complement isotype C4A. *Journal of clinical immunology*, 18(1), 48-51.

- Wekking, E.M., Vingerhoets, A.J.J.M., Van Dam, A.P., Nossent, J.C., & Swaak, A.J.J.G. (1991). Daily stressors and systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis—first findings. *Psychotherapy and psychosomatics*, 55(2-4), 108-113.
- Williams, R. A., Hagerly, B. M., & Brooks, G. (2004). Trier Social Stress Test. A method for use in nursing research. *Nursing Research*, 53, 277–280.
- Williams, E.M., Bruner, L., Penfield, M., Kamen, D., & Oates, J.C. (2014). Stress and Depression in Relation to Functional Health Behaviors in African American Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatology (Sunnyvale, Calif.)*, 2014(Suppl 4).
- Wolfram, M., Bellingrath, S., & Kudielka, B.M. (2011). The cortisol awakening response (CAR) across the female menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinology*, 36(6), 905-912.
- Wolfram, M., Bellingrath, S., Feuerhahn, N., & Kudielka, B.M. (2013). Emotional exhaustion and overcommitment to work are differentially associated with hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis responses to a low-dose ACTH1–24 (Synacthen) and dexamethasone–CRH test in healthy school teachers. *Stress*, 16(1), 54-64.
- Xie, Q., Gao, W., Li, J., Qiao, T., Jin, J., Deng, H., Lu, Z., 2011. Correlation of cortisol in 1-cm hair segment with salivary cortisol in human: hair cortisol as an endogenous biomarker. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49, 2013-2019.
- Zanardi, V. A., Magna, L. A., & Costallat, L. T. L. (2001). Cerebral atrophy related to corticotherapy in systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical rheumatology*, 20(4), 245-250.
- Zarit, S. H., Reever, K. E., & Bach-Peterson, J. (1980). Relatives of the impaired elderly: correlates of feelings of burden. *The gerontologist*, 20(6), 649-655.

ANEXOS

ANEXO I

A virtual reality approach to the Trier Social Stress Test: Contrasting two distinct protocols

Eva Montero-López · Ana Santos-Ruiz ·
M. Carmen García-Ríos · Raúl Rodríguez-Blázquez ·
Miguel Pérez-García · María Isabel Peralta-Ramírez

© Psychonomic Society, Inc. 2015

Abstract Virtual reality adaptations of the Trier Social Stress Test (TSST-VR) constitute useful tools for studying the physiologic axes involved in the stress response. Here, we aimed to determine the most appropriate experimental approach to the TSST-VR when investigating the modulation of the axes involved in the stress response. We compared the use of goggles versus a screen projection in the TSST-VR paradigm. Forty-five healthy participants were divided into two groups: the first one (goggles condition; 13 females, 11 males) wore goggles while performing the TSST-VR; the second (screen condition; 15 females, six males) was exposed to the TSST-VR projected on a screen. Sympathetic reactivity to stress was measured by continuously recording skin conductance (SC), while the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) was evaluated by sampling salivary cortisol throughout the experiment. At the end of the task, there was an increase in SC and cortisol level for both means of delivering the TSST-VR, although the increase in SC was greater in the goggles

condition, while salivary cortisol was comparable in both groups. Immersion levels were reportedly higher in the screen presentation than in the goggles group. In terms of sex differences, females experienced greater involvement and spatial presence, though comparatively less experienced realism, than their male counterparts. These findings help us determine which protocol of the TSST-VR is most suitable for the stress response under study. They also emphasize the need to consider the sex of participants, as males and females show distinct responses in each protocol.

Keywords TSST · Virtual reality · Hypothalamic-pituitary-adrenal axis · Sympathetic activation · Salivary cortisol

E. Montero-López (✉) · M. Pérez-García · M. I. Peralta-Ramírez
Department of Clinical Psychology, Faculty of Psychology,
University of Granada, Campus de Cartuja s/n,
18071 Granada, Spain
e-mail: evamonterolopez1983@gmail.com

A. Santos-Ruiz
Department of Health Psychology, Faculty of Health Sciences,
University of Alicante, Alicante, Spain

M. C. García-Ríos
Department of Physical Therapy, Faculty of Health Sciences,
University of Granada, Granada, Spain

R. Rodríguez-Blázquez
Health Center of Villarrodrigo, Jaén, Spain

M. Pérez-García · M. I. Peralta-Ramírez
Mind, Brain and Behavior Research Center (CIMCYC),
Granada, Spain

Introduction

The Trier Social Stress Test (TSST) is an experimental paradigm used as a tool in investigating the psychobiologic stress response in the laboratory, as it activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) (Kirschbaum, Pirke, & Hellhammer, 1993). The response is reflected in an increase in heart rate, blood pressure, and adrenaline and cortisol levels, as well as in a negative effect on mood (Al'Absi et al., 1997; Nicolson, Storms, Ponds, & Sulon, 1997). In the traditional TSST, as proposed by Kirschbaum et al. (1993), participants have to prepare a speech, claiming they are suitable for a given job appointment, articulate the speech in front of an audience, and subsequently complete an arithmetic task in public. The audience is generally composed of people who had been previously trained in neutral verbal and non-verbal behaviors (Foley & Kirschbaum, 2010).

Vinkers et al. (2013) recorded psychophysiological variables to investigate the effects of stress on core and peripheral body temperature in humans. They used the TSST and obtained distinct response patterns in men (i.e., increased cheek temperature) and women (i.e., decreased nasal skin temperature).

The original TSST has been utilized, since its inception, to measure stress reactivity in diverse populations such as children (TSST-C; Buske-Kirschbaum et al., 1997), middle-aged adults (Fiocco, Jooper, & Lupien, 2007), and retired people (Kudielka et al., 1998), as well as in various pathologies, such as psychiatric patients (Brenner et al., 2009), metabolic syndrome (Chrousos, 2000), systemic hypertension (Esler et al., 2008), systemic lupus erythematosus (Pawlak et al., 1999; Santos-Ruiz et al., 2010), and myalgias (Sjörs et al., 2010). Likewise, the TSST has been used to test the relationship between stress and a variety of psychologic variables, such as depression (Parker, Schatzberg, & Lyons, 2003), social anxiety (Shirotsuki et al., 2009), and personality traits (Kirschbaum, Bartussek, & Strasburger, 1992; Pruessner et al., 1997).

The adaptation of the TSST into a virtual reality (VR) environment elicits a significant physiologic response, thus solving some of the common TSST limitations that come from constraints both in the design of different environments or set-ups and from the assembling of acceptably large audiences for each experimental session, given that the magnitude of the stress response depends in part on the size of the audience. An additional limitation results from the cost of TSST implementation, as it is necessary to have separate rooms for experimental subjects and audiences, a certain time is spent in training audience participants to show neutral behaviors in response to subjects' performance, and audiences may be unreliable and show distinct behaviors between one participant and another. Therefore, it would seem that the TSST in the virtual environment constitutes a viable alternative to the usual forms of presentation of stress tasks (Kotlyar et al., 2008).

Virtual reality tasks are increasingly used in the laboratory setting, given their convenience and efficacy in providing three-dimensional (3D) computerized environments and set-ups with which to study various pathologies and their associated responses (e.g., stress). In reviewing recent research on the application of VR to the treatment of mental disorders, Malbos, Boyer, and Lançon (2013) concluded that there was sufficient evidence to attest to the efficacy of this methodology in the assessment and treatment of distinct mental disorders.

In a related investigation, Kelly, Matheson, Martinez, Merali, and Anisma (2007) utilized the TSST-VR, as delivered by *Virtually Better Inc.*, Atlanta, GA, in which a previously recorded virtual audience was presented in 3D. Results indicated that giving a speech and carrying out an arithmetic task in front of a virtual audience produced a significant

increase in salivary cortisol (30 %), even though the increase was greater when both tasks were conducted in front of a real audience (90 %).

In their study, Kotlyar et al. (2008) demonstrated that the TSST-VR resulted in a physiologic response with significant increases observed in response to each stress task in systolic and diastolic blood pressure and heart rate, a finding that suggests the TSST-VR constitutes a viable alternative to previous TSST methodologies, with the additional advantages of reducing variability in the mode of presentation, and decreasing human and financial costs.

Several studies have used the TSST-VR in recent years. For instance, Jönsson et al. (2010) used a CAVE™ system developed at the *Electronic Visualization Laboratory* of the University of Illinois in Chicago, which facilitates total immersion by means of a VR room, a head-tracking system, and passive stereoscopy. This study's main results center on the habituation of the various measures of sympathetic activity obtained in response to the second implementation of the TSST-VR. On the first performance of the TSST-VR there was an 88 % increase of salivary cortisol with respect to baseline levels, which was habituated in the second session.

Another version of the TSST-VR was implemented by Santos Ruiz et al. (2010) by projecting a 3D virtual audience onto a screen. Results showed that this version of the TSST-VR resulted in significant sympathetic activation, as well as activation of the HPA axis in the majority of participants. It was, therefore, concluded that this form of the TSST-VR stimulated the main axes involved in the stress response.

Given the results obtained to date, it seems that the TSST-VR constitutes a useful technique in the study of the activation of the basic axes involved in the stress response. Considering the advantages of this way of presenting the TSST paradigm, it would be beneficial to further investigate which methodologic variations produce greater or lesser immersion in the virtual environment, as we hypothesize that the level of immersion will determine the level of activation of the physiologic axes involved in the stress response. Additionally, it would be worthwhile to explore whether there are sex differences in the stress response brought about by the TSST-VR, as traditional TSST studies have shown that this task results in larger increases of salivary cortisol in men than in women (Foley & Kirschbaum, 2010; Kirschbaum et al., 1993; Williams, Hagerly, & Brooks, 2004).

Annerstedt et al. (2013) carried out a pilot study in which a VR environment was used with two distinct objectives; first, producing physiologic stress by means of the TSST-VR, and, secondly, comparing physiologic recovery in different virtual environments after inducing the stress response. Their results showed that the TSST-VR activates the HPA axis and that recovery from the induced stress response varied as a function of the type of virtual environment to which participants were exposed.

Previous studies of the TSST in the virtual environment have differed in the way they projected 3D images, with some projecting images onto a screen and others using 3D goggles.

Morina, Brinkman, Hartanto, and Emmelkamp (2014) examined levels of anxiety and sense of presence during exposure to two types of virtual environments: a head-mounted display (HMD) with motion tracker and stereoscopic view, and a one-screen projection-based VR display. Their results suggest that both VR displays were equally effective in evoking moderate levels of anxiety, although the HMD display appeared to produce a stronger sense of presence.

We have explored the potential differences between studies of the TSST-VR paradigm that have used goggles and those that have used a projection screen, and it appears that none of them show a conclusive advantage of using one method over the other in terms of activating the axes of the stress response. Thus, our objectives were twofold. First, we aimed to investigate which of two TSST-VR protocols induced greater sympathetic activation, as measured by skin conductance, and HPA axis activation, as measured by secretion of salivary cortisol. Both protocols included a 3D virtual audience but, while one was presented on a large screen, the other was presented by virtual goggles. A second objective in this study was to examine whether there were sex differences in the activation of either axis, as is the case in the traditional TSST, and whether they differed according to the two TSST-VR protocols.

Method

Participants

Forty-five students attending the University of Granada volunteered their participation in this study. They were divided into two groups, according to which protocol of the TSST-VR was used: 3D goggles or a large screen projection. The goggles group included 13 females and 11 males, with a mean age of 21.9 years ($SD = 5$) and 14 years of schooling on average ($SD = 0$). The screen group contained 15 females and six males, with a mean age of 20.4 years ($SD = 1.25$) and 14 years of schooling on average ($SD = 0$).

The following were the exclusion criteria, adopted because of their potentially negative effect on cortisol levels (Williams et al., 2004): hypertension, heart disease, obesity, clinical diagnosis of depression or anxiety, personality disorders, and substance use (i.e., amphetamines, methadone, barbiturates, or muscle relaxants). We also recorded sleep duration and excluded any participant that had not slept a minimum of 4 hours on the night prior to the experiment. Participants provided data on sleep duration as part of the semi-structured interview.

On arrival at the laboratory, participants were given information about the experiment and asked to sign an informed consent form approved by the Ethics Committee of the University of Granada and performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki. Immediately afterwards, they were administered the semi-structured interview.

Instruments

The questionnaires below provided meaningful covariates that could be used in statistical analyses of the psychophysiological measures and cortisol.

Semi-structured interview Including sociodemographic data, daily life and sleep habits, medication, menstrual cycle, and history of psychiatric or psychological treatment.

Stress Vulnerability Inventory (SVI) (Beech, Burns, & Scheffield, 1986; Spanish adaptation, validated by Robles-Ortega, Peralta-Ramirez, & Navarrete-Navarrete, 2006). This instrument consists of 22 items and evaluates the individual's predisposition to be affected by perceived stress. The Spanish adaptation by Robles-Ortega et al. (2006) shows a Cronbach's alpha of 0.87. As for convergent validity, the results show a significant positive correlation ($p < 0.01$) with the following assessment scales: STAI-R, Beck Depression Inventory, Somatic Symptom Scale, and Survey of Recent Life Experiences (SRLE).

Perceived Stress Scale (PSS) (Cohen, Kamarak, & Mermeistein, 1983; Spanish adaptation by Remor & Carrobes, 2001) The PSS is a self-report scale used to evaluate perceived stress level and the degree to which people find their lives unpredictable, uncontrollable, or overwhelming (aspects that contribute to stress). It consists of 14 items with five response alternatives. The highest score corresponds to the highest perceived stress level. The Spanish version of the PSS (14 items) has adequate reliability (internal consistency = 0.81 and test-retest = 0.73), concurrent validity, and sensitivity (Remor, 2006). Here, we have considered those scores over 22 (i.e., the mean score for the Spanish population; Remor & Carrobes, 2001) as reflecting high levels of perceived stress.

SCL-90-R Symptoms Inventory (Derogatis, 1994; Spanish adaptation by Gonzalez de Rivera & De las Cuevas, 1988) We used this instrument to rule out potential psychopathology in the participants. This self-report questionnaire was developed to assess symptoms of psychopathology and includes 90 items with five response alternatives (0–4) on a Likert scale. Subjects respond according to how they have felt within the past seven days, including the day the inventory is administered. The inventory is scored and interpreted according to nine main dimensions (somatization, obsessive-compulsive

symptoms, interpersonal sensitivity, depression, anxiety, hostility, phobic anxiety, paranoid ideation, and psychoticism) and three global indices of psychological distress (Global Severity Index [GSI], Positive Symptom Total [PS], and Positive Symptom Distress Index [PSDI]). In this study, we analyzed these last three global indices. This instrument is thought to have satisfactory reliability and validity (De las Cuevas et al., 1991).

Igroup Presence Questionnaire (IPQ; Schubert, Friedmann, & Regenbrecht, 2001) The IPQ is used to measure the sense of presence experienced in a virtual environment. The questionnaire was used to rule out the possibility that potential differences between groups could be attributable to variations in the sense of presence experienced by participants within the virtual environment. IPQ responses range from -3 (=totally disagree) to $+3$ (=totally agree). The IPQ includes a total of 14 items, consisting of a *global scale* (with scores between -3 and 3) and three subscales: *spatial presence* (i.e., the sense of being physically present in the virtual environment), with scores between -15 and 15 ; *involvement* (i.e., the attention devoted to the virtual environment and the degree of involvement experienced), with scores between -12 and 12 ; and *experienced realism* (i.e., the subjective experience of realism in the virtual environment), with scores between -12 and 12 . Reliability data are not yet available for the Spanish population.

Virtual reality version of the Trier Social Stress Test (TSST-VR) This is a virtual-reality adaptation of the traditional TSST. It includes a computer program that enables the design of a 3D audience, which can be projected into a set of VR goggles (eMagin Z800 3Dvisor) with a viewing equivalent of a 105-in diagonal movie screen viewed at 12 ft, with a 40° field of view and stereoscopic image with a 800×600 triad pixels per display (<http://www.3dvisor.com/>) connected to a computer or, alternatively, can be projected onto a screen.

Pertaub, Slater, and Barker (2002) showed that participants that are exposed to three virtual audiences whose behavior is different toward the speaker (i.e., neutral, positive, or negative) generate distinct responses in the speaker. In the present study, all participants were exposed to the same type of audience, in identical VR and protocol conditions. Presentations were all stereoscopic, since Ling, Brinkman, Nefs, Qu, and Heynderickx (2012) had shown that stereoscopic VR presentations improved the sense of spatial presence in the case of public speaking. Sound volume and audience behavior were the same for all presentations.

World Viz (http://www.worldviz.com/industries/academic/neuroscience#Starter_Kit) was adopted as the software of choice, as it provides VR environments that can be integrated with fMRI signals, biologic responses, motion-tracking input, and 3D rendering. The Vizard program, with

its high-level scripting language, affords the creation of interactive 3D content and the integration of biologic signals.

The screen was 2.21 m wide and 2.30 m high, with a 44° field of view and stereoscopic image of 1600×1200 triad pixels per display and a distance of 1.75 m from the participant.

Both VR delivery protocols require that participants wear earphones to listen to the sounds coming from the virtual environment, as well as a microphone to mislead them into thinking that their speech will be recorded and thus enhance the threatening effect of the social evaluation component and the participants' level of psychosocial stress. Once the participants were ready to start the experiment, they were informed that the task included four different phases. During the 3-min initial phase, participants were instructed to relax and remain still. This phase was designated as the *period of psychophysiological adaptation to the virtual environment (baseline of skin conductance)*. Under both experimental conditions, participants were seated. In the Screen Projection condition, they faced a screen showing a 3D image of a stage curtain, while in the Goggles condition, the same image was projected by means of virtual goggles. The second phase, labeled the *anticipatory stress period*, lasted 5 min, during which participants were required to prepare a speech, describing their positive and negative traits, to be delivered in front of the virtual audience. The third phase, also of 5 min in duration, was called the *speech delivery period*. During this period, the curtain came up, the virtual audience appeared (Fig. 1), and participants had to begin delivering their speeches. They were instructed to speak for the entire 5 min without interruption and attend to the form and content of the speech, as they would greatly determine the audience's response to their speech. The end of the speech constituted the beginning of the last phase of the stressful task, the *arithmetic task*, based on the Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT) in which participants were asked to add two consecutive numbers (i.e., the number they just heard and the one that just preceded it), delivered by means of an auditory recording.

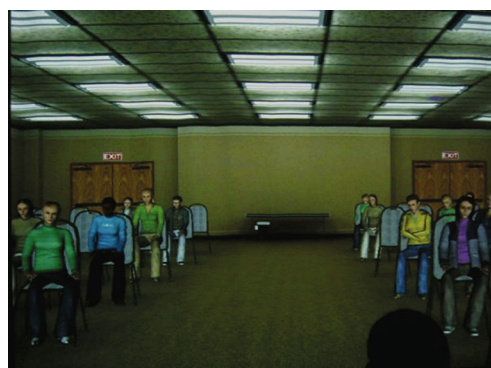


Fig. 1 Three-dimensional virtual audience as projected onto a large screen

Procedure

The study was scheduled according to the diurnal cortisol curve, between 3:00 pm and 6:00 pm, when levels of salivary cortisol are more stable. Although cortisol levels are reportedly stable between 2:00 pm and 4:00 pm (Kudielka & Kirschbaum, 2005), Spanish metabolic and circadian rhythms could differ from those of other European countries, due to the greater number of light hours and the distinctive schedule of meals. Therefore, following a pilot study, Santos-Ruiz et al. (2010) determined in a Spanish sample that cortisol levels were stable between 3:00 pm and 6:00 pm, so all participants were tested in the afternoon, within this temporal window.

Once the participants arrived at the laboratory, they were given information about the experiment and a consent form to be read and signed. Afterwards, they were interviewed and completed the following questionnaires: SV, PSS, and SCL-90-R.

Next, participants were fitted with electro-dermal electrodes to record their skin conductance responses at various time intervals (see assessment of the sympathetic reactivity section below).

Immediately afterwards, the TSST-VR was explained to the participant, the first salivary cortisol sample (*pre-exposure cortisol*) was collected and the stressful task was started (anticipatory stress, a situation of speech delivery and arithmetic task). Right after the end of arithmetic task, the second cortisol sample (*post-exposure cortisol*) was collected and the degree of immersion into the VR environment was assessed by administering the IPQ. Ten and 20 min later, the third (*post-exposure cortisol + 10'*) and fourth (*post-exposure cortisol + 20'*) cortisol samples, respectively, were taken. Participants were given interior design magazines to leaf through in the interval between the third and fourth drawing of salivary cortisol. A diagram of the protocol of the TSST-VR is shown in Fig. 2.

At the end of the experiment, participants are told that their speech has not been recorded and that the objective of the procedure was to elicit a stress response and not to have their performance evaluated in the speech and arithmetic tasks.

Assessment of the physiologic axes involved in the stress response

Assessment of the sympathetic reactivity Skin conductance was recorded by means of two standard-size Ag/AgCl electrodes, with isotonic electrolyte gel placed on the palm of the non-dominant hand. Subsequently, data were recorded during visualization of the virtual scenarios, and consisted of a 3-min baseline period prior to the TSST-VR (*period of psychophysiologic adaptation to the virtual environment*) and continued recording throughout the *anticipatory stress* (5 min) and *speech delivery* (5 min) periods. Recording of skin conductance ended right after the conclusion of the speech delivery task (see Fig. 2). Since one

of the aims of the study was to test the sympathetic reactivity evoked during the speech delivery task under the two experimental conditions, we chose to record measures of skin conductance because they provided a measure of sympathetic reactivity during the speech delivery task that was faster than that of the HPA axis in the presence of threatening stimuli.

Assessment of the hypothalamic-pituitary adrenal axis (HPA) Collection of salivary cortisol samples was performed using Salivette® Cortisol (Sarstedt, Numbrecht, Germany, Ref.51.1534), which consists of two small tubes, one of them containing a small piece of cotton. Participants chewed the cotton for about 60 s, after which it was introduced into the *salivette* for analysis. Samples were analyzed at the San Cecilio University Hospital, using the electrochemiluminescence immunoassay “ECLIA” method. This method is designed for use in Roche Elecsys 1010/2010 automated analyzers and in the Elecsys MODULAR ANALYTICS E170 module. Salivary cortisol samples were obtained at four collection times in the study: *pre-exposure cortisol*, *post-exposure cortisol*, *post-exposure cortisol + 10 min* and *post-exposure cortisol + 20 min*.

Statistical analyses

Initially, Student's *t*-tests were used to check for differences between groups (goggles vs. screen) in terms of sociodemographic (age and education level), and psychologic (SV, PSS, and SCL-90-R) variables. Chi-square analyses were performed to check for differences between groups in sex, use of tobacco, and contraception.

Next, we conducted a $2 \times 2 \times 2$ ANCOVA in order to test for differences in conductance between the two types of VR presentation protocols (goggles vs. screen), the sexes (males vs. females), and the time of data acquisition (anticipatory stress vs. speech delivery). Baseline levels of conductance for each participant were used as a covariate.

Additionally, we carried out a $2 \times 2 \times 3$ ANCOVA to analyze if there were significant differences in cortisol levels associated with the two types of VR protocols (goggles vs. screen), the sexes (males vs. females), and the time of cortisol sampling (post-exposure, post-exposure +10 min and post-exposure +20 min). Pre-exposure levels of cortisol for each participant were used as a covariate.

The Greenhouse-Geisser correction was applied to all analyses involving repeated measures and sphericity violations. Also, in the case of cortisol responses, Bonferroni post-hoc analyses were conducted when analyzing within-group differences across time during the experimental session.

When significant Group \times Sampling Time interactions were found, follow-up Student's *t*-tests were carried out to determine whether there were differences in either skin conductance or cortisol level between groups at each sampling time.

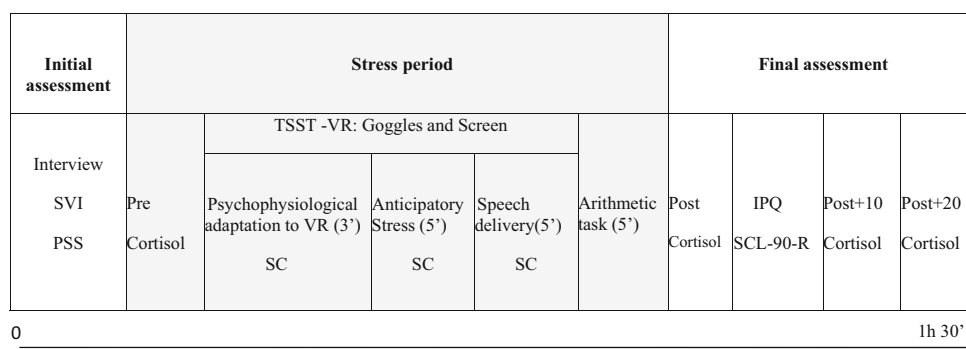


Fig. 2 Diagrammatic representation of the protocol of a virtual reality adaptation of the Trier Social Stress Test (TSST-VR). *Note:* SVI: Stress Vulnerability Inventory; PSS: Perceived Stress Scale; TSST -VR: Trier Social Stress Test adapted to Virtual Reality; Pre-cortisol: pre-exposure

cortisol; Post-cortisol: post-exposure cortisol; Post +10 cortisol: cortisol at 10 min after exposure; Post +20 cortisol: cortisol at 20 min after exposure; SC: skin conductance; IPQ: Igroup Presence Questionnaire; SCL-90-R: Symptom Checklist SCL-90-R

Finally, we conducted a 2×2 ANOVA that included the type of VR protocol (goggles vs. screen) and sex (males vs. females) to analyze the four subscales of the IPQ: global, spatial presence, involvement, and experienced realism. Significant interactions were further examined by means of Student's *t*-tests. Further, correlation analyses were used to test the relationship between the stress variables (PSS and SVI) and the IPQ.

Results

Sample description

Sociodemographic and psychologic data for the participants can be found in Table 1. Results showed significant statistical differences between type of protocol in the PSS, with the screen group scoring higher than the goggles

Table 1 Means (M) and standard deviations (SD) of sociodemographic and psychologic variables for the participants in both groups

Variables	Groups		Analyses	
	Goggles M \pm SD	Screen M \pm SD	<i>t</i> / χ^2	<i>p</i>
Age (years)	21.9 \pm 5	20.4 \pm 1.25	1.36	0.181
Education Level (years)	14 \pm 0.00	14 \pm 0.00	-1.07	0.290
Sex (% , χ^2)				
Males	45.83 %	25 %	1.4	0.230
Females	54.17 %	75 %		
Smoking (% , χ^2)				
Males	27.27 %	0 %	2.7	0.100
Females	30.77 %	6.5 %		
Contraceptives (% , χ^2)	4.33 %	1.3 %	2.6	0.140
Perceived Stress Scale	20.08 \pm 10.03	26.90 \pm 5.15	-2.81	0.007*
Stress Vulnerability Inventory	4.91 \pm 3.92	6.62 \pm 4.07	-1.43	0.161
<i>Symptom Checklist SCL-90-R</i>				
Somatization	54.20 \pm 11.39	55.52 \pm 6.83	-0.46	0.647
Obsessions and compulsions	58.96 \pm 9.32	61.71 \pm 6.02	-1.16	0.253
Interpersonal sensitivity	57.96 \pm 12.99	59.81 \pm 7.51	-0.57	0.569
Depression	48.56 \pm 14.30	54.09 \pm 6.03	-1.65	0.107
Anxiety	52.87 \pm 10.21	54.38 \pm 7.89	-0.55	0.587
Hostility	50.37 \pm 11.40	52.05 \pm 8.13	-0.56	0.579
Phobic anxiety	43.71 \pm 13.12	42.19 \pm 9.23	0.44	0.660
Paranoia	57.50 \pm 10.09	55.38 \pm 8.76	0.75	0.459
Psychoticism	52.62 \pm 14.11	53.95 \pm 8.50	-0.37	0.709

Note: χ^2 : Chi-square analysis; *t*: Student's *t*-test value; * $p \leq 0.05$

group. Thus, PSS scores were added as covariate in the following analyses.

Sympathetic reactivity: Skin conductance

Results showed a main effect of type of VR protocol [$F(1,42) = 4.440$; $p = 0.041$], with the goggles condition evoking higher sympathetic activity overall.

A significant interaction between type of VR protocol and assessment time [$F(1,42) = 3.959$; $p = 0.050$] revealed a higher activation between anticipatory stress ($M = 2.85$; $SD = 1.95$) and speech delivery ($M = 3.81$; $SD = 2.72$) in the goggles group than in the screen group (anticipatory stress: $M = 2.98$; $SD = 1.20$; speech delivery: $M = 3.34$; $SD = 1.10$) Fig. 3.

Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA): Salivary cortisol

In terms of HPA axis activation, there was no evidence of any main effect or an interaction between the level of activation of the HPA axis and the type of TSST-VR protocols, goggles or screen projection, at any of the cortisol extraction times.

Finally, results showed that there was no interaction between sex and cortisol secretion levels, regardless of whether the TSST-VR was presented by means of goggles or projected on a screen.

Immersion in the virtual environment (IPQ)

Statistical analyses demonstrated statistically significant differences in the *involvement* subscale of the IPQ as a function of the sex of the participant (independent of VR protocol used), with males ($M = -1.06$; $SD = 5.43$) endorsing lower levels of involvement than females ($M = 2.92$; $SD = 3.50$) [$F(1,42) = 7.29$; $p = 0.01$].

On the *experienced realism* subscale, there was a significant interaction between sex and type of TSST-VR protocol [$F(1,42) = 6.63$; $p = 0.014$], such that males obtained higher

scores than females only on the screen projection condition (males: $M = -1.66$; $SD = 2.16$ vs. females: $M = -4.26$; $SD = 2.05$). No significant differences were found on the *global* and *spatial presence* subscales.

Significant correlations were found between scores on the PSS and on the IPQ subscales *involvement* ($r = 0.348$; $p = 0.02$) and *spatial presence* ($r = 0.519$; $p < 0.001$). Similarly, SVI scores correlated with those obtained on the IPQ subscales *involvement* ($r = 0.298$; $p = 0.049$) and *spatial presence* ($r = 0.428$; $p = 0.004$).

Discussion

The objective of this study was twofold: firstly, we aimed to determine which of two protocols of the TSST-VR, whether a 3D virtual audience projected onto goggles or a large screen, produced greater sympathetic reactivity and activation of the HPA axis. Secondly, we sought to find out whether males and females showed distinct levels of activation of the sympathetic nervous system and HPA axis in these two TSST-VR protocols.

In terms of activation of the HPA axis, we found no statistical differences between the two TSST-VR protocols: goggles versus screen. However, sympathetic reactivity, as measured by skin conductance, did vary across presentation protocols, being higher in the goggles projection condition than in the screen condition. This effect could not be attributed to the level of immersion associated with each of the experimental conditions.

Here, it is worth emphasizing that, although an adequate level of immersion in the virtual environment seems indispensable to activate the stress response axes, some studies (e.g., Santos-Ruiz et al., 2010) have failed to find a significant relationship between the HPA axis and the level of immersion in the virtual environment. In the present study, we did not find a significant relationship of the HPA axis and sympathetic reactivity with the level of immersion in the virtual environment. In fact, although females obtained higher scores in the *involvement* subscale of the IPQ, regardless of VR protocol, there were no significant sex differences associated with HPA axis activation and sympathetic reactivity. Similar results were found with the screen protocol in male participants that, despite obtaining higher scores on the *experienced realism* subscale of the IPQ, did not show higher sympathetic activation either. It seems that the goggles elicited significantly higher conductance values overall, but this effect was not associated with any subscale of the IPQ and did not vary across sexes.

On the other hand, these results are in agreement with the recent study by Ling, Brinkman, Nefs, Qu, and Heynderickx (2013) in which real-size screen presentations of a virtual classroom were associated with a greater sense of presence when compared to real- or reduced-size TV projections.

A positive correlation was found between stress levels (as measured by the PSS and VSI) and the IPQ *involvement* and

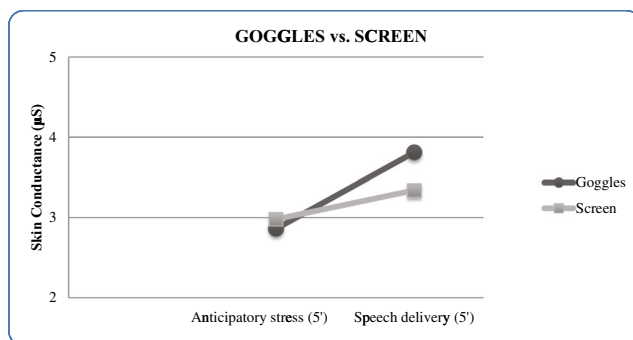


Fig. 3 Skin conductance for two protocols of (TSST-VR) delivery (Goggles vs. Screen), recorded at two points in the experiment

spatial presence subscales, independent of VR protocol used (goggles or screen) or the participant's sex. In other words, those participants reporting higher stress levels were also more likely to feel involved and spatially present during the task, regardless of the manner in which the virtual audience was presented. These results concur with those of Ling, Nefs, Morina, Heynderickx, and Brinkman (2014), who found a correlation between sense of presence and anxiety, but not for sex or type of projection of the virtual environment (e.g., field of view, degree of freedom of the tracker, etc.). Since we did not measure anxiety levels in the present study, we cannot say whether a greater spatial presence leads to a higher level of anxiety, but we did find that those participants with higher levels of stress prior to the TSST-VR protocol showed a higher level of involvement and a greater sense of spatial presence, as measured by the IPQ.

The results showed sex differences in that females manifested a greater degree of *involvement* than males, regardless of the VR protocol used. In contrast, females exposed to the 3D audience of the TSST-VR by means of the screen projection manifested less *experienced realism* than males. Such sex differences need to be considered in designing research that uses VR methodologies, given that differences between males and females could be erroneously attributed to distinct HPA axis responses when, in fact, they are due to differences in the degree of VR immersion of each gender. In fact, the two aims of this study stemmed from results such as those reported by Kotlyar et al. (2008), showing that the TSST-VR produces sympathetic activation and engages the HPA axis. Similarly, Kelly et al. (2007) concluded that the TSST-VR activates the stress response and constitutes a useful tool in that it solves some of the limitations associated with the traditional TSST.

In recent years, there have been reports of various investigations demonstrating the utility of the TSST-VR. Nevertheless, despite common agreement on the suitability of the VR version of this task in engaging the axes mediating the stress response, certain controversial issues still remain. One of these issues pertains to the presentation of the virtual environments that are common to most. Some investigators have projected 3D environments onto large screens (Santos-Ruiz et al., 2010), while others have used goggles (Jönsson et al., 2009; Kelly et al., 2007). Despite these differences, no study has contrasted the various versions of the TSST-VR to detect which form of presentation results in a greater response to the stress generated by the task. Additionally, although it is well known that the traditional TSST evokes more activation in males than in females (Foley & Kirschbaum, 2010; Hemmeter et al., 2005; Williams et al., 2004), sex differences in response to the TSST-VR have not been systematically studied. The results obtained in this study provide some answers to these questions.

It should be noted, however, that use of the VR goggles could have caused *cybersickness*, according to theories like the Sensory Conflict Theory, the Poison Theory, and the

Postural Instability Theory (La Viola Jr., 2000). Still, no member of the goggle presentation group reported symptoms of cybersickness, nor were there any indications of cybersickness in the skin conductance records.

The present study has limitations that need to be taken into account when considering the study and its findings. Firstly, given that one of our objectives was to characterize sex differences in the two versions of the TSST-VR used here, it would have been desirable to have an equal number of males and females. Likewise, it would have been preferable to count on matched levels of perceived stress across groups at the baseline level, since the initial differences could be selectively influencing stress responses at both the sympathetic and HPA axis levels.

In summary, our results appear to support the use of the TSST-VR, whether it is delivered via goggles or via a large screen projection, as a useful paradigm to investigate the modulation of the principal axes that intervene in the stress response. More concretely, if the aim of the study is to specifically investigate one of the two axes, it seems that it would be preferable to use a goggles protocol to activate the sympathetic nervous system and projection of the 3D image onto a screen to activate the HPA axis, particularly if participants are mainly females. In investigating the stress response in both axes and mostly with males, our results seem to favor the use of the goggles protocol. Finally, if the study were to include both stress response axes and both sexes, our findings would indicate that the use of a 3D image projected onto a large screen would be the recommended TSST-VR protocol.

Acknowledgments This study is a part of a Thesis Doctoral and was supported by the I+D Project "PSI2010-15780" of the Spanish Ministry of Science and Innovation. The Ministry was not involved in study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, nor in the decision to submit the paper for publication.

References

- Al'Absi, M., Bongard, S., Buchanan, T., Pincomb, G. A., Licinio, J., & Lovallo, W. R. (1997). Cardiovascular and neuroendocrine adjustment to public speaking and mental arithmetic stressors. *Psychophysiology*, *34*, 266–275.
- Annerstedt, M., Jönsson, P., Wallergård, M., Johansson, G., Karlson, B., Grahn, P., & Währborg, P. (2013). Inducing physiological stress recovery with sounds of nature in a virtual reality forest—results from a pilot study. *Physiology & Behavior*, *118*, 240–250. doi:10.1016/j.physbeh.2013.05.023
- Beech, H. R., Burns, L. E., & Scheefield, B. F. (1986). *Tratamiento del estrés. Un enfoque comportamental*. Madrid: Ed. Alambra.
- Brenner, K., Liu, A., Laplante, D.P., Lupien, S., Pruessner, J.C., Ciampi, A., & King, S. (2009). Cortisol response to a psychosocial stressor in schizophrenia: blunted, delayed, or normal?. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(6), 859–868. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.01.002
- Buske-Kirschbaum, A., Jobst, S., Wustmans, A., Kirschbaum, C., Rauh, W., & Hellhammer, D. (1997). Attenuated free cortisol response to

- psychosocial stress in children with atopic dermatitis. *Psychosomatic Medicine*, 59(4), 419–426.
- Chrousos, G. P. (2000). The role of stress and the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: Neuro-endocrine and target tissue-related causes. *International Journal of Obesity*, 24(Suppl. 2), S50–S55.
- Cohen, S., Kamarak, T., & Mermeistein, R. (1983). A global measure of perceived stress. *Journal of Health and Social Behavior*, 24, 385–396.
- De las Cuevas, C., González de Rivera, J. L., Henry- Benitez, M., Monterrey, A. L., Rodríguez-Pulido, F., & Gracia- Marco, R. (1991). Análisis factorial de la versión española del SCL-90-R en la población general. *Anales de Psiquiatría*, 7, 93–96.
- Derogatis, L. R. (1994). *Symptom checklist 90. Administration Scoring and Procedures Manual*. Minneapolis: National Computer Systems Inc.
- Esler, M., Eikelis, N., Schlaich, M., Lambert, G., Alvarenga, M., Kaye, D., & Lambert, E. (2008). Human sympathetic nerve biology: parallel influences of stress and epigenetics in essential hypertension and panic disorder. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148, 338–348. doi:10.1196/annals.1410.064
- Fiocco, A. J., Jooper, R., & Lupien, S. J. (2007). Education modulates cortisol reactivity to the Trier Social Stress Test in middle-aged adults. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 1158–1163.
- Foley, P., & Kirschbaum, C. (2010). Human hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to acute psychosocial stress in laboratory settings. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35, 91–96. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.01.010
- González de Rivera, J. L., & De las Cuevas, C. (1988). *Versión española del cuestionario SCL-90-R*. Tenerife: Universidad de la Laguna (policopiado).
- Hemmeter, U., Störmer, R., Mager, R., Kuntze, M., Mueller-Spahn, F., Hennig, J., & Bullinger, A. (2005). Modification of virtual reality combined with a mental task stimulates cortisol in volunteers. *Neuropsychobiology*, 51, 165–172. doi:10.1159/000085208
- Jönsson, P., Wallergård, M., Österberg, K., Hansen, Å. M., Johansson, G., & Karlson, B. (2010). Cardiovascular and cortisol reactivity and habituation to a virtual reality version of the Trier Social Stress Test: A pilot study. *Psychoneuroendocrinology*, 35, 1397–1403. doi:10.1016/j.psyneuen.2010.04.003
- Kelly, O., Matheson, K., Martinez, A., Merali, Z., & Anisma, H. (2007). Psychosocial stress evoked by a virtual audience: Relation to neuroendocrine activity. *Cyberpsychology & Behavior*, 5, 655–662.
- Kirschbaum, C., Bartussek, D., & Strasburger, C. J. (1992). Cortisol responses to psychological stress and correlations with personality traits. *Personality and Individual Differences*, 13, 1353–1357.
- Kirschbaum, C., Pirke, K. M., & Hellhammer, D. H. (1993). The “Trier Social Stress Test” - A tool for investigating psychological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology*, 28, 76–81.
- Kotlyar, M., Donahue, C., Thuras, P., Kushner, M. G., O’Gorman, N., Smith, E. A., & Adson, D. E. (2008). Physiological response to a speech stressor presented in a virtual reality environment. *Psychophysiology*, 45, 1034–1037. doi:10.1111/j.1469-8986.2008.00690
- Kudielka, B. M., Hellhammer, J., Hellhammer, D. H., Wolf, O. T., Pirke, K. M., Varadi, E., & Kirschbaum, C. (1998). Sex differences in endocrine and psychological responses to psychosocial stress in healthy elderly subjects and the impact of a 2-week dehydroepiandrosterone treatment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83, 1756–1761.
- Kudielka, B. M., & Kirschbaum, C. (2005). Sex differences in HPA axis responses to stress: A review. *Biological Psychology*, 69, 113–132.
- La Viola, J. J., Jr. (2000). A discussion of cybersickness in virtual environments. *SIGCHI Bulletin*, 32(1), 47–56.
- Ling, Y., Brinkman, W. P., Nefs, H. T., Qu, C., & Heyndericky, I. (2013). The effect of perspective on presence and space perception. *PLoS ONE*, 8(11), e78513. doi:10.1371/journal.pone.0078513
- Ling, Y., Brinkman, W. P., Nefs, H. T., Qu, C., & Heyndericky, I. (2012). Effects of stereoscopic viewing on presence, anxiety, and cybersickness in a virtual reality environment for public speaking. *Presence*, 21(3), 254–267. doi:10.1162/PRES_a_00111
- Ling, Y., Nefs, H. T., Morina, N., Heynderickx, I., & Brinkman, W. P. (2014). A meta-analysis on the relationship between self-reported presence and anxiety in virtual reality exposure therapy for anxiety disorders. *PLoS ONE*, 9(5), e96144. doi:10.1371/journal.pone.0096144
- Malbos, E., Boyer, L., & Lançon, C. (2013). Virtual reality in the treatment of mental disorders. *Presse Médicale*, 42(11), 1442–1452. doi:10.1016/j.lpm.2013.01.065
- Morina, N., Brinkman, W., Hartanto, D., & Emmelkamp, P. M. G. (2014). Sense of presence and anxiety during virtual social interactions between a human and virtual humans. *PeerJ*, 2, e337.
- Nicolson, N., Storms, C., Ponds, R., & Sulon, J. (1997). Salivary cortisol levels and stress reactivity in human aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 52(2), M68–M75.
- Parker, K. J., Schatzberg, A. F., & Lyons, D. M. (2003). Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Hormones and Behavior*, 43, 60–66.
- Pawlak, C. R., Jacobs, R., Mikeska, E., Ochsmann, S., Lombardi, M. S., Kavelaars, A., & Schedlowski, M. (1999). Patients with systemic lupus erythematosus differ from healthy controls in their immunological response to acute psychological stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 13(4), 287–302.
- Pertaub, D. P., Slater, M., & Barker, C. (2002). An experiment on public speaking anxiety in response to three different types of virtual audience. *Presence: Teleoperators and Virtual Environments*, 11(1), 68–78. doi:10.1162/105474602317343668
- Pruessner, J. C., Gaab, J., Hellhammer, D. H., Lintz, D., Schommer, N., & Kirschbaum, C. (1997). Increasing correlations between personality traits and cortisol stress responses obtained by data aggregation. *Psychoneuroendocrinology*, 22(8), 615–625.
- Remor, E. (2006). Psychometric properties of a European Spanish version of the Perceived Stress Scale (PSS). *The Spanish Journal of Psychology*, 29, 86–93.
- Remor, E., & Carrobes, A. (2001). Versión española de la escala de estrés percibido (PPS-14): Estudio psicométrico en una muestra VIH+. *Ansiedad y Estrés*, 7(2), 195–201.
- Robles-Ortega, H., Peralta-Ramírez, M. I., & Navarrete-Navarrete, N. (2006). *Validación de la versión española del Inventario de Vulnerabilidad al Estrés de Beech, Burns y Scheffield*. *Avances en Psicología de la Salud*. Granada: Ediciones Sider.
- Santos-Ruiz, A., Peralta-Ramírez, M. I., García-Ríos, M. C., Muñoz, M. A., Navarrete-Navarrete, N., & Blázquez-Ortiz, A. (2010). Adaptation of the trier social stress test to virtual reality: Psychophysiological and neuroendocrine modulation. *Journal of Cybertherapy & Rehabilitation*, 3, 405–415.
- Sjörs, A., Larsson, B., Karlson, B., Osterberg, K., Dahlman, J., & Gerdle, B. (2010). Salivary cortisol response to acute stress and its relation to psychological factors in women with chronic trapezius myalgia—a pilot study. *Psychoneuroendocrinology*, 35(5), 674–685. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.10.007
- Schubert, T., Friedmann, F., & Regenbrecht, H. (2001). The experience of presence: Factor analytic insights. *Presence: Teleoperators and Virtual Environments*, 10, 266–281.

- Shirotsuki, K., Izawa, S., Sugaya, N., Yamada, K.C., Ogawa, N., Ouchi, Y., & Nomura, S. (2009). Salivary cortisol and DHEA reactivity to psychosocial stress in socially anxious males. *The International Journal of Psychophysiology*, *72*, 198–203.
- Vinkers, C.H., Penning, R., Hellhammer, J., Verster, J.C., Klaessens, J.H., Olivier, B.M., & Kalkman, C.J. (2013). The effect of stress on core and peripheral body temperature in humans. *Stress*, *5*, 520–530. doi:[10.3109/10253890.2013.807243](https://doi.org/10.3109/10253890.2013.807243)
- Williams, R. A., Hagerly, B. M., & Brooks, G. (2004). Trier Social Stress Test. A method for use in nursing research. *Nursing Research*, *53*, 277–280.

ANEXO II

PAPER

The effects of corticosteroids on cognitive flexibility and decision-making in women with lupus

E Montero-López¹, A Santos-Ruiz², N Navarrete-Navarrete³, N Ortego-Centeno⁴, M Pérez-García^{1,5} and MI Peralta-Ramírez^{1,5}

¹Department of Clinical Psychology, University of Granada, Granada, Spain; ²Department of Health Psychology, Faculty of Health Sciences, University of Alicante, Alicante, Spain; ³Systemic Autoimmune Disease Unit, Internal Medicine Service, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain; ⁴Systemic Autoimmune Disease Unit, Internal Medicine Service, San Cecilio Clinical Hospital, Granada, Spain; and ⁵Mind, Brain and Behavior Research Centre (CIMCYC), Granada, Spain

The aim of this study was to investigate the possible effects of corticosteroids in women with systemic lupus erythematosus (SLE) in two processes of executive function: cognitive flexibility and decision-making. To that end, we evaluated 121 women divided into three groups: 50 healthy women, 38 women with SLE not receiving corticosteroid treatment and 33 women with SLE receiving corticosteroid treatment. Cognitive flexibility was measured with the Trail Making Tests A and B; decision-making was measured with the Iowa Gambling Task. Additionally, demographic (age and education level), clinical (SLE Disease Activity Index (SLEDAI), Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)/American College of Rheumatology (ACR) Damage Index (SDI) and disease duration) and psychological characteristics (stress vulnerability, perceived stress and psychopathic symptomatology) were evaluated. The results showed that both SLE groups displayed poorer decision-making than the healthy women ($p=0.006$) and also that the SLE group receiving corticosteroid treatment showed lower cognitive flexibility than the other two groups ($p=0.030$). Moreover, SLE patients showed poorer scores than healthy women on the following SCL-90-R subscales: somatisation ($p=0.005$), obsessions and compulsions ($p=0.045$), depression ($p=0.004$), hostility ($p=0.013$), phobic anxiety ($p=0.005$), psychoticism ($p=0.016$) and positive symptom total ($p=0.001$). In addition, both SLE groups were more vulnerable to stress ($p=0.000$). These findings help to understand the effects of corticosteroid treatment on cognitive flexibility and decision-making, in addition to the disease-specific effects suffered by women with SLE. *Lupus* (2016) 0, 1–9.

Key words: Corticosteroids; executive function; flexibility; decision-making; systemic lupus erythematosus (SLE)

Introduction

Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) show a diverse symptomatology that manifests on both organic and neuropsychiatric levels. The prevalence of SLE is slightly below 1:1000 in women and is tenfold lower in men.^{1–3}

The decision to treat SLE with corticosteroids depends on the symptomatology, activity and severity of the disease. However, while corticosteroid treatment is indispensable for controlling the disease

in some cases, it does produce adverse effects, some of which can lead to major organ damage.^{1,4,5}

The adverse effects of corticosteroid treatment and organ damage in SLE patients have been broadly studied and reviewed and reveal major implications.^{5–7} A few of the most characteristic side effects are adrenal damage (hypothalamic–pituitary–adrenal suppression causes thyroid dysfunction and sex hormone reduction), cardiovascular damage (hypertension or myocardial infarction), bone fractures, infections, cataracts, mood swings and sleep disorders.

The possible cognitive effects of corticosteroid use have also been studied. The majority of these studies have found no association between corticosteroid use and cognitive deficits in SLE patients.^{8–14} To the best of our knowledge, only one study has

Correspondence to: Eva Montero-López, Personality, Assessment and Psychological Treatment Department, Faculty of Psychology, University of Granada, Campus de Cartuja, s/n 18071 Granada, Spain
Email: evamonterolopez1983@gmail.com

Received 12 December 2015; accepted 8 March 2016

identified corticosteroid use as a factor associated with cognitive impairment in SLE. This study followed SLE patients for three years, and made evaluations every four months. These evaluations included standard medical history, physical examinations and cognitive testing. The results show that prednisone use was a factor associated with decreased cognitive function in SLE patients, as well as the presence of positive antiphospholipid antibodies, diabetes, increased depression and a lower education level. A few of the processes measured by Automated Neuropsychological Assessment Metrics (ANAM) were working memory, attention, non-verbal memory and visuospatial perception.¹⁵

Possible cognitive impairment in SLE patients has also been studied and associated with other variables linked to the disease itself, or to the patients' psychological condition. The majority of these studies did not find any association between cognitive dysfunction and clinical characteristics such as disease activity, disease duration and neuropsychiatric manifestations.¹⁰ An association was found, however, between psychological characteristics, such as stress, anxiety and depression, and cognitive impairment in SLE patients, namely with total attention accuracy, immediate visual memory, delayed visual memory and visual fluency, where greater stress indicated dysfunction in these processes.^{2,16–18} Moreover, research findings show that SLE patients with cognitive impairment had affected verbal and visuospatial memory and visuo-constructional abilities associated with neuropsychiatric manifestations. This cognitive impairment was not associated with disease activity, disease duration or corticosteroid use.¹⁰

Even though cognitive deficits and neuropsychiatric symptoms in SLE have been studied broadly, the possible effects of corticosteroid use on other aspects of executive function in SLE patients, such as flexibility and decision-making, have not. Various studies in other diseases do show an association, however, between corticosteroid use and impairment in executive function (inhibition, working memory, shifting and planning),¹⁹ thus showing that corticosteroid use does have negative effects on working memory and the hippocampus, which in some cases leads to cerebral atrophy, regardless of dose and treatment duration or disease activity.^{20,21} Only one study has compared SLE patients receiving corticosteroid treatment with others not receiving corticosteroid treatment and healthy women. They found that the patients receiving corticosteroid treatment have greater cerebral atrophy than healthy women. Furthermore, SLE patients

receiving corticosteroid treatment display more severe cerebral atrophy than patients without SLE who receive corticosteroid treatment, regardless of dose or treatment duration.²²

In spite of these approximations, the effects of corticosteroid treatment on executive function in SLE patients have not been studied. Therefore, the aim of our research has been to study if corticosteroid use has any effects on cognitive flexibility and decision-making in women with SLE when compared with healthy women. We hypothesise that women with SLE who receive corticosteroid treatment will display poorer decision-making and cognitive flexibility than women with SLE who do not receive corticosteroid treatment and healthy women.

Material and methods

Patients

One hundred and twenty-one women participated in this study. They were divided in three groups. Group 1 (HW) was composed of 50 healthy women who were recruited via posters and the internet; group 2 (SLE-CT) consisted of 38 women with SLE receiving corticosteroid treatment; group 3 (SLE-noCT) included 33 women with SLE not receiving corticosteroid treatment. The inclusion criteria for the women with SLE were to meet at least four ACR classification criteria for diagnosis of SLE, to be over 18 years of age, to be literate and to not present any psychological disorders or be taking any antidepressants, hypnotics or narcoleptic drugs. Additionally, participants from the SLE-noCT group had to have not received corticosteroid treatment for at least one year previous to the study. All the participants with SLE were patients from the Systemic Autoimmune Disease Unit (Internal Medicine Service) at the University Hospital 'Virgen de las Nieves' and the Clinical Hospital 'San Cecilio' in Granada, Spain. The inclusion criteria for the healthy women comprising the control group were the same as those for the SLE groups, except that, additionally, they presented no mental or physical illnesses. This information was obtained through a brief semi-structured interview conducted when the women contacted us to participate in the study.

The main socio-demographic, clinical (SLE Disease Activity Index (SLEDAI), Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)/American College of Rheumatology (ACR) Damage Index (SDI) and disease duration)

and treatment variables data were collected and recorded from the women with SLE. All the patients could at least read and write, and none of them presented any associated mental illnesses at the time of the study. All these patients and the healthy women gave their signed informed consent to take part in this study, which was approved by the ethics committee at our hospital and carried out in compliance with the Helsinki Declaration.

Data collection

All instruments used in the study were adapted versions validated in a Spanish population.

Trail Making Tests A and B (TMTA, TMTB)

This is one of five stand-alone tests from the Delis–Kaplan Executive Function System (D-KEFS).²⁴ Trail Making Tests A and B are timed tests of cognitive flexibility and visual motor integration that assess speed in processing information, attention and cognitive flexibility. The score obtained after dividing TMTB by TMTA produces the cognitive flexibility index and is the best execution indicator for the TMT.^{25–28}

Iowa Gambling Task (IGT)

This computerized task has been used to assess decision-making in a wide variety of studies.²⁹ It simulates essential components of decision-making common to everyday life, and the assessment of rewarding and punishing events under conditions of uncertainty and risk. In the task, subjects must choose among four decks of cards. The task is composed of five blocks, each comprising twenty trials. Two decks provide a high and immediate gain but great future losses (long-term loss), while the other two decks provide lower immediate gains but a smaller future loss (long-term gain). The purpose of the task is to try to earn as much money as possible and to incur minimal losses when it is impossible to win. Initially, participants do not know these deck characteristics, but the program provides feedback about the consequences of each choice made by the participants.³⁰

Stress Vulnerability Inventory (SVI)

The SVI consists of 22 items and evaluates the individual's predisposition to be affected by perceived stress.³¹ The Spanish adaptation shows a Cronbach's alpha of 0.87.³² As for convergent validity, the results show a significant positive correlation ($p < 0.01$) with the following assessment scales: STAI-R, Beck Depression Inventory,

Somatic Symptom Scale and Survey of Recent Life Experiences (SRLE).

Perceived Stress Scale (PSS)

The PSS is a self-report scale used to evaluate perceived stress levels and the degree to which people find their lives unpredictable, uncontrollable or overwhelming (aspects that contribute to stress).^{33,34} It consists of 14 items with five response alternatives. The highest score corresponds to the highest perceived stress level. The Spanish version of the PSS (14 items) has adequate reliability (internal consistency = 0.81 and test-retest = 0.73), concurrent validity and sensitivity. Here, we have considered those scores over 22 (i.e. the mean score for the Spanish population) as reflecting high levels of perceived stress.³⁴

SCL-90-R Symptoms Inventory

We used the SCL-90-R Symptoms Inventory^{35,36} to rule out potential psychopathology in the participants. This self-report questionnaire was developed to assess symptoms of psychopathology, and it includes 90 items with five response alternatives (0–4) on a Likert scale. Subjects respond according to how they have felt within the past seven days, including the day the inventory is administered. The inventory is scored and interpreted according to nine main dimensions (somatisation, obsessive–compulsive symptoms, interpersonal sensitivity, depression, anxiety, hostility, phobic anxiety, paranoid ideation and psychoticism) and three global indices of psychological distress (Global Severity Index (GSI), Positive Symptom Total (PS), and Positive Symptom Distress Index (PSDI)). In this study, we have analysed these last three global indices. This instrument is thought to have satisfactory reliability and validity.³⁶

The SLE Disease Activity Index (SLEDAI)

The SLEDAI was used to assess lupus activity.³⁷ It consists of 24 descriptors with pre-assigned severity weights. The total SLEDAI score can range from 0 (no activity) to 105 (maximum activity). The SLEDAI has been shown to be sensitive to changes in lupus activity measured by the treating physician.

Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index (SDI)

The SDI is a physician-rated index that assesses cumulative organ damage due either to the disease or to complications of therapy.³⁸ It includes 12 categories: ocular, neuropsychiatric, renal,

pulmonary, cardiovascular, peripheral vascular, gastrointestinal, muscular–skeletal, skin, premature gonad failure, diabetes and cancer. Total scores range from 0 (no damage) to 48 (maximum damage).

Procedure

All the participants were scheduled individually at the Mind, Brain and Behaviour Research Centre at the University of Granada, Spain. Upon arrival at the laboratory they gave their signed informed consent. Their socio-demographic variables were then collected before carrying out the executive function tasks: the TMT (cognitive flexibility) and the IGT (decision-making). Subsequently, the psychological and stress tests were administered (SVI, SSP and SCL-90-R). Each session lasted approximately one and a half hours.

Statistical analyses

Results are presented as mean and standard deviation. To begin, analysis of variation (ANOVA) was used to examine socio-demographic differences (age and education level) among the three groups (healthy women, SLE patients receiving corticosteroid treatment and SLE patients not receiving corticosteroid treatment). Also, Student's *t*-tests were used to compare the clinical characteristics of SLEDAI, SDI and disease duration between both SLE groups. In addition, various ANOVAs were carried out to analyse differences in psychological variables (SVI, PSS and SCL-90-R) among all three groups. The independent variables were the three groups, namely, healthy women, SLE patients receiving corticosteroid treatment and SLE patients not receiving corticosteroid treatment; the

dependent variables were the scores on the SVI, PSS, and the SCL-90 subscales.

Finally, one-way ANOVAs were administered with the TMT (for cognitive flexibility) and the IGT (for decision-making) in order to check for any statistically significant differences in executive function between the three groups. Education level and SLEDAI were used as a covariate, as the groups were not evenly weighted in these variables, which can be closely tied to executive function. Differences were considered significant when $p=0.05$. Additionally, correlation analyses were used to test the relationship between the psychological stress variables and executive function variables in each group, and correlation analyses were used to test the relationship between the SLEDAI and the cognitive performance variables. Furthermore, Cohen's coefficients were calculated to check the size effect in IGT and TMT between the groups.

Results

Participants' socio-demographic and clinical characteristics

Socio-demographic and clinical data for the participants can be found in Table 1. The results showed statistically significant differences in education level and SLEDAI.

Psychological characteristics

Table 2 shows psychological characteristics for the three groups. The results showed statistically significant differences in SVI ($p < 0.001$) among the three groups. The SLE-CT group is the most

Table 1 Demographic and clinical characteristics in healthy women, SLE-noCT and SLE-CT

Variable	HW Mean (SD) (n = 50)	SLE-noCT Mean (SD) (n = 38)	SLE-CT Mean (SD) (n = 33)	p^a	Post hoc
Age	36.30 (10.76)	38.63 (9.28)	34.33 (11.39)	0.225	–
Education, years	14.92 (3.14)	15 (3.32)	11.67 (3.55)	0.001 ^b	SLE-CT < SLE-noCT = HW
SLEDAI	–	1.03 (1.28)	2.59 (3.17)	0.013 ^a	SLE-CT > SLE-noCT
SDI	–	0.22 (0.66)	0.38 (0.73)	0.370	–
Disease duration, years	–	9.92 (8.63)	8.12 (5.92)	0.362	–
Prednisone dosage mg/day	–	–	6.35 (2.74)	–	–
Prednisone duration treatment, years (%)	–	<1 year (31.8 %) >1 year (50 %) Never: (18 %)	<1 year: (4.2 %) >1 year: (95.8 %)	–	–
Immunomodulators (%)	–	–	33 .3%	–	–

Data are expressed as mean (SD).

^a $p \leq 0.05$.

^b $p \leq 0.01$.

vulnerable to stress (11.33 ± 4.87), followed by SLE-noCT (8.74 ± 5.11) and finally by the healthy women (5.96 ± 3.77).

There were significant differences in the SCL-90 R results for the healthy women when compared with the SLE groups. Both SLE groups scored higher than the healthy women in the following sub-scales: somatisation ($p=0.005$), obsessions and compulsions ($p=0.045$), depression ($p=0.004$), hostility ($p=0.013$). In phobic anxiety ($p=0.005$), psychoticism ($p=0.016$) and positive symptom total ($p=0.001$) the SLE-CT group scored higher than SLE-noCT and healthy women.

Executive function

The results showed statistically significant results on the IGT (decision-making) between both SLE groups and healthy women ($p=0.006$). Healthy women (4.08 ± 20.38) scored higher on the decision-making task than SLE-CT (-7.13 ± 18.62) and SLE-noCT (-9.00 ± 23.35) (Figure 1). As the negative value indicates, SLE patients show poorer decision-making regardless of corticosteroid use.

Figure 2 shows the decision-making scores from each of the five trials for the three groups.

Cohen's coefficient showed high effect on the IGT between healthy women and SLE-CT ($d=0.67$) and median effect between SLE groups ($d=0.50$). Between healthy women and SLE-noCT groups, it had no effect ($d=0.19$).

Regarding cognitive flexibility, the results showed statistically significant differences on the TMT B/A (cognitive flexibility) among the three

groups ($p=0.030$). SLE-CT (2.57 ± 0.90) showed poorer scores than SLE-noCT (2.18 ± 0.65) and healthy women (2.06 ± 0.60) (Figure 3).

Cohen's coefficient showed median effect on the TMT B/A between healthy women and SLE-CT ($d=0.57$) and between healthy women and SLE-noCT ($d=0.60$). Between SLE groups it had no effect ($d=0.09$).

Finally, no significant correlations were found among psychological stress, psychopathology, SLEDAI and SDI or the executive function variables.

Discussion

The aim of this research was to investigate if corticosteroid use is associated with impairment in two

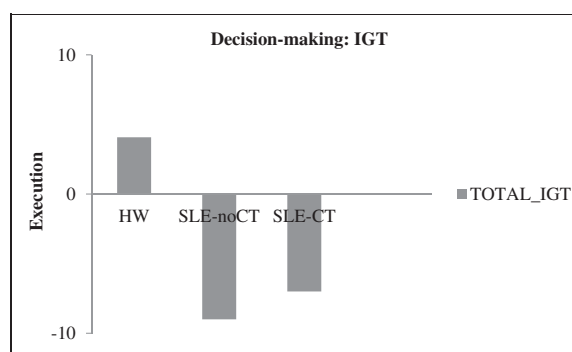


Figure 1 Making decision total in healthy women, SLE-noCT and SLE-CT.

Table 2 Psychological characteristics, in healthy women, and SLE-noCT and SLE-CT

Variable	HW (n = 50)	SLE-noCT (n = 38)	SLE-CT (n = 33)	p	Post hoc
Perceived Stress-Scale	22.68 (8.20)	26.32 (8.33)	26.56 (8.20)	0.052	
Stress Vulnerability Inventory	5.96 (3.77)	8.74 (5.11)	11.33 (4.87)	0.001 ^a	SLE-CT > SLE-noCT > HW
Symptom Checklist SCL-90-R					
Somatization	52.80 (9.31)	58.24 (8.01)	59 (10.11)	0.005 ^b	SLE-CT = SLE-noCT > HW
Obsessions and compulsions	55.40 (11.34)	59.65 (7.33)	60.62 (9.84)	0.045 ^b	SLE-CT = SLE-noCT > HW
Interpersonal sensitivity	54.12 (11.44)	53.65 (10.95)	57.92 (10.24)	0.266	
Depression	49.30(10.30)	54.97 (9.12)	56.69 (11.08)	0.004 ^b	SLE-CT = SLE-noCT > HW
Anxiety	52.24 (9.72)	55.46 (8.27)	57.38 (10.10)	0.060	
Hostility	48.72 (9.81)	54.41 (9.08)	54.62 (11.92)	0.013 ^b	SLE-CT = SLE-noCT > HW
Phobic Anxiety	43.20 (11.62)	45.43 (12.86)	53.12 (12.82)	0.005 ^b	SLE-CT > SLE-noCT = HW
Paranoia	53.72 (12.91)	52.86 (11.97)	50.92 (10.30)	0.603	
Psychoticism	48.72 (13.19)	53.73 (11.07)	56.96 (11.66)	0.016 ^b	SLE-CT > SLE-noCT = HW
Global Severity Index	42.40 (8.13)	43.57 (3.54)	45.12 (5.65)	0.214	
Positive Symptom Distress Index	55.36 (12.23)	60.70 (9.18)	59.85 (10.31)	0.055	
Positive Symptom Total	45.58 (9.20)	48.92 (7.73)	53.62 (10.07)	0.001 ^a	SLE-CT > SLE-noCT = HW

Data are expressed as mean (SD)

^a $p \leq 0.01$.

^b $p \leq 0.05$

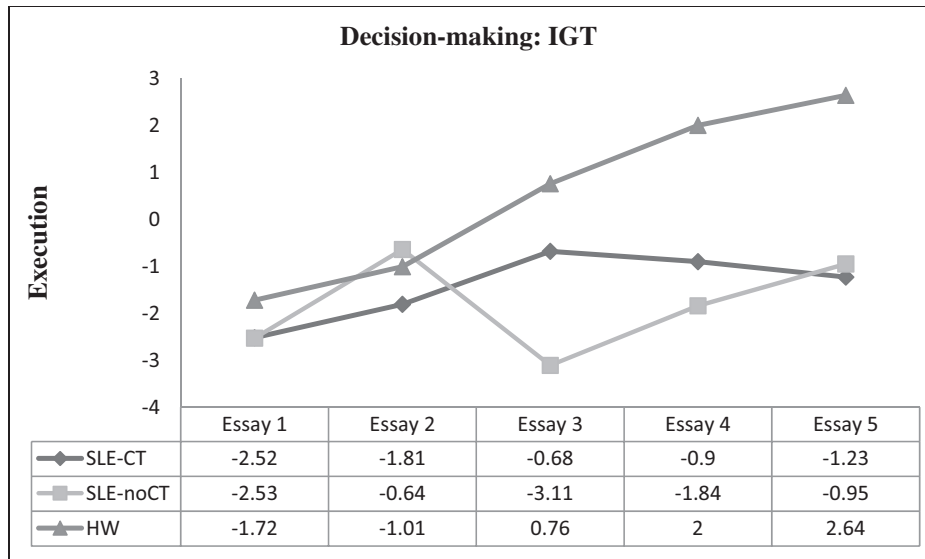


Figure 2 Decision-making in healthy women, SLE-noCT and SLE-CT.

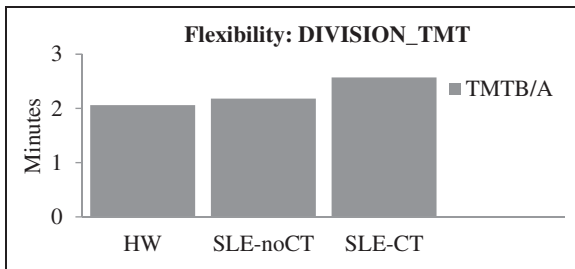


Figure 3 Cognitive flexibility in healthy women, SLE-noCT and SLE-CT.

processes of executive function, namely, cognitive flexibility and decision-making.

To this end, women with SLE receiving corticosteroid treatment, women with SLE not receiving corticosteroid treatment and healthy women were evaluated by testing cognitive flexibility and decision-making by using the Trail Making Test and the Iowa Gambling Task, respectively, while controlling for other variables such as the socio-demographic, clinical and psychological characteristics as well as disease-specific variables.

The results showed that women with SLE make poorer decisions than healthy women, regardless of corticosteroid use. This conduct, therefore, cannot be attributed to the medication. Notwithstanding, when comparing women with SLE receiving corticosteroid treatment with others who are not and with healthy women, a statistically significant difference does exist, namely that the first group scores the lowest. These results are in line with

another study in which SLE patients scored higher than the control group on the TMTA and TMTB, thus displaying worse task execution.¹¹ This also supports various studies reporting that corticosteroid use decreases both declarative and working memory. Furthermore, there are cases of atrophy in the hippocampus.^{41,42} All these effects are reversible by lowering the dose or stopping corticosteroid treatment altogether.^{39,40}

The results show lower decision-making scores for both SLE groups. Consequently, we can infer that it is the disease itself and its effects on the nervous system that may be affecting poor task execution. On the other hand, factors such as disease activity could also be affecting these results. This parameter, however, did not correlate with decision-making or cognitive flexibility in our study. Therefore, decision-making cannot be attributed to disease activity. In this regard, our data coincide with those of other studies reporting that SLEDAI is not a predictive factor of cognitive deficit in SLE.^{43,44} It is related indirectly, however, as SLEDAI is a marker of lupus activity, which in some instances requires corticosteroids, a treatment component used for decreasing disease activity. Therefore, controversy remains regarding an association between cognitive impairment and markers of disease activity,^{11,45} as some studies find an association,^{11,46} while others, such as ours, do not.^{43,44,47}

Regarding psychological conditions, there were differences in the majority of the stress and

psychopathic symptoms variables between the women with SLE and the healthy women. These results can be expected, however, because individuals suffering from a chronic disease experience pain, disability, major side effects from treatment and unpredictable aggravation of the disease, all of which can be extremely stressful and produce anxiety and depression. These results are consistent with other studies that report stress, anxiety and depression as possible factors that deteriorate symptomatology and quality of life in SLE patients.^{17,18,48,49}

When considering the present study and its findings, there are a few limitations that need to be taken into account. This is the first study to analyse the effects of corticosteroids on executive function in women with SLE. In future studies more executive function parameters should be included with a similar sample, such as behaviour production, working memory, planning and inhibition, in order to assess if there are differences in the remaining executive function processes between women with SLE who receive corticosteroid treatment and others who do not receive corticosteroid treatment. On the other hand, it included a high number of variables to evaluate psychological characteristics and executive function of the participants; therefore we conducted Cohen's delta analyses to confirm the directionality of the findings. Additionally, our groups did not share the same education levels; however, as this could be important, we did make sure to control for this factor. This variable was included as a co-variable in the TMT and IGT analyses among groups, as we are aware that some studies identify a lower education level as a factor associated with cognitive degeneration in SLE patients.¹⁰ At any rate, it is important to highlight the inherent difficulty in achieving equality in clinical populations.

In conclusion, the results from our study show that women with SLE display broader psychopathological symptoms, greater vulnerability to stress and poorer decision-making when compared with healthy women. Furthermore, as cognitive flexibility is lower in women with SLE who receive corticosteroid treatment than in healthy women and in women with SLE who do not receive corticosteroid treatment, the adverse effects of corticosteroid treatment on the cognitive flexibility of the first group should be considered. Whereas most studies have limited their research to the physical effects of corticosteroid treatment, the findings from our study are useful for studying the neuropsychological effects of corticosteroid treatment, as they provide more information regarding side

effects, such as poorer decision-making and cognitive flexibility. It is recommendable to initiate the use of prednisone only in cases of exacerbation of the disease (flares) and at the lowest possible dose. In addition, patients should be treated with anti-malarials, and in cases where prolonged treatment is predictable, start treatment with corticoids-sparing drugs. We recommend treatment aimed at avoiding corticoids, if it is at all possible.

Poor decision-making and diminished cognitive flexibility entail a series of clinical implications for patients that concern doctors, as well as patients and their families, such as inadequate adherence to treatment plans or difficulties making the necessary changes to effectively deal with the disease. These findings are important for the specialized medical professionals caring for these patients, because a better understanding of these cognitive deficits can make a substantial advance towards understanding and even solving some of the different problems encountered on a daily basis. Given our results, we recommend a neuropsychological evaluation before steroids treatment to control cognitive level effects, as is done for blood sugar, blood pressure or to control osteoporosis.

Acknowledgements

We would like to thank the healthy women and patients with lupus who participated in this study.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared the following potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article: The Spanish Ministry of Science and Innovation had no involvement in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study is a part of a doctoral thesis, and was supported by the I + D Project "PSI2010-15780" of the Spanish Ministry of Science and Innovation.

References

- Petri M, Bechtel B, Dennis G, et al. Burden of corticosteroid use in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Delphi panel. *Lupus* 2014; 23: 1006–1013.
- Santos-Ruiz, A. *Mecanismos alterados de la respuesta al estrés en pacientes con lupus eritematoso sistémico*. PhD thesis, University of Granada, Spain, 2011.
- Aringer M, Hiepe F. Systemic lupus erythematosus. *Z Rheumatol* 2011; 70: 313–323.
- Eder L, Urowitz MB, Gladman DD. Damage in lupus patients—what have we learned so far? *Lupus* 2013; 22: 1225–1231.
- Ruiz-Iratorza G, Danza A, Khamashta M. Glucocorticoid use and abuse in SLE. *Rheumatology* 2012; 51: 1145–1153.
- Sarnes E, Crofford L, Watson M, Dennis G, Kan H, Bass D. Incidence and US costs of corticosteroid-associated adverse events: a systematic literature review. *Clin Ther* 2011; 33: 1413–1432.
- Ruiz-Arruza I, Ugarte A, Cabezas-Rodríguez I, Medina JA, Moran MA, Ruiz-Iratorza G. Glucocorticoids and irreversible damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2014; 53: 1470–1476.
- Bhangle SD, Kramer N, Rosenstein ED. Corticosteroid-induced neuropsychiatric disorders: review and contrast with neuropsychiatric lupus. *Rheumatol Int* 2013; 33: 1923–1932.
- Sanna G, Bertolaccini ML, Khamashta MA. Neuropsychiatric involvement in systemic lupus erythematosus: current therapeutic approach. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 1261–1269.
- Monastero R, Bettini P, Del Zotto E, et al. Prevalence and pattern of cognitive impairment in systemic lupus erythematosus patients with and without overt neuropsychiatric manifestations. *J Neurol Sci* 2001; 184: 33–39.
- Nishimura K, Omori M, Katsumata Y, et al. Neurocognitive impairment in corticosteroid-naïve patients with active systemic lupus erythematosus: a prospective study. *J Rheumatol* 2015; 42: 441–448.
- Maneeton B, Maneeton N, Louthrenoo W. Cognitive deficit in patients with systemic lupus erythematosus. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2010; 28: 77–83.
- Gladman DD, Urowitz MB, Slonim D, et al. Evaluation of predictive factors for neurocognitive dysfunction in patients with inactive systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2000; 27: 2367–2371.
- Kozora E, Arciniegas DB, Filley CM, et al. Cognitive and neurologic status in patients with systemic lupus erythematosus without major neuropsychiatric syndromes. *Arthritis Rheum* 2008; 59: 1639–1646.
- McLaurin EY, Holliday SL, Williams P, et al. Predictors of cognitive dysfunction in patients with systemic lupus erythematosus. *Neurology* 2005; 64: 297–303.
- Peralta-Ramírez MI, Coín-Mejías MA, Jiménez-Alonso J, et al. Stress as a predictor of cognitive functioning in lupus. *Lupus* 2006; 15: 858–864.
- Peralta-Ramírez MI, Jiménez-Alonso J, Godoy-García JF, Pérez-García M. The effects of daily stress and stressful life events on the clinical symptomatology of patients with lupus erythematosus. *Psychosom Med* 2004; 66: 788–794.
- Peralta-Ramírez MI, Jiménez-Alonso J, Pérez-García M. Which stressors are responsible for the worsening in the clinical symptomatology of Lupus? *Health* 2009; 1: 313–319.
- Best JR, Miller PH, Jones LL. Executive functions after age 5: changes and correlates. *Dev Rev* 2009; 29: 180–200.
- Lupien SJ, Gillin CJ, Hauger RL. Working memory is more sensitive than declarative memory to the acute effects of corticosteroids: A dose–response study in humans. *Behav Neurosci* 1999; 113: 420–430.
- Cerqueira JJ, Pegó JM, Taipa R, Bessa JM, Almeida OF, Sousa N. Morphological correlates of corticosteroid induced changes in prefrontal cortex dependent behaviors. *J Neurosci* 2005; 25: 7792–7800.
- Zanardi VA, Magna LA, Costallat LT. Cerebral atrophy related to corticotherapy in systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Rheumatol* 2001; 20: 245–250.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
- Delis DC, Kaplan E, Kramer JH. *Delis–Kaplan executive function system: technical manual*. San Antonio, TX: Harcourt Assessment Company, 2001.
- Ricker JH, Axelrod BN. Analysis of an oral paradigm for the Trail Making Test. *Assessment* 1994; 1: 47–52.
- Lamberty GJ, Putnam SH, Chatel DM, Bieliauskas LA, Adams KM. Derived Trail Making Test indices: a preliminary report. *Neuropsychology* 1994; 7: 230–234.
- Arbuthnott K, Frank J. Trail Making Test, part B as a measure of executive control: validation using a set-switching paradigm. *J Clin Exp Neuropsychol* 2000; 22: 518–528.
- Sánchez-Cubillo I, Periáñez JA, Adrover-Roig D, et al. Construct validity of the Trail Making Test: role of task switching, working memory, inhibition/interference control, and visuomotor abilities. *J Int Neuropsychol Soc* 2009; 15: 438–450.
- Bechara A. The role of emotion in decision-making: evidence from neurological patients with orbitofrontal damage. *Brain Cogn* 2004; 55: 30–40.
- Santos-Ruiz A, García-Ríos MC, Fernández-Sánchez JC, Pérez-García M, Muñoz-García MA, Peralta-Ramírez MI. Can decision-making skills affect responses to psychological stress in the healthy women? *Psychoendocrinology* 2012; 37: 1912–1921.
- Beech HR, Burns LE, Scheefield BF. *Tratamiento del estrés. Un enfoque comportamental*. Madrid: Ed. Alambra, 1986.
- Robles-Ortega H, Peralta-Ramírez MI, Navarrete-Navarrete N. Validación de la versión española del Inventario de Vulnerabilidad al Estrés de Beech, Burns y Scheefield. In: *Avances en Psicología de la Salud*. Granada: Ediciones Sider, 2006.
- Cohen S, Kamarak T, Mermeistein R. A global measure of perceived stress. *J Health Soc Behav* 1983; 24: 385–396.
- Remor E, Carrobes A. Versión española de la escala de estrés percibido (PPS-14): Estudio psicométrico en una muestra VIH+. *Ansiedad Estrés* 2001; 7: 195–201.
- Derogatis LR. *Symptom checklist 90. Administration, scoring and procedures manual*. Minneapolis, MN: National Computer Systems, Inc., 1994.
- González de Rivera JL, De las Cuevas C. *Versión española del cuestionario SCL 90-R*. Tenerife: Universidad de la Laguna, 1988.
- Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. The development and validation of the SLE Disease Activity Index (SLEDAI). *Arthritis Rheum* 1992; 35: 630–640.
- Gladman D, Urowitz MB, Goldsmith C, Fortin P, Ginzler E, Gordon C. The reliability of the SLICC/ACR damage index in patients with SLE. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 809–813.
- Keenan PA, Jacobson MW, Soleymani RM, Mayes MD, Yalldoo DT. The effect on memory of chronic prednisone treatment in patients with systemic disease. *Neurology* 1996; 47: 1396–1402.
- Brown ES, Vera E, Frol AB, Woolston DJ, Johnson B. Effects of chronic prednisone therapy on mood and memory. *J Affect Dis* 2007; 99: 279–283.
- Brown ES. Effects of glucocorticoids on mood, memory, and the hippocampus. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1179: 41–55.
- Appenzeller S, Carnevalle AD, Li LM, Costallat LT, Cendes F. Hippocampal atrophy in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1585–1589.
- Kozora E, Thompson LL, West SG, Kotzin BL. Analysis of cognitive and psychological deficits in systemic lupus erythematosus patients without overt central nervous system disease. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 2035–2045.
- Carbotte RM, Denburg SD, Denburg JA. Cognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus is independent of active disease. *J Rheumatol* 1995; 22: 863–867.
- Kozora E, Hanly JG, Lapteva L, Filley CM. Cognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus: past, present, and future. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3286–3298.
- Conti F, Alessandri C, Perricone C, et al. Neurocognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus: association with antiphospholipid antibodies, disease activity and chronic damage. *PLoS One* 2012; 7: e33824.

- 47 Kozora E, Thompson LL, West SG, Kotzin BL. Analysis of cognitive and psychological deficits in systemic lupus erythematosus patients without overt central nervous system disease. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 2035–2045.
- 48 Coin-Mejías MA, Peralta-Ramírez MI, Callejas-Rubio JL, Pérez-García M. Personal disorders and emotional variables in patients with lupus. *Salud Mental* 2007; 30: 19–24.
- 49 Peralta-Ramírez MI, Pérez-García M. The effect of psychosocial stress on systemic lupus erythematosus: a theoretical review. In: Ulrich CM, Bellinger KA (eds), *Systemic lupus erythematosus research developments*. New York: Nova Science Publishers, 2007. pp. 179–193.