



ACTAS Dermo-Sifiliográficas

Full English text available at
www.actasdermo.org



ORIGINAL

[Artículo traducido] Esteroides y endocannabinoides plasmáticos utilizados como biomarcadores para evaluar la gravedad del prurito de los pacientes con prurigo nodular



L. Chu^{a,b,c}, L. Wang^d, Y. Wu^{a,b,c}, H. Yang^{a,b,c}, W. Wang^{a,b,c}, Q. Lu^{e,*} y H. Deng^{a,b,c}

^a School of Biological Sciences & Medical Engineering, Southeast University, Nanjing, China

^b Key Laboratory of Child Development and Learning Science (Southeast University), Ministry of Education, Nanjing, China

^c Institute of Child Development and Education, Southeast University, Nanjing, China

^d Department of Rehabilitation Medicine, the Third Medical Centre, Chinese PLA General Hospital, Pekin, China

^e Department of Prescription Science, School of Basic Medical Science, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, Hebei, China

Recibido el 24 de marzo de 2021; aceptado el 11 de octubre de 2021

Disponible en Internet el 1 de noviembre de 2021

PALABRAS CLAVE

Prurigo nodular;
Biomarcadores
plasmáticos;
Sistema endocrino;
Gravedad del prurito

Resumen

Objetivos: El prurigo nodular (PN), una dermatosis crónica prurítica e hiperplásica, induce respuestas psicológica y fisiológicamente estresantes. Las respuestas inducidas por PN en los ejes hipotálamico-pituitario-adrenal e hipotálamico-pituitario-gonadal y en el sistema endocannabinoide son anómalas. En cierta medida, los estudios sobre la patogenia de PN se centran sobre todo en sus respuestas psicológicas. Hasta la fecha no se han revelado plenamente las respuestas fisiológicas.

Objetivos: Investigar las respuestas fisiológicas inducidas por PN a través de los niveles de esteroides y 2 endocannabinoides junto con sus ratios plasmáticos y examinar la asociación entre las respuestas psicológicas y fisiológicas.

Materiales y métodos: Se seleccionó a 36 pacientes con PN y a 36 controles sanos equiparados por sexo y edad. Se midieron los síntomas psicológicos de PN incluyendo la gravedad y dolor del prurito y la calidad de vida con la escala visual analógica, el índice de puntuación del prurigo, la escala de calificación numérica, la escala de calificación verbal y el índice de calidad de vida dermatológica. Se determinaron las concentraciones de esteroides y endocannabinoides mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem.

Véase contenido relacionado en DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ad.2022.02.016>

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: noyji@163.com (Q. Lu), dengrcls@seu.edu.cn (H. Deng).

<https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.10.004>

0001-7310/© 2021 AEDV. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Resultados: En comparación con los controles, los pacientes de PN reflejaron menores niveles plasmáticos de cortisol, cortisona, *N*-araquidonoiletanolamina y ratio DHEA con respecto a 1-araquidonol glicerol (1-AG), que se correlacionaron de manera negativamente moderada y estrecha con los síntomas de PN, en especial, con la gravedad del prurito. Además, los pacientes de PN mostraron niveles mayores de los ratios de testosterona y 1-AG con respecto a cortisol, que se correlacionaron de manera positivamente moderada y estrecha con la gravedad del prurito. Por ello, los 7 biomarcadores serían sensibles y fiables a la hora de evaluar la gravedad del prurito de PN, dado que cumplen los criterios de cribado, muestran diferencias entre los grupos y reflejan una correlación moderada o estrecha con la gravedad del prurito de PN.

Conclusiones: A nuestro entender, el nuestro es el primer estudio que explora las respuestas fisiológicas inducidas por PN. Los hallazgos indican que las alteraciones en estos 3 sistemas endocrinos pueden conducir a nuevas percepciones sobre los mecanismos y respuestas psicológicas al PN.

© 2021 AEDV. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Prurigo nodularis;
Plasma biomarkers;
Endocrine systems;
Pruritus severity

Plasma Steroids and Endocannabinoids Used as Biomarkers to Assess the Pruritus Severity of Patients With Prurigo Nodularis

Abstract

Background: Prurigo nodularis (PN) as an extremely pruritic and hyperplastic chronic dermatosis induces psychologically and physiologically stress responses. PN-induced responses in the hypothalamic-pituitary-adrenal, hypothalamic-pituitary-thalamic axes and endocannabinoid system are abnormal. Extant studies on the PN pathogenesis mostly focused on the PN's psychological responses. To date, the PN's physiological responses remain not been fully uncovered yet.

Objectives: To investigate the PN-induced physiological responses via the levels of 5 steroids and 2 endocannabinoids combined with the ratios in plasma and examine the association between the psychological and physiological responses.

Materials and methods: Sixty-six patients with PN, 36 age- and gender-matched healthy controls were recruited. The PN's psychological symptoms including pruritus severity, pain and life quality were measured with the visual analogue scale, the prurigo score index, numerical rating scale, global rating scale and dermatology life quality index. Their concentrations of steroids and endocannabinoids were determined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Results: Compared to controls, the PN patients showed lower plasma levels in cortisol, cortisone, *N*-arachidonyl-ethanolamine, and the ratio of DHEA to 1-arachidonoyl glycerol (1-AG), which negatively moderately and over correlated with PN's symptoms, especially with the pruritus severity. Additionally, the PN patients exhibited higher levels in the ratios of testosterone and 1-AG to cortisol, which positively moderately and over correlated with pruritus severity. Thus, the 7 biomarkers would be sensitive and reliable biomarkers for assessing the pruritus severity of PN because they met the screening criteria that the biomarkers show intergroup differences and showed moderate or over correlation with the pruritus severity of PN.

Conclusions: To the best of our knowledge, this is the first study exploring PN-induced physiological responses. The findings suggest that alterations in these 3 endocrine systems may lead to new insights to psychological mechanisms and responses to PN.

© 2021 AEDV. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El prurigo nodular (PN), como enfermedad crónica, podría originar respuestas psicológicas y fisiológicas en el individuo^{1,2}. Los estudios existentes han investigado las respuestas psicológicas relacionadas con PN²⁻⁷, tales como las respuestas emocionales y psicósomáticas. Por ejemplo, numerosos estudios han demostrado que los pacientes de PN mostraron una mayor prevalencia de síntomas psicológicos,

es decir, ansiedad y depresión, que los controles sanos²⁻⁵ y los pacientes con psoriasis vulgar⁸⁻¹⁰. Además, los estudios anteriores relativos a los aspectos fisiológicos relacionados con PN se han centrado principalmente en las respuestas inmunes inducidas por la dermatosis, tales como el exceso de liberación de fibras y neuropéptidos nerviosos cutáneos^{11,12}. Sin embargo, no se comprenden con claridad las respuestas fisiológicas relacionadas con PN respecto a los sistemas endocrinos. Por otro lado, Schneider et al.

han señalado que debería incluirse en el manejo clínico de los pacientes de PN⁷ una evaluación psicológica además del índice fisiológico subjetivo, en lugar de los cuestionarios psicológicos autorreportados^{3,7,13-17}. La intensidad del prurito se evalúa efectivamente mediante la escala analógica visual (EVA)^{18,19} y la reciente puntuación del prurigo (PRUNOSI)²⁰. La intensidad del dolor se mide con la escala de calificación numérica (NRS) y la escala de calificación verbal (VRS)^{18,21}. Además, los estudios previos han reportado también que el prurito y rascado de los pacientes de PN degradan de forma notable su calidad de vida²², que se mide mediante el índice de calidad de vida dermatológica (DLQI)²³ del paciente. Aunque han aportado una posibilidad fácil y económica de obtener una percepción sobre las respuestas al estrés de los pacientes, las medidas psicológicas autorreportadas carecen de objetividad y derivan en una sobrevaloración de las respuestas estresantes inducidas por PN. Por tanto, es urgente investigar las respuestas fisiológicas relacionadas con PN para desarrollar biomarcadores objetivos que evalúen plenamente las respuestas estresantes en los pacientes de PN.

Aunque no existe ningún estudio empírico que investigue las respuestas fisiológicas de PN, puede obtenerse información de las situaciones dermatológicas crónicas similares, tales como la urticaria crónica. Los pacientes con esta situación reflejaron menores concentraciones basales de cortisol y sulfato de deshidroepiandrosterona, un metabolito de la deshidroepiandrosterona (DHEA)²⁴ en comparación con los sujetos sanos^{25,26}, lo cual puede atribuirse al hecho de que la actividad del eje hipotálamico-pituitario-adrenal (HPA) sufrió fatiga en situación de estrés crónico a largo plazo. Sin embargo, una concentración única y dual de esteroides no puede reflejar por completo la actividad del eje HPA y un único sistema endocrino (es decir, el HPA) no puede ilustrar de manera total las alteraciones de otros sistemas neuroendocrinos menos sensibles relacionados con las enfermedades cutáneas, ya que los factores psicosomáticos relacionados con la enfermedad cutánea podrían desencadenarla e influir en su curso^{27,28}.

De manera alternativa, el uso de concentraciones de esteroides múltiples podría evaluar la actividad de HPA y otros sistemas neuroendocrinos, tales como el eje hipotálamico-pituitario-gonadal (HPG) y el sistema endógeno cannabinoide (SEC). Los 3 sistemas son sistemas neuroendocrinos menos sensibles en seres humanos²⁹⁻³¹. Tradicionalmente, los esteroides y endocannabinoides endógenos son secretados y regulados por los 3 sistemas y se han utilizado las secreciones como biomarcadores para reflejar la actividad de cada uno³²⁻³⁵. En particular, los esteroides y endocannabinoides ejercen también efectos fisiológicos y psicológicos múltiples para soportar el estrés³⁶⁻⁴⁰. Por tanto, dichos biomarcadores son fiables a la hora de evaluar las respuestas fisiológicas estresantes relacionadas con PN causadas por los cambios psicológicos asociados a esta situación^{1,2}, y pueden ser bastante objetivos a la hora de evaluar las respuestas estresantes relacionadas con PN. Por ejemplo, se ha utilizado el contenido de cortisol y cortisona para evaluar la actividad del eje HPA^{29,41}. En paralelo, se ha recomendado el uso simultáneo de DHEA, testosterona y progesterona como esteroides sexuales importantes para evaluar la actividad del eje HPG^{42,43}. Se utilizaron las concentraciones de *N*-araquidonoiletanolamina (AEA) y 1-araquidonol glicerol (1-AG) para evaluar la actividad de SEC⁴⁴⁻⁴⁶.

Además, los 3 sistemas neuroendocrinos interactúan entre sí a través de los componentes endógenos que secretan³²⁻³⁵. Los ratios entre las concentraciones de esteroides y endocannabinoides endógenos pueden utilizarse como nuevos biomarcadores potenciales, para evaluar las interacciones dentro de un sistema endocrino y entre los 3 sistemas⁴⁷⁻⁵¹ a causa de sus importancias biológicas. El ratio cortisona-cortisol ha sido utilizado para evaluar la interacción dentro del eje HPA, es decir, la interconversión entre cortisol y cortisona mediante catálisis enzimática⁴⁷. El ratio AEA/1-AG fue utilizado para evaluar la interacción dentro del SEC⁵¹. Los ratios de testosterona y DHEA con respecto a cortisol reflejan la interacción entre los ejes HPA y HPG⁴⁸⁻⁵⁰. Los ratios de AEA y 1-AG con respecto a cortisol, los ratios de testosterona con respecto a AEA y 1-AG, el ratio DHEA/AEA y el ratio DHEA/1-AG podrían utilizarse para reflejar las interacciones de los ejes HPA y HPG con SEC.

De manera más reciente, nuestra investigación ha reflejado que el contenido de esteroides y endocannabinoides endógenos en combinación con sus ratios era más sensible y fiable a la hora de evaluar ampliamente las actividades de los ejes HPA y HPG y SEC, así como las interacciones dentro y entre los 3 sistemas neuroendocrinos en adultos tempranos.

Por tanto, el presente estudio evaluará las diferencias entre los pacientes de PN y los controles sanos con relación a los múltiples biomarcadores, incluyendo cortisol, cortisona, testosterona y progesterona plasmáticos, DHEA, AEA, 1-AG y sus ratios. El uso de biomarcadores múltiples será útil a la hora de cribar su sensibilidad y fiabilidad para distinguir entre los pacientes de PN de los controles sanos y comprender la asociación entre las respuestas relacionadas con PN y las interacciones dentro de un sistema endocrino y entre los múltiples sistemas endocrinos. Por último, exploraremos también las relaciones de las respuestas fisiológicas evaluadas mediante los biomarcadores endocrinos objetivos y las respuestas psicológicas evaluadas mediante los cuestionarios de autorreporte. Todo ello será de utilidad para cribar los biomarcadores fisiológicos con sensibilidad para evaluar con precisión la gravedad del prurito de PN.

Métodos

Participantes y diseño del estudio

Fueron seleccionados para el estudio 36 pacientes de PN y 36 controles sanos equiparados por edad y sexo del Hospital Universitario Shenzhen de Pekín. Los criterios de inclusión de los pacientes de PN fueron los siguientes: 1) edad > 18 años, 2) inicio, duración y sistemas comprometidos y número de lesiones y 3) ausencia de antecedentes de ingesta de esteroides o inmunosupresores o de cualquier otra medicación durante las 4 semanas previas a su participación en el estudio. Los criterios de exclusión fueron: 1) pacientes con cualquier enfermedad física (por ejemplo, tumor, enfermedades cerebrales orgánicas, enfermedades tiroideas y autoinmunes) y 2) pacientes con antecedentes familiares de trastornos psiquiátricos. Además, se registraron los datos demográficos (es decir, edad, sexo e IMC) de los participantes.

Tabla 1 Características basales de los grupos PN y control

Variable	PN (n = 36)	Controles (n = 36)	Valores estadísticos
Edad (año)	47,2 ± 9,3	46,8 ± 9,1	$t_{70} = 0,306$, $p > 0,05$
Sexo (varón/mujer)	19/17	19/17	/
IMC (kg/m ²)	22,1 ± 2,5	23,3 ± 1,6	$t_{70} = -0,412$, $p > 0,05$

Se solicitó a los pacientes de PN que registraran los síntomas actuales de la enfermedad, tales como prurito y dolor, mediante un cuestionario que incluía 4 categorías: la puntuación del prurigo²² (PRUNOSI, que fluctúa de 0 a 3), la escala visual analógica⁵³ (EVA, una herramienta gráfica con una línea horizontal de 100mm en la que el extremo izquierdo refleja «la ausencia de síntomas» y el derecho «el peor síntoma imaginable), la escala de calificación verbal (VRS que fluctúa de 0 a 3: 0 = ninguno, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = grave) y la escala de calificación numérica²¹ (NRS que fluctúa de 0 a 10, 0 = sin prurito, 10 = peor prurito imaginable). Además, incluimos también el índice de calidad de vida dermatológica²³ (DLQI, que fluctúa de 0 a 30).

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de Ciencias Sociales de la Universidad del Sudeste y el Comité de Ética del Hospital Universitario de Shenzhen de Pekín (N.º 20160427) y se llevó a cabo conforme a los principios de la Declaración de Helsinki. Se obtuvo de todos los participantes consentimiento informado escrito acerca de toda la información para investigación científica.

Cuantificación simultánea en plasma de 5 esteroides y 2 endocannabinoides

Se detectaron simultáneamente los 5 esteroides y 2 endocannabinoides mediante un nuevo análisis que utiliza cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Dicho método de análisis ha mostrado buen desempeño en cuanto a linealidad y límites de detección y cuantificación (LLOQ y LOQ). Las validaciones del método (precisión intradía e interdía, recuperación, tiempo de estabilidad de la matriz en diferentes situaciones) cumplen también los criterios de aceptación de las directrices de la EMA y la EMA^{54,55}.

Análisis estadístico

Se utilizaron estadísticas descriptivas para explorar las características de la muestra. La distribución normal de los datos se examinó utilizando la prueba de Shapiro-Wilks de una única muestra. Los niveles plasmáticos de hormonas y endocannabinoides endógenos fueron expresados como rango, media y desviación estándar en las tablas y como media y error estándar de la media en la figura a lo largo del texto. Se realizó un análisis de covarianza, con la edad y el sexo como las covariantes, para comparar los contenidos de esteroides y endocannabinoides endógenos y sus ratios en plasma, entre los pacientes de PN y los controles. Todos los análisis estadísticos se hicieron utilizando el programa SPSS v. 20 para Windows. Las líneas de ajuste lineal fueron trazadas utilizando el programa Origin 9.0.

Tabla 2 Coeficientes de correlación de Pearson de los pacientes de PN

	EVA	VRS	NRS	PRUNOSI
EVA	-			
VRS	0,813***	-		
NRS	0,932***	0,836***	-	
PRUNOSI	0,824***	0,754***	0,712***	-
DLQI	0,965***	0,867***	0,760***	0,867***

n = 36.

DLQI: índice de calidad de vida dermatológica; EVA: escala visual analógica; NRS: escala de calificación numérica; PRUNOSI: puntuación de prurigo; VRS: escala de calificación verbal.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

Tabla 3 Coeficiente de correlación intraclase entre las escalas EVA, VRS, NRS y PRUNOSI en los pacientes de PN

	EVA	VRS	NRS	PRUNOSI
EVA	-			
VRS	0,600***	-		
NRS	0,751***	0,813***	-	
PRUNOSI	0,745***	0,754***	0,712***	-
DLQI	0,786***	-	-	-

n = 36.

DLQI: índice de calidad de vida dermatológica; EVA: escala visual analógica; ICC: coeficiente de correlación intraclase; NRS: escala de calificación numérica; PRUNOSI: puntuación de prurigo; VRS: escala de calificación verbal.

ICC (EVA, VRS y NRS) = 0,760; ICC (EVA, VRS, NRS y PRUNOSI) = 0,786.

* $p < 0,05$,

** $p < 0,01$,

*** $p < 0,001$.

Resultados

Consistencia de las 4 escalas en la evaluación de la intensidad del prurito

Los datos demográficos de los participantes se muestran en la [tabla 1](#). Las intensidades del prurito y dolor se evalúan mediante la EVA, PRUNOSI, NRS y VRS. Como se muestra en la [tabla 2](#), todos los coeficientes de las correlaciones de Pearson (r) entre las 4 escalas fueron superiores a 0,7 ($ps < 0,001$), en especial para la muy alta correlación entre EVA y NRS ($r = 0,932$). El coeficiente de correlación intraclase entre las escalas EVA, VRS y NRS fue de 0,760 (0,600-0,847; $p < 0,001$), como se refleja en la [tabla 3](#). Estos resultados

indicaron que las 4 escalas fueron altamente consistentes para la evaluación de la gravedad del prurito.

Comparación de los niveles plasmáticos de esteroides y endocannabinoides y sus ratios entre los pacientes de prurigo nodular y los controles

Como se refleja en la [figura 1](#), los pacientes de PN mostraron contenidos plasmáticos significativamente menores que los controles en cuanto a cortisol, cortisona, progesterona y AEA ($ps < 0,05$), y contenidos bastante superiores de 1-AG ($p < 0,001$). Además, se observó menor nivel plasmático del ratio cortisona-cortisol y de los ratios de testosterona, AEA y DHEA con respecto a 1-AG ($p < 0,001$; $p < 0,01$ y $ps < 0,05$), mayor nivel de los ratios de testosterona y 1-AG con respecto a cortisol y el ratio testosterona-AEA ($p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,05$) en los pacientes de PN. La edad influyó solo en el contenido de cortisol ($F_{1,68} = 4,087$; $\eta_p^2 = 0,057$; $p = 0,047$) y cortisona ($F_{1,68} = 9,648$; $\eta_p^2 = 0,124$; $p = 0,003$), lo cual no se produjo para el resto de los biomarcadores ($ps > 0,230$). El sexo no influyó en los niveles de todos los biomarcadores potenciales ($ps > 0,066$), lo que argumenta en contra de la influencia del sexo y la edad en nuestros hallazgos.

Correlaciones de las puntuaciones PRUNOSI, EVA, NRS, VRS y DLQI con el contenido plasmático de esteroides y endocannabinoides y sus ratios entre los pacientes de prurigo nodular

Además, entre los biomarcadores potenciales que reflejan las diferencias entre los grupos, se hizo la asociación entre el contenido de dichos candidatos y las puntuaciones de 4 síntomas de PN (es decir, PRUNOSI, EVA, NRS, VRS) y DLQI para cribar los biomarcadores indicativos de prurito y dolor. Como se refleja en la [tabla 4](#), entre el contenido endógeno de los 5 biomarcadores que muestran las diferencias entre los grupos, el contenido plasmático de cortisol reflejó una correlación negativa alta con todas las puntuaciones de los 4 síntomas de PN (es decir, PRUNOSI, EVA, NRS, VRS) ($r = [-0,411]$ - $[-0,936]$; $ps < 0,001$) y DLQI ($r = -0,938$; $p < 0,001$). El contenido de cortisona reflejó una correlación moderada y altamente negativa con las puntuaciones de los 4 síntomas de PN y las puntuaciones DLQI ($r = [-0,602]$ - $[-0,987]$; $ps < 0,001$). El contenido de AEA mostró también una correlación moderada o altamente negativa con las puntuaciones de las 5 escalas ($r = [-0,521]$ - $[-0,358]$; $ps < 0,05$). El contenido de progesterona mostró una correlación moderada y marginalmente negativa con la puntuación EVA ($r = -0,315$; $p = 0,052$), pero no tuvo correlaciones significativas con las 4 escalas restantes ($r = [-0,271]$ - $[-0,214]$; $ps > 0,05$).

Entre los 7 ratios de los biomarcadores potenciales que muestran diferencias entre los grupos, el ratio de cortisona-cortisol en plasma se correlacionó moderada y positivamente con las puntuaciones de las 5 escalas ($r = 0,429$ - $0,504$; $ps < 0,05$). El ratio de testosterona-cortisol también se correlacionó moderada y positivamente con las puntuaciones de las 5 escalas ($r = 0,341$ - $0,506$; $ps < 0,05$). El ratio 1-AG/cortisol se correlacionó moderada y positivamente con las puntuaciones de PRUNOSI, EVA, NRS y

DLQI ($r = 0,471$ - $0,539$; $ps < 0,01$), aunque se correlacionó de manera moderada, marginal y significativamente positiva con la puntuación de VRS ($r = 0,318$; $p = 0,058$). Por el contrario, el ratio testosterona-AEA se correlacionó moderada y negativamente con las puntuaciones de las 5 escalas ($r = [-0,341]$ - $[-0,413]$; $ps < 0,05$). Los ratios restantes, incluyendo AEA/1-AG, testosterona/1-AG y DHEA/1-AG, no se correlacionaron con las puntuaciones de las 5 escalas ($ps > 0,05$).

Conforme a los criterios de cribado que reflejan altas correlaciones ($r > 0,5$) con las puntuaciones de todas las escalas, solo puede utilizarse el cortisol como biomarcador para evaluar con precisión los síntomas de PN, en especial la gravedad del prurito. Además, cortisona, AEA, los ratios cortisona-cortisol, testosterona-cortisol, 1-AG/cortisol y el ratio testosterona-AEA podrían utilizarse como biomarcadores potenciales para evaluar los síntomas de PN, debido a las correlaciones moderadas ($0,3 < r < 0,5$) con las puntuaciones de las escalas.

Discusión

En el presente estudio, 17 biomarcadores plasmáticos de entre 17 candidatos reflejaron niveles anómalos en los pacientes de PN. A nuestro entender, se trata del primer estudio que verifica la influencia de PN en los 3 sistemas neuroendocrinos que incluyen los ejes HPA y HPG y SEC, así como las interacciones dentro de un sistema endocrino y entre los sistemas. Los estudios anteriores se limitaron al eje HPA, que reflejaban una actividad anómala en otras enfermedades cutáneas, tales como la urticaria crónica^{25,56}. Además, encontramos una correlación de 7 biomarcadores de entre los 12 que reflejaron diferencias entre los grupos (es decir, cortisol, cortisona, AEA, ratios de cortisona, testosterona y 1-AG con respecto a cortisol y testosterona-AEA) con los síntomas de PN, en especial para la gravedad del prurito. Los 9 biomarcadores podrían ser candidatos a la evaluación precisa y objetiva de la gravedad del prurito de PN. A nuestro entender, se trata del primer intento de cribar los biomarcadores sensibles a la evaluación objetiva de la gravedad del prurito de PN.

Encontramos que el contenido plasmático de cortisol en los pacientes de PN era mucho menor que en los controles sanos ([fig. 1](#)). Los estudios previos encontraron también que existía un descenso del nivel de cortisol en la urticaria crónica^{25,56}. Estos resultados indicaron que las enfermedades cutáneas crónicas (por ejemplo, PN y urticaria crónica) podrían causar hipocortisolismo del eje HPA central. Por lo general, en la exposición al estrés agudo, se produce la activación temporal de la zona central del eje HPA, que causa la secreción pulsada de cortisol y el incremento de su nivel²⁷. Por el contrario, el estrés crónico puede originar fatiga del eje central de HPA, tras el hipocortisolismo y la reducción de cortisol⁵⁷. Por tanto, las enfermedades cutáneas crónicas con prurito y lesiones incómodas (como en el caso de PN) generarían estrés crónico y causarían hipocortisolismo del eje central de HPA. Además, el eje periférico de HPA de la piel podría implicarse en la etiopatogenia de PN. Los estudios previos en humanos han reportado que el eje periférico de HPA puede contar con mecanismos reguladores equivalentes al eje central de HPA, con secreción de la hormona

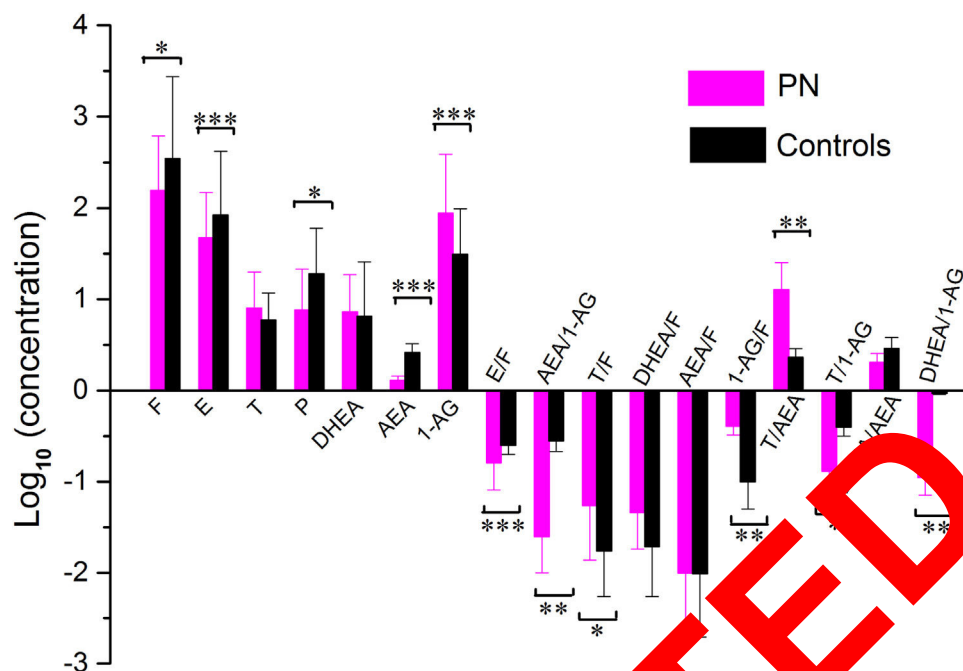


Figura 1 Comparación de los biomarcadores plasmáticos potenciales entre los pacientes de PN (n=36) y los controles sanos (n=36).

1-AG: 1-araquidonol glicerol; AEA: N-araquidonoiletanolamina; DHEA: dehidroepiandrosterona; E: cortisona; F: cortisol; P: progesterona; T: testosterona.

Los contenidos plasmáticos de los 7 biomarcadores fueron reportados en ng/ml. Los niveles de los 17 biomarcadores plasmáticos se presentaron como media ± error estándar de la media (EEM). La barra de error se expresó como EEM.

- * $p < 0,05$.
- ** $p < 0,01$.
- *** $p < 0,001$.

Tabla 4 Coeficientes de las correlaciones parciales entre los síntomas psicológicos de PN incluyendo las puntuaciones de gravedad y dolor del prurito y DLQI, y el contenido de andrógenos y endocannabinoides plasmáticos y sus ratios entre los pacientes de PN (n=36)

Bioíndice	PRUNOSI	EVA	NRS	VRS	DLQI
F	-0,874***	-0,936***	-0,857***	-0,834***	-0,938***
E	-0,74**	-0,602**	-0,457**	-0,398*	-0,569***
P	0,256	-0,315#	-0,214	-0,271	-0,216
AEA	-0,126	-0,521**	-0,364*	-0,412*	-0,438*
1-AG	-0,126	-0,166	-0,174	-0,122	-0,138
E/F	0,438**	0,429*	0,504**	0,493**	0,458**
AEA/1-AG	0,126	0,200	0,237	0,044	0,193
T/F	0,460**	0,506**	0,386*	0,341*	0,447**
1-AG/F	0,471**	0,539**	0,444**	0,318#	0,480**
T/AEA	-0,413*	-0,407*	-0,382*	-0,354*	-0,341*
T/1-AG	0,126	0,162	0,103	-0,122	0,152
DHEA/1-AG	-0,145	-0,124	-0,207	-0,285	-0,16

Muy alta correlación: $r > 0,7$; alta correlación: $0,5 < r < 0,7$; correlación moderada: $0,3 < r < 0,5$; correlación débil: $r < 0,3$.

1-AG: 1-araquidonil glicerol; AEA: N-araquidonoiletanolamina; DHEA, dehidroepiandrosterona; DLQI: índice de calidad de vida dermatológica; E: cortisona; EVA: escala analógica visual; F: cortisol; NRS: escala de calificación numérica; P: progesterona; PRUNOSI: puntuación de prurigo; T: testosterona; VRS: escala de calificación verbal.

- # $p < 0,1$.
- * $p < 0,05$.
- ** $p < 0,01$.
- *** $p < 0,001$.

liberadora de corticotrofina (CRH) por los queratinocitos de los folículos epidérmicos y pilosos, los sebocitos y los mastocitos, y expresión de los receptores CRH-R1 como respuesta al estrés^{57,58}. Sin embargo, es necesario que la investigación futura valide estos patomecanismos que implican el rol del estrés en la etiopatogenia de PN.

El presente estudio encontró también que los pacientes de PN reflejaron menor contenido plasmático de cortisona que el grupo control (fig. 1). Este resultado respalda, asimismo, que el hipocortisolismo en el eje HPA se produce en pacientes de PN. Ello es debido a que la cortisona inactiva en plasma proviene principalmente del metabolismo del cortisol activo en la catálisis de la isozima de tipo 1 de deshidrogenasa 11 β -hidroxiesteroide (11 β -HSD1)⁵⁹. Los estudios previos han demostrado que el nivel de cortisona disminuía como respuesta al estrés crónico^{60,61}. Dichos resultados implicaron que la cortisona es un biomarcador fiable para evaluar la actividad de HPA, similar a la de cortisol. Naturalmente, era probable que las anomalías del eje HPA originaran la disfunción del eje HPG y SEC, ya que los ejes HPA y HPG, al igual que SEC, regulan e interactúan entre sí mediante la secreción de sus hormonas terminales o cannabinoides respectivos^{30,62}. Como resultado, se observó un menor contenido plasmático de progesterona y AEA en los pacientes actuales de PN (fig. 1), lo que indica que el hipocortisolismo del eje HPA está estrechamente relacionado con la actividad deficiente del eje HPG y SEC entre los pacientes de PN. Por el contrario, los pacientes actuales de PN reflejaron mayor contenido de 1-AG que los controles (fig. 1).

Los estudios empíricos previos han demostrado, por lo general, que el estrés evoca cambios bidireccionales de los niveles de AEA y 1-AG, y que la exposición al estrés crónico reduce el nivel de AEA e incrementa el de 1-AG^{63,64}. Por tanto, los hallazgos sobre la reducción del nivel de AEA y el incremento del nivel de 1-AG en plasma podrían atribuirse al estrés producido por el prurito y el dolor crónico en los pacientes de PN. De forma breve, los resultados actuales revelaron que los pacientes de PN podrían reflejar anomalías en los 3 sistemas endocrinos: los ejes HPA y HPG y SEC, aunque no se produjeron diferencias entre los grupos en cuanto a testosterona y DHEA (fig. 1).

Otro aspecto interesante es que el presente estudio encontró también que los pacientes de PN reflejaron menores niveles que los controles con relación al ratio cortisona-cortisol y la testosterona y DHEA con respecto a 1-AG (fig. 1). El ratio de cortisona-cortisol se utilizó para evaluar no sólo la actividad de 11 β -HSD1⁵⁹ sino también la conexión con el eje HPA^{64,65}. Por tanto, puede inferirse del presente resultado que en los pacientes de PN podría observarse una reducción de la actividad de 11 β -HSD1, así como un deterioro de la interacción dentro del eje HPA, junto con el ya mencionado hipocortisolismo bajo estrés crónico por prurito y dolor. Los estudios previos han demostrado también que los atletas de élite con estrés debido al entrenamiento a largo plazo han reflejado un menor nivel del ratio cortisol-cortisona, como en el caso de los ciclistas⁶⁶. Estos resultados indican que el ratio cortisol-cortisona es un bioindicador útil del estrés crónico. De igual modo, dado que el ratio AEA/1-AG refleja que la interacción dentro de SEC⁵¹ y los ratios de testosterona y DHEA con respecto a 1-AG reflejan la interacción entre el eje HPG

y SEC⁶⁷, los pacientes de PN podrían tener debilitadas las interacciones dentro de SEC, y entre el eje HPG y SEC. Sin embargo, la interacción del eje HPG y SEC a través de la vía testosterona-AEA podría estar realzada en los pacientes de PN, que reflejaría un mayor nivel del ratio testosterona-AEA que en los controles (fig. 1) debido a la reducción del contenido de AEA y al contenido de testosterona, que se mantiene casi inalterado. El mecanismo diferenciado entre AEA y 1-AG podría atribuirse a los cambios claramente bidireccionales de los niveles de AEA y 1-AG con arreglo a la exposición al estrés crónico^{68,69}, según se ha mencionado ya.

Con respecto a las interacciones de los ejes HPA y HPG con SEC, los pacientes de PN reflejaron mayor nivel del ratio de testosterona y 1-AG respecto a cortisol que los controles (fig. 1), dado que se observó en el grupo PN una reducción del contenido de cortisol y AEA y un incremento del contenido de 1-AG, así como una falta de diferencia significativa en cuanto al contenido de testosterona entre los 2 grupos (fig. 1). Por lo demás, las interacciones del eje HPA con el eje HPG y SEC se vieron realzadas en los pacientes de PN, dado que fueron utilizadas para evaluar las interacciones del eje HPA con el eje HPG y SEC, respectivamente. Como anterioridad, se observó un incremento del ratio testosterona-cortisol en individuos con mayores puntuaciones de psicopatía, lo cual reflejó el incremento de la interacción entre los ejes HPA y HPG⁷⁰.

Por último, el presente estudio encontró que los contenidos plasmáticos de cortisol y cortisona reflejaron correlaciones moderada y estrechamente negativas con los síntomas de PN, en especial, para PRUNOSI y EVA (tabla 4). El estudio previo había demostrado que cortisol y cortisona se correlacionaban de forma negativa con la gravedad de la urticaria crónica⁶⁰. Por ello, cortisol y cortisona podrían reflejar de algún modo la gravedad del prurito de PN, exceptuando que se trata de biomarcadores del estrés crónico inducido por PN y del grado de activación del eje HPA. Además, el contenido de AEA reflejó correlaciones moderadas y estrechas con la gravedad del prurito de PN (tabla 4). Por tanto, los niveles plasmáticos de cortisol, cortisona y AEA muestran las diferencias entre los grupos y una correlación moderada y estrecha con los síntomas de PN, por lo que pueden ser biomarcadores sensibles y fiables para la evaluación de la gravedad del prurito. Además, en este estudio se encontró que los ratios cortisona-cortisol y testosterona-AEA, y testosterona y 1-AG con respecto a cortisol muestran diferencias entre los grupos y una correlación moderada y estrecha con la gravedad del prurito de PN (tabla 4). También reflejó que los 4 ratios pueden ser biomarcadores sensibles y fiables para evaluar la gravedad del prurito de PN. Previamente, se había probado que el ratio cortisol-cortisona era un bioindicador útil para supervisar el estado de extralimitación y el rendimiento de los nadadores de élite con entrenamiento prolongado^{66,71}.

El presente estudio tiene 3 limitaciones. En primer lugar, el pequeño tamaño de la muestra puede limitar el poder de este estudio a la hora de examinar las diferencias entre los grupos y las correlaciones entre los síntomas psicológicos de PN y los biomarcadores entre los pacientes de PN. En segundo lugar, nuestro estudio utilizó un diseño transversal, lo cual excluye las conclusiones acerca de la causalidad y direccionalidad de las connotaciones. A fin de explorar las

correlaciones entre las respuestas fisiológicas y psicológicas que se deducen de la enfermedad cutánea, sería útil utilizar en el futuro un diseño longitudinal con muestras a mayor escala para comprender mejor el estrés crónico, que juega un rol en la patogenia de PN. Por último, la actividad de HPA es muy compleja y fluctúa durante el día. Ciertamente, un simple punto plasmático de cortisol y cortisona es insuficiente para dibujar la actividad del eje en este estudio. Por ello, en el futuro se necesitarán al menos una muestra de 24 h de orina y muestras circadianas múltiples para hacerse una idea clara de la actividad de HPA.

Conclusiones

Los pacientes de PN mostraron niveles anómalos de 12 de entre 17 biomarcadores plasmáticos potenciales (es decir, cortisol, cortisona, progesterona, AEA, 1-AG, ratios de cortisona, testosterona y 1-AG con respecto a cortisol, ratios de testosterona, DHEA y AEA con respecto a 1-AG y ratio testosterona-AEA). Estos resultados indicaron que los pacientes de PN podrían reflejar anomalías en los 3 sistemas endocrinos que incluyen los ejes HPA y HPG y SEC, así como la interacción dentro de un sistema endocrino y entre los 3 sistemas. Además, los síntomas de PN, especialmente la gravedad del prurito, se correlacionaron de manera moderada y estrecha con 7 biomarcadores, reflejando diferencias entre los grupos (es decir, cortisol, cortisona, AEA, ratios de cortisona, testosterona y 1-AG con respecto a cortisol y testosterona-AEA). Los 7 biomarcadores serían sensibles y fiables a la hora de evaluar la gravedad del prurito de modo que cumplieron los criterios de cribado para reflejar las diferencias entre los grupos, y reflejaron una correlación moderada o estrecha con la gravedad del prurito de PN. Este estudio podría aportar una percepción y una idea del mecanismo fisiológico de las respuestas psicológicas en la patogenia de PN.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Nos gustaría agradecer la participación en este estudio de todos los pacientes de PN y los voluntarios sanos. Esta investigación fue respaldada por la *National Natural Science Foundation* de China (31800952) y el *College Student Innovation Funds Project* de la Universidad Hebei de Medicina China (31800952, 202014432203).

Bibliografía

1. Zeidler C, Tsianakas A, Pereira M, Stander H, Yosipovitch G, Stander S. Chronic prurigo of nodular type: A review. *Acta Derm Venereol.* 2018;98:173–9.
2. Schneider G, Hockmann J, Stumpf A. Psychosomatic aspects of prurigo nodularis. *Hautarzt.* 2014;65:704–8.
3. Jorgensen KM, Egeberg A, Gislason GH, Skov L, Thyssen JP. Anxiety, depression and suicide in patients with prurigo nodularis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31:e106–7.
4. Brenaut E, Halvorsen JA, Dalgard FJ, Lien L, Misery L. The self-assessed psychological comorbidities of prurigo in European patients: A multi-centre study in 13 countries. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2018;33:157–62.
5. Tseng HC, Tsai WC, Ho JC, Lee CH, Chen CC, Lee YT, et al. Prurigo nodularis is associated with depression and anxiety in chronic hemodialysis patients. *Acta Nephrologica.* 2015;29:94–101.
6. Brenaut E, Halvorsen JA, Dalgard FJ, Lien L, Balieva F, Sampogna F, et al. The self-assessed psychological comorbidities of prurigo in European patients: A multicentre study in 13 countries. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33:157–62.
7. Schneider G, Hockmann J, Stander S, Luger TA, Heuft G. Psychological factors in prurigo nodularis in comparison with psoriasis vulgaris: Results of a case-control study. *Br J Dermatol.* 2006;154:61–6.
8. Schneider G, Hockmann J, Stander S, Luger TA, Heuft G. Psychological factors in prurigo nodularis in comparison with psoriasis vulgaris: Results of a case-control study. *Br J Dermatol.* 2006;154:61–6.
9. Mazzetti M, Mozzetta A, Poavani A, Andreoli L, Bonda PGF, Puddu P, et al. Psoriasis, stress and psychosomatic psychodynamic characteristics of sufferers. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 1994;74:62–4.
10. Alabadie M, Renton G, Gawkrzyger DJ. The relationship between stress and the onset and exacerbation of psoriasis and other skin conditions. *Br J Dermatol.* 1994;130:199–203.
11. Mollanazar NK, Smith PK, Yosipovitch G. Mediators of chronic pruritus in atopic dermatitis: Getting the itch out? *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;51:263–92.
12. Schwendener-Schreck J, Wilson SR, Bautista DM. Interactions between mastinocytes and somatosensory neurons in itch. *Neuropharmacology.* 2015;226:177–90.
13. Dalgard U, Erma D, Piccinno R, Veraldi S, Caccialanza M. Psychological factors involved in prurigo nodularis: A pilot study. *J Dermatolog Treat.* 2011;22:211–4.
14. Schut C, Mollanazar NK, Kupfer J, Gieler U, Yosipovitch G. Psychological interventions in the treatment of chronic itch. *Acta Derm Venereol.* 2016;96:157–61.
15. Florence J, Dalgard U, Tomas-Aragones L, Lien L, Poot P, Gregor BE, et al. The psychological burden of skin diseases: A cross-sectional multicenter study among dermatological outpatients in 13 European countries. *J Invest Dermatol.* 2015;135:984–91.
16. Zigmund AS, Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand.* 1983;67:361–70.
17. Oh CC, Li H, Lee W, Tey HL. Biopsychosocial factors associated with prurigo nodularis in endogenous eczema. *Indian J Dermatol.* 2015;60:525.
18. Phan NQ, Blome C, Fritz F, Gerss J, Reich A, Ebata T, et al. Assessment of pruritus intensity: Prospective study on validity and reliability of the visual analogue scale, numerical rating scale and verbal rating scale in 471 patients with chronic pruritus. *Acta Derm Venereol.* 2012;92:502–7.
19. Listed N. Severity scoring of atopic dermatitis: The scorad index. Consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology.* 1993;186:23–31.
20. Siepman D, Lotts T, Blome C, Braeutigam M, Phan NQ, Augustin MET-AL. Evaluation of the antipruritic effects of topical pimecrolimus in non-atopic prurigo nodularis: Results of a randomized, hydrocortisone-controlled, double-blind phase II trial. *Dermatology.* 2013;227:353–60.
21. Williamson A, Hoggart B. Pain: A review of three commonly used pain rating scales. *J Clin Nurs.* 2005;14:798–804.
22. Siepman D, Lotts T, Blome C, Braeutigam M, Phan NQ, Butterfass-Bahloul T, et al. Evaluation of the antipruritic effects of topical pimecrolimus in non-atopic prurigo nodularis: Results of a randomized, hydrocortisone-controlled, double-blind phase II trial. *Dermatology.* 2013;227:353–60.

23. Finlay AY, Khan GK. Dermatology life quality index (dlqi) - a simple practical measure for routine clinical use. *Clin Experim Dermatol.* 1994;19:210–6.
24. Sonia D, Robin B. Androgen physiology. *Sem Reproduct Med.* 2006;24:71–7.
25. Varghese R, Rajappa M, Chandrashekar L, Kattimani S, Archana M, Munisamy M, et al. Association among stress, hypocortisolism, systemic inflammation, and disease severity in chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016;116:344–8.
26. Brzoza Z, Kasperska-Zajac A, Badura-Brzoza K, Matysiakiewicz J, Hese RT, Rogala B. Decline in dehydroepiandrosterone sulfate observed in chronic urticaria is associated with psychological distress. *Psychosomat Med.* 2008;70:723–8.
27. Varghese R, Rajappa M, Chandrashekar L, Kattimani S, Archana M, Munisamy M, et al. Association among stress, hypocortisolism, systemic inflammation, and disease severity in chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016;116:344–8, e1.
28. Mlynek A, Maurer M, Zalewska A. Update on chronic urticaria: Focusing on mechanisms. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8:433–7.
29. Hellhammer DH, Wust S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinol.* 2009;34:163–71.
30. Gorzalka BB, Dang SS. Minireview: Endocannabinoids and gonadal hormones: Bidirectional interactions in physiology and behavior. *Endocrinology.* 2012;153:1016–24.
31. Handa RJ, Weiser MJ. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Front Neuroendocrinol.* 2014;35:197–220.
32. Handa RJ, Weiser MJ. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Frontiers Neuroendocrinol.* 2013;35:197–220.
33. Vincenzo M, Filippo D. Endocannabinoid system, stress and hpa axis. *Eur J Pharmacol.* 2018;834:230–9.
34. Roubinov DS, Boyce WT, Lee MR, Bush NR. Evidence for discrete profiles of children's physiological activity across three neurobiological system and their transitions over time. *Dev Sci.* 2020:e12989.
35. Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: Sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress.* 2020;20:476–91.
36. Bae YJ, Reinelt J, Netto J, Uhlir J, Wiedeborg A, Ceszerek U, et al. Salivary cortisone, as a biomarker for psychosocial stress, is associated with state anxiety and heart rate. *Psychoneuroendocrinol.* 2019;101:35–41.
37. Kudielka BM, Hellhammer DH, Kleinbaum C. The impact of age, gender, and sex steroids on psychological and endocrine responses to psychosocial stress and cortisol in healthy elderly and young controls: Findings in three placebo controlled double blind studies. *Psychoneuroendocrinol.* 2000;25:S54.
38. Mezzullo M, Fanni G, Di Datini G, Fazzini A, Ibarra-Gasparini D, Mastroberto M, et al. Salivary cortisol and cortisone responses to short-term psychological stress challenge in late adolescent and young women with different hyperandrogenic states. *Psychoneuroendocrinol.* 2018;91:31–40.
39. Hill MN, Bierer LM, Makotkine I, Golier JA, Galea S, McEwen BS, et al. Reductions in circulating endocannabinoid levels in individuals with post-traumatic stress disorder following exposure to the world trade center attacks. *Psychoneuroendocrinol.* 2013;38:2952–61.
40. Coccaro EF, Hill MN, Robinson L, Lee RJ. Circulating endocannabinoids and affect regulation in human subjects. *Psychoneuroendocrinol.* 2018;92:66–71.
41. Russell E, Koren G, Rieder M, van Uum S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinol.* 2012;37:589–601.
42. Iwasa T, Matsuzaki T, Yano K, Mayila Y, Irahara M. The roles of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in stress-induced reproductive disorders. *Endocr J.* 2018;65:133–40.
43. Rivier C, Rivest S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod.* 1991;45:523–32.
44. Micalé V, Drago F. Endocannabinoid system, stress and hpa axis. *Eur J Pharmacol.* 2018;834:230–9.
45. Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM, et al. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;10720:9406–11.
46. Hill MN, Tasker JG. Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience.* 2012;204:5–16.
47. Chailurkit LO, Aekplakorn W, Paiyabthroma N, Ongphiphadhanakul B. Global 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity assessed by the circulating cortisol to cortisone ratio is associated with features of metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* 2020.
48. Stephens MA, Mahoney J, McCauley L, Wood GS. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute psychosocial stress: Effects of biological sex and circulating sex hormones. *Psychoneuroendocrinol.* 2016;67:47–54.
49. Asadikaram G, Khaleghi F, Fayadi A, Foulady S, Ghasemi MS, Alimoghaddam M, et al. Assessment of hormonal alterations in major depressive disorder: A clinical study. *Psych J.* 2019;2:423–30.
50. Markopoulou K, Papadopoulos A, Juruena MF, Poon L, Pariante CM, Cleary J. The ratio of cortisol/dhea in treatment resistant depression. *Psychoneuroendocrinol.* 2009;34:19–26.
51. Kovacs M, Harvey-White J, Liu J, Kovacs ZS, Bobest M, Lovas G, et al. Regional distribution and effects of postmortem delay on endocannabinoid content of the human brain. *Neuroscience.* 2018;378:152:1032–9.
52. Wu Y, Wu Y, Deng J, Chu L, Yang H, Wang W, et al. Screening and identification of salivary biomarkers for assessing the effects of exogenous testosterone administration on hpg and hpa axes and ecs. *Steroids.* 2020;158:108604.
53. Aitken RC. Measurement of feeling using visual analogue scales. *Proc R Soc Med.* 1969;62:989–93.
54. Kux L. Draft guidance for industry and food and drug administration staff; acceptance and filing review for premarket approval applications; availability. Federal Register. 2012.
55. Smith G. European Medicines Agency (Ema), Guideline on bioanalytical method validation, 21 July 2011. *Bioanalysis.* 2012;4:865–8.
56. Ucmak D, Akkurt M, Ucmak F, Toprak G, Acar G, Arica M. Investigation of dermatology life quality index and serum prolactin and serum dehydroepiandrosterone sulphate levels in patients with chronic urticaria. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2014;32:293–9.
57. Rui T, Hou G, Dan L, Yuan TF. A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health. *Sci World J.* 2014:1–8, 2014 2014.
58. Kim JE, Cho BK, Cho DH, Park HJ. Expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in common skin diseases: Evidence of its association with stress-related disease activity. *Acta Derm Venereol.* 2013;93:387–93.
59. Lopez Bernal A, Anderson ABM, Turnbull AC. Cortisol: Cortisone interconversion by human decidua in relation to parturition: Effect of tissue manipulation on 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Endocrinol.* 1982;93:141–9.
60. Lee JH, Bae YJ, Lee SH, Kim SC, Lee HY, Ban GY, et al. Adaptation and validation of the Korean version of the urticaria control test and its correlation with salivary cortisone. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2019;11:55–67.

61. Blair J, Adaway J, Keevil B, Ross R. Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2017;24:161–8.
62. Chu LX, Liu WH, Deng J, Wu Y, Yang HR, Wang W, et al. Age-related changes in endogenous glucocorticoids, gonadal steroids, endocannabinoids and their ratios in plasma and hair from the male c57bl/6 mice. *Gen Comp Endocrinol.* 2021:301.
63. Kim JE, Cho BK, Cho DH, Park HJ. Expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in common skin diseases: Evidence of its association with stress-related disease activity. *Acta Derm Venereol.* 2013;93:387–93.
64. Chu LX, Li N, Deng J, Wu Y, Yang HR, Wang W, et al. Lc-apci(+)-ms/ms method for the analysis of ten hormones and two endocannabinoids in plasma and hair from the mice with different gut microbiota. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;185:12.
65. Chu L, Huang Y, Xu Y, Wang L-K, Lu Q. An lc-apci+-ms/ms-based method for determining the concentration of neurosteroids in the brain of male mice with different gut microbiota. *J Neurosci Meth.* 2021;360:109268.
66. Gatti R, Cappellin E, Zecchin B, Antonelli G, Spinella P, Mantero F, et al. Urinary high performance reverse phase chromatography cortisol and cortisone analyses before and at the end of a race in elite cyclists. *J Chromatogr B.* 2005;824(1–2):51–6.
67. Kim J, Carlson ME, Watkins BA. Docosahexaenoyl ethanolamide improves glucose uptake and alters endocannabinoid system gene expression in proliferating and differentiating c2c12 myoblasts. *Front Physiol.* 2014;5:100.
68. Morena M, Patel S, Bains JS, Hill MN. Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. *Neuropsychopharmacol.* 2016;41:80–102.
69. Yasmin F, Colangeli R, Morena M, Filipski S, van der Stelt M, Pittman QJ, et al. Stress-induced modulation of endocannabinoid signaling leads to delayed strengthening of synaptic connectivity in the amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117:650–5.
70. Glenn AL, Raine A, Schug RA, Gao Y, Granger DA. Increased testosterone-to-cortisol ratio in psychopathy. *J Abnorm Psychol.* 2011;120:389–99.
71. Atlaoui D, Duclos M, Gouarne C, Lacoste M, Barale F, Chatard JC. The 24-h urinary cortisol/cortisone ratio: monitoring training in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36:218–24.

RETRACTED