

RECOMENDACIONES PARA LA MEDICIÓN DE ESTEROIDES SEXUALES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA. DOCUMENTO DE POSICIONAMIENTO SEQC^{ML}/SEEN/ SEEP

GREGORI CASALS^{1*}, ROSER FERRER COSTA², EULÀLIA URGELL RULL³, HÉCTOR F ESCOBAR-MORREALE⁴, JESÚS ARGENTE⁵, GEMMA SESMILO⁶, BETINA BIAGETTI^{7*}

¹ SERVICIO DE BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MOLECULAR, HOSPITAL CLÍNIC, IDIBAPS, CIBEREHD UNIVERSIDAD DE BARCELONA, BARCELONA, ESPAÑA.

² SERVICIO DE BIOQUÍMICA, LABORATORIS CLÍNICS, HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON, UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA, BARCELONA, ESPAÑA,

³ SERVICIO DE BIOQUÍMICA, HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU, BARCELONA, ESPAÑA

⁴ SERVICIO DE ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN, HOSPITAL RAMÓN Y CAJAL, UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, INSTITUTO RAMÓN Y CAJAL DE INVESTIGACIÓN SANITARIA IRYCIS Y CIBER DIABETES Y ENFERMEDADES METABÓLICAS ASOCIADAS CIBERDEM, MADRID, ESPAÑA

⁵ DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA Y ENDOCRINOLOGÍA PEDIÁTRICA, HOSPITAL INFANTIL UNIVERSITARIO NIÑO JESÚS, UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID, CIBEROBN, INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, MADRID, ESPAÑA

⁶ SERVICIO DE ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN, HOSPITAL UNIVERSITARI DEXEUS, BARCELONA, ESPAÑA.

⁷ SERVICIO DE ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN, HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON, UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA, BARCELONA, ESPAÑA

***CORRESPONDENCIA:** GREGORI CASALS: CASALS@CLINIC.CAT ; BETINA BIAGETTI: BETINALOYS.BIAGETTI@VALLHEBRON.CAT

RESUMEN

La correcta aproximación clínica a un amplio grupo de situaciones depende en gran medida de la disponibilidad de resultados analíticos de esteroides sexuales que sean exactos y reproducibles, obtenidos con métodos con la especificidad y sensibilidad analíticas adecuadas. En este sentido, los inmunoanálisis quimioluminiscentes actuales presentan limitaciones analíticas con repercusiones clínicas importantes. El documento de posicionamiento revisa el estado actual en la estandarización de los métodos de medida de estradiol y testosterona y su repercusión en distintas situaciones clínicas. Se incluye asimismo una serie de recomendaciones a seguir para introducir en los sistemas nacionales de salud los análisis de esteroides por espectrometría de masas, metodología recomendada desde hace más de una década por las sociedades internacionales.

ABSTRACT

Accurate measurement of sex steroids, particularly testosterone and estradiol, is relevant for the diagnosis and treatment of a wide range of conditions. Unfortunately, current chemiluminescent immunoassays have analytical limitations with important clinical consequences. This document reviews the current state of clinical assays for estradiol and testosterone measurements and their potential impact in different clinical situations. It also includes a series of recommendations and necessary steps to introduce steroid analysis by mass spectrometry into national health systems, a methodology recommended for more than a decade by international societies.

1. INTRODUCCIÓN

Los esteroides sexuales son responsables del desarrollo y la maduración del individuo, además de intervenir en muchas otras funciones^{1,2}. Su desbalance se relaciona con alteraciones en el metabolismo, el hueso, y el desarrollo o progresión de ciertos tumores, entre otros trastornos.

A pesar de la gran importancia de los esteroides sexuales, nuestra capacidad para medir sus concentraciones correctamente varía ampliamente según el método.

La especificidad, sensibilidad, exactitud, precisión y la estandarización de la medición de estas hormonas es muy relevante para el manejo de un amplio grupo de situaciones clínicas. La obtención de resultados fiables nos influye en gran medida en la toma de decisiones, evitando diagnósticos y tratamientos erróneos y seguimientos innecesarios.

En este documento, discutimos temas relacionados con las mediciones de esteroides sexuales en cuanto a las diferentes técnicas de medición y su impacto en la práctica clínica, y proporcionamos unas recomendaciones consensuadas por las Sociedades Españolas de Medicina de Laboratorio (SEQC^{ML}), Endocrinología y Nutrición (SEEN) y Endocrinología Pediátrica (SEEP).

2. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LOS MÉTODOS DE MEDIDA

Las primeras técnicas de medida para el análisis de hormonas esteroides incluían distintos métodos químicos y bioensayos. Estos métodos presentaban una sensibilidad analítica limitada (concentraciones de miligramo o microgramo) por lo que estaban restringidos mayoritariamente al análisis de esteroides conjugados en orina. El desarrollo del radioinmunoanálisis (RIA) posibilitó las primeras mediciones hormonales con suficiente sensibilidad (nanogramo o picogramo) y especificidad en suero y plasma. El primer RIA data del 1959³, fue originalmente diseñado para hormonas peptídicas (insulina) y extendido diez años más tarde a moléculas más pequeñas como los esteroides, siendo el estradiol el primero en desarrollarse por Abraham et al.⁴ El desarrollo e implantación de distintos métodos basados en RIA para el análisis de hormonas ha tenido un gran impacto en el desarrollo de la endocrinología moderna.

Los investigadores que desarrollaron los primeros inmunoanálisis para moléculas pequeñas eran conscientes de las dificultades y limitaciones de estos ensayos. De hecho, la tardanza en la aparición

del primer inmunoanálisis para un esteroide vino motivada por la necesidad de establecer y optimizar pasos preanalíticos adicionales para crear inmunoanálisis que fueran válidos para moléculas pequeñas y poco inmunogénicas como los esteroides. Estos no son otra cosa que moléculas lipídicas originadas a partir del colesterol, generadas por un número limitado de transformaciones enzimáticas y, por lo tanto, son muy similares estructuralmente. Estos pasos preanalíticos comprendían esencialmente la extracción con solventes orgánicos y la cromatografía, permitiendo separar eficazmente los diferentes esteroides presentes en fluidos biológicos como el suero, el plasma o la orina. De esta forma se consiguió ya en los años 1970 el análisis de esteroides en suero con buena sensibilidad y especificidad analíticas, aunque restringido a laboratorios especializados dado el importante procesamiento manual de las muestras. Las ventajas de los RIA con purificación previa de la muestra incluyen la eliminación de metabolitos potencialmente interferentes y la desnaturalización de las proteínas de transporte como la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) durante el proceso de extracción con solventes orgánicos, que libera los esteroides como testosterona o estradiol. También, tienen la posibilidad de adecuar el volumen de muestra a la sensibilidad esperada, y permiten medir diversos esteroides en una misma muestra tras separarlos según su peso molecular y polaridad mediante cromatografía.

Estos métodos de RIA con pasos previos de purificación de la muestra han contribuido de forma importante al conocimiento endocrinológico y, en el campo del diagnóstico clínico han sido importantes en el correcto diagnóstico y tratamiento, y continúan siendo métodos válidos actualmente dado su buen comportamiento analítico cuando están bien validados. Sin embargo, presentan algunas desventajas derivadas de la necesidad de instalaciones para radioactividad, elevada laboriosidad y bajo rendimiento práctico (normalmente se tarda 2 días en medir un único esteroide en unas 40 muestras).

A finales de 1970, gracias al desarrollo de anticuerpos más específicos, y de técnicas de doble anticuerpo, se desarrollaron métodos de RIA directo para el análisis de hormonas esteroides que, a diferencia de los primeros RIAs, permitían omitir los pasos de purificación de la muestra previos al inmunoanálisis. En las décadas 1980-90, los marcadores radioactivos de los RIA fueron reemplazados por marcadores quimioluminiscentes, fluorescentes o enzimáticos que, coincidiendo con el gran

aumento de la demanda analítica, facilitó la incorporación de kits de reactivo simplificados y automatizables, y permitieron una gran capacidad de análisis en término de cantidad muestras.

Actualmente los inmunoanálisis quimioluminiscentes directos (sin extracción previa de la muestra) son los más ampliamente utilizados para el análisis de las principales hormonas sexuales. Son métodos simples, de coste relativamente bajo y presentan buenos tiempos de respuesta que permiten altas cargas de trabajo, aunque estas ventajas son a expensas de una peor exactitud y especificidad analítica en algunos casos, que pueden tener repercusiones clínicas importantes. Aunque las limitaciones analíticas fueron identificadas rápidamente⁵, no es hasta principios de los años 2000 donde éstas adquieren mayor relevancia debido, por un lado, al mayor grado de escrutinio de los métodos existentes y, por otro lado, a la creciente accesibilidad de métodos estructurales basados en espectrometría de masas. En este sentido, tuvo un papel destacado la publicación de Taieb et al.⁶, que puso de manifiesto que de 10 diferentes inmunoanálisis de testosterona evaluados, ninguno presentaba un comportamiento analítico adecuado en el rango de valores esperables en niños y mujeres, cuestionando gravemente su utilidad clínica en muchos escenarios^{6,7}. Estos hallazgos en los análisis de testosterona fueron replicados en otros estudios⁸ y extendidos a otros analitos como el estradiol. Los estudios de Lee et al y Stanczyk et al^{9,10}, tomando también como referencia la espectrometría de masas, muestran la incapacidad de los inmunoanálisis para cuantificar de forma precisa y exacta las concentraciones de estradiol en muestras de suero de mujeres postmenopáusicas.

Ante esta dificultad para medir la concentración de esteroides, entre ellos la testosterona, con la exactitud, reproducibilidad y sensibilidad necesarias, la Endocrine Society de los EE.UU., se posicionó en 2007¹¹ recomendando el uso de métodos basados en Espectrometría de Masas como método de referencia para la medida de la concentración circulante de testosterona. Asimismo, en 2010, la Endocrine Society de los EE.UU. junto con los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) realizaron una declaración de consenso con el objetivo de estandarizar los procedimientos de medida de la testosterona¹². A partir de estos posicionamientos, los CDC iniciaron un proyecto para la estandarización de la medida de la concentración de testosterona denominado Hormone Standardization (HoST) Program¹³, con el objetivo de mejorar la reproducibilidad, el sesgo y el error total de la medida de la concentración de testosterona y su comparabilidad. Finalmente, en 2013^{14,15}

se publica el desarrollo y validación de un procedimiento de LC-MS/MS calibrado con el material SRM 971, material de referencia trazable y conmutable preparado por la NIST (National Institute of Standards and Technology) para la medida de la testosterona. Los resultados de seguimiento en los últimos años del programa de estandarización de los CDC muestran de forma consistente que, aunque se observan mejoras en algunos métodos de inmunoanálisis, las técnicas basadas en espectrometría de masas son las que presentan mejores resultados.

De forma análoga, la evidencia acumulada de las limitaciones de los inmunoanálisis para estradiol ha conducido a la creación de sinergias entre laboratorios, sociedades científicas y fabricantes con el objetivo de intentar mejorar los métodos analíticos existentes y facilitar su estandarización. El mismo programa Host del CDC cubre el análisis de estradiol en suero evaluando periódicamente el comportamiento de los distintos ensayos¹⁶. Los análisis muestran de forma consistente que las técnicas basadas en espectrometría de masas son las que presentan mejores resultados, sin observarse, sin embargo, mejoras significativas en el comportamiento analítico de los inmunoanálisis para estradiol¹⁷. El programa HoST se ha expandido, además, a las mediciones de 25-hidroxivitamina D, al sufrir los inmunoanálisis los mismos problemas que con la medición de testosterona y estradiol.

3. CONSIDERACIONES PREANALÍTICAS.

Las condiciones preanalíticas son de extraordinaria importancia, independientemente del método de medida. Por ello, se han de seguir de forma escrupulosa.

La secreción de testosterona se ajusta a un ciclo circadiano, con valores máximos a las 8 h y mínimos a las 20 h. Las variaciones pueden llegar a tener una amplitud del 36%¹⁸ por lo que la obtención de la muestra sanguínea para el análisis de esta hormona debe efectuarse por la mañana. Asimismo, la testosterona circula mayoritariamente unida a SHBG (unión de alta afinidad y baja capacidad) y albúmina (unión de baja afinidad y alta capacidad) y solo una pequeña fracción circula de forma libre llegando a los tejidos diana. Esta última fracción se transforma en las células diana en dihidrotestosterona, que tras unirse a su receptor citosólico se traslada al núcleo celular uniéndose a elementos de respuesta a andrógenos específicos en el ADN. Por ello, la fracción libre se relaciona más directamente con la acción de la dihidrotestosterona y tiene mayor relevancia para la clínica.

No obstante, la correcta medición de la concentración de testosterona libre constituye un reto para los laboratorios clínicos. En efecto, aunque existen inmunoanálisis comerciales, estos en general presentan importantes limitaciones por lo que se desaconseja su uso con fines asistenciales¹⁹⁻²¹. La metodología de referencia para la medición de testosterona libre son los métodos de ultrafiltración y diálisis de equilibrio que separan, previo al análisis mediante RIA o espectrometría de masas, la testosterona libre de la unida a proteínas. Sin embargo, estos métodos son muy laboriosos técnicamente y no están disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos. Alternativamente, la recomendación para la valoración de testosterona libre es su cálculo mediante ecuaciones que tienen en cuenta las concentraciones de testosterona total, SHBG y albúmina²².

El estradiol circula unido a SHBG en un 95%. La concentración sanguínea de estradiol no exhibe un ritmo circadiano, pero cambia durante las distintas fases del ciclo menstrual, al igual que lo hace la testosterona, por lo que la obtención de la muestra para la medición de ambas hormonas debe realizarse en la fase folicular temprana del ciclo menstrual en mujeres en edad fértil.

4. RETOS EN EL ANÁLISIS. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS INMUNOANÁLISIS

Una vez asegurada la fase preanalítica correcta, el valor clínico de los resultados de laboratorio depende en gran medida del uso de una metodología apropiada. Las mediciones en suero de esteroides sexuales con fines asistenciales y/o de investigación presentan retos analíticos importantes. Entre ellos destaca la gran diversidad existente de metabolitos estructuralmente parecidos (moléculas derivadas del colesterol) de forma endógena o también que pueden ser administrados de forma exógena, la existencia de un amplio rango de concentraciones de interés clínico y la presencia de formas circulantes libres y unidas a proteínas de transporte. Actualmente, los métodos de inmunoanálisis son los métodos de medida más ampliamente utilizados a pesar de estar limitados en muchas ocasiones por su susceptibilidad a alguno de estos factores de confusión, hasta el extremo que un consorcio de numerosas sociedades científicas estadounidenses se han posicionado a favor de su sustitución por técnicas de análisis basados en espectrometría de masas, mucho más exactas.^{11,12}

Los inmunoanálisis automatizados presentan las ventajas de ser prácticos y de permitir la medición de un elevado número de muestras de forma rápida y con bajo coste. Sin embargo presentan limitaciones como la falta de especificidad de los anticuerpos, que puede sobreestimar las concentraciones reales al medir moléculas parecidas al analito, una mayor posibilidad de que existan diferencias provocadas por la distinta matriz de las muestras de suero y de los calibradores, una mayor dificultad en la completa liberación de testosterona o estradiol de la SHBG y, en general, una sensibilidad limitada para medir de forma efectiva concentraciones bajas de esteroides.

Uno de los constituyentes endógenos a los que se ha atribuido la posibilidad de interferir en el inmunoanálisis de testosterona y sobreestimar las concentraciones es el sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA)²³. Esta posible sobreestimación es especialmente crítica en las situaciones donde se pretende valorar concentraciones relativamente bajas, como ocurre por ejemplo en mujeres, niños y hombres en seguimiento de cáncer de próstata en los que la concentración de testosterona se utiliza como criterio de castración quirúrgica o química^{23,24}. Existen también reacciones cruzadas con otros metabolitos endógenos como 11-ketotestosterona o 11-hidroxitestosterona. Son conocidas también las reacciones cruzadas de los anticuerpos de los ensayos de testosterona con esteroides sintéticos como nandrolona, danazol o noretisterona²⁵. De especial importancia, en el caso del estradiol, es la presencia de reacción cruzada en los inmunoanálisis con los propios fármacos inhibidores de la aromatasa como exemestano²⁶ (que también causa falsas elevaciones de androstendiona por similitud molecular) la monitorización de la eficacia de los cuales es, precisamente, el análisis de estradiol. También se ha descrito la existencia de reacciones cruzadas con antagonistas de los receptores de estrógenos como fulvestrant²⁷. Más recientemente, se ha descrito que el tratamiento oral con estradiol puede resultar en concentraciones falsamente disminuidas de estradiol cuando se mide por inmunoanálisis²⁸. La existencia de una interferencia concreta en el análisis de esteroides sexuales y su grado depende de los anticuerpos usados en el inmunoanálisis concreto utilizado para la medición, existiendo diferencias importantes entre fabricantes.

5. APORTACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Idealmente, las mediciones analíticas de estos compuestos deberían basarse en métodos que no fueran susceptibles a interferencias por otros analitos (nuevos tratamientos con anticuerpos monoclonales, fármacos biológicos, etc.) de estructura similar o que interfieren en el procedimiento de medida, a la vez que, con suficiente sensibilidad para cuantificar concentraciones bajas, como las esperables en determinadas situaciones fisiológicas (como acontece en las muestras pediátricas y muestras de mujeres) o patológicas.

En este sentido, la aparición de la espectrometría de masas posibilita superar las limitaciones de los inmunoanálisis en una gran mayoría de escenarios clínicos. Los fundamentos de ambas metodologías (inmunoanálisis y espectrometría de masas) son distintos. En efecto, aunque existe una gran diversidad de técnicas de laboratorio basadas en inmunoanálisis y de espectrometría de masas, estas pueden resumirse en que los inmunoanálisis se fundamentan en reacciones antígeno-anticuerpo mientras que la espectrometría de masas no emplea reacciones antígeno-anticuerpo y se relaciona directamente con las características estructurales (masa y espectros de masa) de los analitos (Figura 1).

La importancia de la necesidad de usar metodología con comportamiento analítico adecuado para las mediciones hormonales se refleja también en el creciente consenso en las revistas científicas de mayor impacto en sus requerimientos para aceptar publicaciones. La revista *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* publicó un editorial en el que exigía, a partir del año 2015, el uso de espectrometría de masas en aquellos trabajos en los que los resultados de esteroides sexuales fueran un “*endpoint*” relevante²⁹. Poco después, la misma revista publicó una *Letter of concern* valorando la complejidad del tema³⁰ y concretó unas instrucciones para los autores relacionadas con los requisitos de las determinaciones de hormonas esteroides³¹.

La figura 2 compara las ventajas y desventajas de los inmunoanálisis quimioluminiscentes de uso habitual con los métodos basados en espectrometría de masas. Si bien los inmunoanálisis presentan una buena repetitividad y rapidez, que permite manejar de forma adecuada altas cargas de trabajo, la espectrometría de masas presenta una gran especificidad analítica (ausencia reacciones cruzadas por metabolitos endógenos o exógenos, ej. fármacos²⁵⁻²⁷), menor efecto matriz y ausencia de interferencia por anticuerpos heterófilos. Otras ventajas de la espectrometría de masas incluyen su versatilidad (posibilita por ejemplo medir casi cualquier metabolito) o la facilidad para la medición

simultánea de varios metabolitos (posibilita elaborar perfiles o paneles a partir de una misma muestra). Además, dada su elevada especificidad, se minimiza la variabilidad inter-laboratorio, facilitando la elaboración de intervalos de referencia o puntos de corte de decisión médica comunes entre laboratorios. Sin embargo, la espectrometría de masas es una instrumentación relativamente costosa que requiere una considerable inversión económica, así como también requiere en general una preparación previa de la muestra y suele resultar en mayor complejidad (se necesita personal con una buena formación técnica) y mayor tiempo de respuesta. Ello probablemente limita su introducción masiva en los laboratorios clínicos. El análisis de los programas de control de calidad externo a nivel europeo permite observar su progresiva incorporación en los últimos años en algunos laboratorios de referencia clínicos a nivel europeo, la mayoría de los cuales mantenían los métodos de referencia usando RIA con extracción (Figura 3). En nuestro país la experiencia en incorporación de métodos de espectrometría de masas para mediciones hormonales distinta a los esteroides sexuales a nivel asistencial se centra especialmente en los últimos 3-4 años en los que diversos laboratorios han podido disponer de instrumentación dedicada a las hormonas.

6. SITUACIONES CLÍNICAS EN LAS QUE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS PRESENTA MAYOR INTERÉS.

Tal y como hemos reseñado los ensayos de esteroides sexuales deben ser sensibles, específicos, exactos y precisos en un amplio rango de concentraciones^{11,12,32,33}. Hay algunas situaciones de especial relevancia en la práctica clínica que merecen una mención especial.

6.1 SENSIBILIDAD: MEDICIÓN DE ESTEROIDES A BAJAS CONCENTRACIONES

Medición de estradiol a bajas concentraciones.

En el seguimiento de algunas situaciones especiales, por ejemplo, pacientes con cáncer de mama tratados con inhibidores de la aromatasa (en las que es necesario suprimir las concentraciones endógenas de estradiol), los ensayos deben poder distinguir entre concentraciones suprimidas de menos de 1 pg/mL³⁴ y concentraciones previas al tratamiento que en las mujeres menopáusicas suelen ser de 10 a 15 pg/mL. Del mismo modo, las mujeres con otras patologías como endometriosis o leiomiomas que se encuentran en esquemas de bloqueo y reemplazo (agonistas de GnRH para inducir

la castración médica, junto con una dosis baja de estrógenos), no pueden ser controladas adecuadamente al no disponer de un sistema de medida específico, sensible y eficaz de medición de concentraciones bajas de estrógenos circulantes.

Además, los hombres y mujeres ancianos tienen concentraciones muy bajas de estradiol, en el rango de 5-30 pg/ml. En algunos casos, el control de estas concentraciones bajas podría ser útil; por ejemplo, en hombres con cáncer de próstata que se someten a una terapia de privación de andrógenos, las mediciones de estrógenos podrían ser útiles para evaluar esta terapia en objetivos como los huesos, el corazón y el estado metabólico³².

En la misma línea, para evaluar el desarrollo puberal en niños, necesitamos medir con precisión los valores bajos de esteroides sexuales, particularmente en prepúberes y en pacientes con pubertad precoz, ya central, ya periférica, ya mixta, así como definir intervalos de concentraciones normales a lo largo de la infancia. En esta etapa de la vida, aunque es poco frecuente, algunos tumores gonadales secretan gonadotropina coriónica humana, lo que lleva a una producción de hormonas sexuales que a menudo está por debajo del límite de detección del método³². Además, la ginecomastia puberal en los niños, que implica un desequilibrio de testosterona y estrógenos, no se puede distinguir con los inmunoanálisis habituales³⁵.

Medición de Testosterona

La mayoría de las pacientes que padecen síndrome de ovario poliquístico y otras formas de exceso androgénico no están siendo evaluadas adecuadamente debido a la falta de sensibilidad y/o especificidad de la mayoría de los inmunoanálisis actuales. Algunos estudios han demostrado que la testosterona libre se correlaciona mejor con la presentación clínica del síndrome de ovario poliquístico que la testosterona total^{36,37}, aunque tal como se explicó anteriormente, la testosterona libre no está disponible en los laboratorios clínicos de rutina al ya que el método de referencia para su medición son los métodos de ultrafiltración o diálisis de equilibrio. Hay que destacar que las fórmulas que calculan la testosterona libre, requieren que la testosterona total haya sido medida con un método de precisión y, sólo en ese caso, ofrecen un rendimiento similar al del cálculo por ultrafiltración o diálisis de equilibrio. La Androgen Excess & PCOS Society recomienda desde 2009 el uso de la cromatografía

líquida / espectrometría de masas tándem como método de referencia para la medición de testosterona total, y el cálculo de testosterona libre usando SHBG y albúmina, como método idóneo para estimar el hiperandrogenismo bioquímico en estas pacientes.³⁸

La evaluación de testosterona en mujeres con deseo sexual reducido podría ser informativa y es una necesidad clínica no satisfecha. Hay algunas pruebas, aunque controvertidas, en la que se sugiere una mejora el deseo sexual con el reemplazo de testosterona en mujeres con hipopituitarismo³⁹ o en mujeres premenopáusicas ovariectomizadas⁴⁰, pero los actuales métodos de medición no ofrecen suficiente confianza en los resultados de las concentraciones de testosterona tras la terapia sustitutiva por lo que no se recomienda.

Otras situaciones en las que se requieren métodos de alta sensibilidad son en el seguimiento de pacientes con cáncer de próstata sometidos a castración química para suprimir las concentraciones endógenas de testosterona, en la adolescencia para la evaluación de la pubertad temprana o tardía, así como tras el nacimiento durante la evaluación de la mini-pubertad en varones.

6.2. ESPECIFICIDAD.

Los pacientes pueden tener estrógenos/andrógenos circulantes derivados de fuentes exógenas, por ejemplo, hormonas esteroides sexuales de los alimentos, suplementos nutricionales, etc.⁴¹. Algunos de estos compuestos pueden reaccionar de forma cruzada con el anticuerpo en el inmunoanálisis y dar lugar a diagnósticos erróneos lo que conlleva un aumento considerable del gasto sanitario en pruebas innecesarias además de las molestias para el paciente.

6.3. EXACTITUD.

Finalmente, los resultados deberían ser comparables entre diferentes laboratorios. Los datos reproducibles son esenciales para el análisis y control del paciente cuyas pruebas son realizadas por varios laboratorios diferentes utilizando diferentes métodos. La introducción de técnicas correctamente estandarizadas en la mayoría de los centros hospitalarios evitaría que los pacientes seguidos en centros de referencia se vean obligados a trasladarse para una simple extracción de sangre, por falta de exactitud y reproducibilidad inter-ensayo entre centros.

7. RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO.

En la medición de las concentraciones de esteroides sexuales, hay situaciones en las que la espectrometría de masas ha demostrado características metodológicas muy superiores a las del inmunoanálisis, especialmente cuando se requiere elevada sensibilidad y especificidad.

Mientras no exista la estandarización de todos los procedimientos de medida, se recomienda que los procedimientos utilizados en los laboratorios clínicos estén validados y cumplan las características metodológicas de reproducibilidad, sensibilidad y exactitud analíticas requeridas para medir las concentraciones, según las indicaciones de la guía CLSI⁴² de la población a que se da servicio, y que cada laboratorio defina sus propios intervalos de referencia⁴³⁻⁴⁵. En este sentido, el programa HoST del CDC ofrece sus servicios a laboratorios de todo el mundo con un coste perfectamente asumible. Por ello, consideramos muy recomendable recurrir a este programa desde los laboratorios del sistema nacional de salud para evaluar el rendimiento de los análisis empleados actualmente, y valorar su sustitución por otros ya estandarizados.

Aun cuando los inmunoanálisis pudieran mantener cierta utilidad para su uso en medicina general en las mediciones de testosterona total en varones y de estradiol en mujeres, las recomendaciones de la última década indican la necesidad de usar métodos basados en espectrometría de masas para la medición de esteroides sexuales adecuadamente, y de forma muy particular en:

- 1) Testosterona: las mediciones de la concentración de testosterona en el suero de pacientes pediátricos, mujeres y pacientes con neoplasias hormono-dependientes deben realizarse por métodos de elevada especificidad y sensibilidad analítica basados en espectrometría de masas. Si ello no es posible, deben considerarse aquellos inmunoanálisis que muestren un buen comportamiento analítico comparado con un método validado de espectrometría de masas como el ya valorado por el programa HoST⁴⁶
- 2) Estradiol: las mediciones de las concentraciones de estradiol en el suero de pacientes pediátricos y en mujeres con cáncer de mama en tratamiento con inhibidores de la aromatasa debe realizarse con métodos de elevada sensibilidad y especificidad basados en espectrometría de masas en la valoración inicial y durante la monitorización del tratamiento.

Entendiendo que no es viable actualmente usar las técnicas de medición basadas en espectrometría de masas en todos los centros hospitalarios nacionales, el grupo de trabajo recomienda introducir estas técnicas en al menos un centro por cada sistema de salud autonómico, para dar soporte adecuado a las situaciones clínicas descritas previamente y adquirir la experiencia necesaria para luego expandir paulatinamente estas técnicas al resto de la red hospitalaria, y adaptar de esta forma el sistema nacional de salud a las recomendaciones internacionales vigentes.

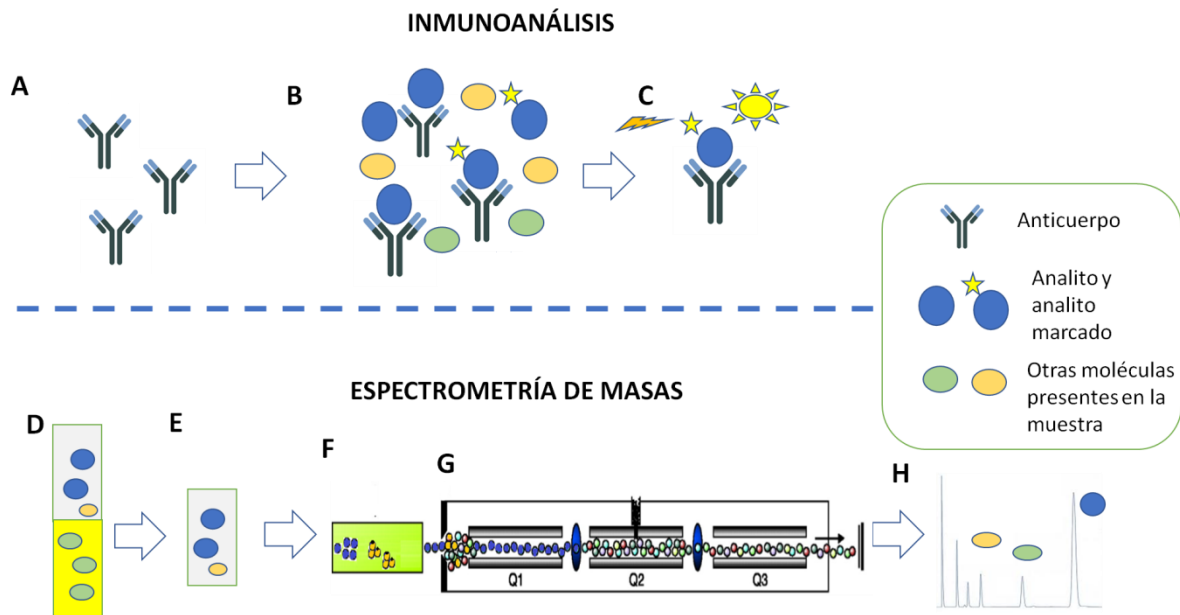


Figura 1. Inmunoanálisis (A-C). Ejemplo de inmunoanálisis competitivo quimioluminiscente. A. El método se basa en un anticuerpo específico que reconoce el analito de interés. B. Se incuba el anticuerpo con la muestra (que contiene el analito de interés y otras moléculas) y con el analito marcado. Analito y analito marcado compiten por la unión al anticuerpo. C. Se registra la señal quimioluminiscente procedente del analito marcado unido al anticuerpo. En el ejemplo, la señal registrada será inversamente proporcional a la cantidad de analito originalmente presente en la muestra. **Espectrometría de masas (D-H).** Ejemplo de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). D y E. Extracción de la muestra de suero con solvente orgánico. Este paso elimina posibles interferentes. F. Separación de los componentes de la muestra mediante cromatografía líquida. G. Selección de los iones específicos de los analitos. H. Representación de los resultados. El área del pico cromatográfico es directamente proporcional a la cantidad de analito originalmente presente en la muestra.

INMUNOANÁLISIS

VENTAJAS

- Buena repetitividad
- No preparación previa de la muestra
- Rápido
- Alta carga de trabajo (elevado número de muestras)

LIMITACIONES

- Reacciones cruzadas
- Efecto matriz
- Interferencia por anticuerpos heterófilos
- No siempre disponibles
- Un único parámetro (habitualmente)
- Diferencias entre fabricantes

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

- Elevada especificidad (ausencia de reacciones cruzadas)
- Análisis de moléculas sin inmunoanálisis comercial disponible
- Determinación simultánea de varios metabolitos (elaboración de índices o perfiles)

- Requiere preparación de muestras (habitualmente)
- Tiempos de análisis más largos
- Mayor complejidad
- Menor carga de trabajo
- Elevado coste instrumental

Figura 2. Ventajas y limitaciones de los métodos basados en inmunoanálisis y espectrometría de masas.

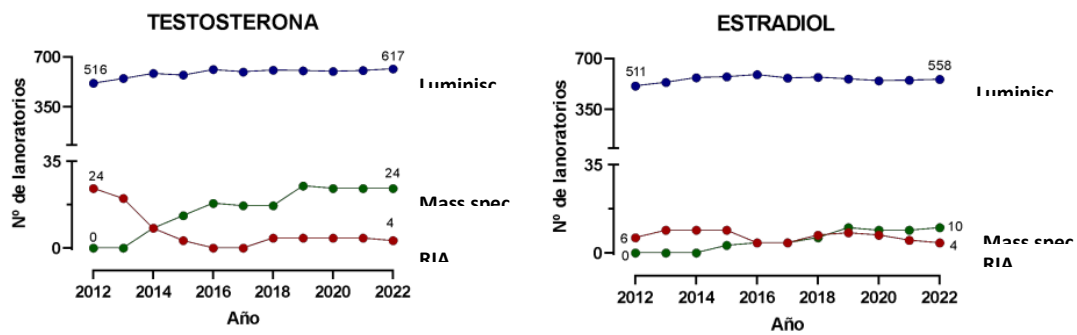


Figura 3 Número de laboratorios que proporcionan los resultados de testosterona y estradiol con inmunoanálisis quimioluminiscentes (Luminisc), espectrometría de masas (Mass Spec) y radioinmunoanálisis (RIA) en el programa de control de calidad externo europeo organizado por el Referenzinstitut für Bioanalytik (Alemania).

REFERENCIAS.

1. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007 Jul;87(3):905–31.
2. Berkovitz GD, Brown TR, Migeon CJ. Androgen receptors. *Clin Endocrinol Metab.* 1983 Mar;12(1):155–73.
3. Yalow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature.* 1959 Nov 21;184 (Suppl 21):1648–9.
4. Abraham GE. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 beta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1969 Jun;29(6):866–70.
5. Schiøler V, Thode J. Six direct radioimmunoassays of estradiol evaluated. *Clin Chem.* 1988 May;34(5):949–52.
6. Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot MC, Mathieu E, Queyrel N, et al. Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin Chem.* 2003 Aug;49(8):1381–95.
7. Herold DA, Fitzgerald RL. Immunoassays for testosterone in women: better than a guess? *Clin Chem.* 2003 Aug;49(8):1250–1.
8. Wang C, Catlin DH, Demers LM, Starcevic B, Swerdloff RS. Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Feb;89(2):534–43.
9. Lee JS, Ettinger B, Stanczyk FZ, Vittinghoff E, Hanes V, Cauley JA, et al. Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Oct;91(10):3791–7.
10. Stanczyk FZ, Cho MM, Endres DB, Morrison JL, Patel S, Paulson RJ. Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits. *Steroids.* 2003 Dec;68(14):1173–8.
11. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Feb;92(2):405–13.

12. Rosner W, Vesper H, Endocrine Society, American Association for Clinical Chemistry, American Association of Clinical Endocrinologists, Androgen Excess/PCOS Society, et al. Toward excellence in testosterone testing: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Oct;95(10):4542–8.
13. Vesper HW, Botelho JC, Shacklady C, Smith A, Myers GL. CDC project on standardizing steroid hormone measurements. *Steroids.* 2008 Dec 12;73(13):1286–92.
14. Botelho JC, Shacklady C, Cooper HC, Tai SSC, Van Uytfanghe K, Thienpont LM, et al. Isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry candidate reference method for total testosterone in human serum. *Clin Chem.* 2013 Feb;59(2):372–80.
15. French D. Development and validation of a serum total testosterone liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) assay calibrated to NIST SRM 971. *Clin Chim Acta.* 2013 Jan 16;415:109–17.
16. Hormone and Vitamin D Standardization Programs (HoSt/VDSCP) | CDC [Internet]. 2019 [cited 2022 Jun 14]. Available from: <https://www.cdc.gov/labstandards/hs.html>
17. CDC HoSt Certified Estradiol Procedures. 2019;5.
18. Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Feb;87(2):589–98.
19. Rosner W. An extraordinarily inaccurate assay for free testosterone is still with us. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2903.
20. Bhasin S, Brito JP, Cunningham GR, Hayes FJ, Hodis HN, Matsumoto AM, et al. Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: An Endocrine Society* Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2018 May 1;103(5):1715–44.
21. Martin KA, Anderson RR, Chang RJ, Ehrmann DA, Lobo RA, Murad MH, et al. Evaluation and Treatment of Hirsutism in Premenopausal Women: An Endocrine Society* Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2018 Apr 1;103(4):1233–57.
22. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;84(10):3666–72.

23. Middle JG. Dehydroepiandrosterone sulphate interferes in many direct immunoassays for testosterone. *Ann Clin Biochem.* 2007 Mar;44(Pt 2):173–7.
24. Novara G, Galfano A, Secco S, Ficarra V, Artibani W. Impact of surgical and medical castration on serum testosterone level in prostate cancer patients. *Urol Int.* 2009;82(3):249–55.
25. Jeffery J, MacKenzie F, Beckett G, Perry L, Ayling R. Norethisterone interference in testosterone assays. *Ann Clin Biochem.* 2014 Mar;51(Pt 2):284–8.
26. Mandic S, Kratzsch J, Mandic D, Debeljak Z, Lukic I, Horvat V, et al. Falsely elevated serum oestradiol due to exemestane therapy. *Ann Clin Biochem.* 2017 May;54(3):402–5.
27. Berger D, Waheed S, Fattout Y, Kazlauskaitė R, Usha L. False Increase of Estradiol Levels in a 36-Year-Old Postmenopausal Patient With Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Treated With Fulvestrant. *Clin Breast Cancer.* 2016 Feb;16(1):e11-13.
28. Cirrincione LR, Crews BO, Dickerson JA, Krasowski MD, Rongitsch J, Imborek KL, et al. Oral estrogen leads to falsely low concentrations of estradiol in a common immunoassay. *Endocrine Connections* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2022 Sep 4];11(2). Available from: <https://ec.bioscientifica.com/view/journals/ec/11/2/EC-21-0550.xml>
29. Handelsman DJ, Wartofsky L. Requirement for mass spectrometry sex steroid assays in the *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Oct;98(10):3971–3.
30. Letter of concern. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Apr;99(4):1499.
31. Wierman ME, Auchus RJ, Haisenleder DJ, Hall JE, Handelsman D, Hankinson S, et al. Editorial: The new instructions to authors for the reporting of steroid hormone measurements. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Dec;99(12):4375.
32. Rosner W, Hankinson SE, Sluss PM, Vesper HW, Wierman ME. Challenges to the measurement of estradiol: an endocrine society position statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Apr;98(4):1376–87.
33. Demers LM, Hankinson SE, Haymond S, Key T, Rosner W, Santen RJ, et al. Measuring Estrogen Exposure and Metabolism: Workshop Recommendations on Clinical Issues. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2015 Jun 1;100(6):2165–70.

34. Bellet M, Gray KP, Francis PA, Láng I, Ciruelos E, Lluch A, et al. Twelve-Month Estrogen Levels in Premenopausal Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Receiving Adjuvant Triptorelin Plus Exemestane or Tamoxifen in the Suppression of Ovarian Function Trial (SOFT): The SOFT-EST Substudy. *J Clin Oncol*. 2016 May 10;34(14):1584–93.
35. Large DM, Anderson DC. Twenty-four hour profiles of circulating androgens and oestrogens in male puberty with and without gynaecomastia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1979 Nov;11(5):505–21.
36. Chang WY, Knochenhauer ES, Bartolucci AA, Azziz R. Phenotypic spectrum of polycystic ovary syndrome: clinical and biochemical characterization of the three major clinical subgroups. *Fertil Steril*. 2005 Jun;83(6):1717–23.
37. Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol*. 2015 Aug;173(2):D1-12.
38. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009 Feb;91(2):456–88.
39. Miller KK, Biller BMK, Beauregard C, Lipman JG, Jones J, Schoenfeld D, et al. Effects of testosterone replacement in androgen-deficient women with hypopituitarism: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 May;91(5):1683–90.
40. Davis SR, van der Mooren MJ, van Lunsen RHW, Lopes P, Ribot C, Ribot J, et al. Efficacy and safety of a testosterone patch for the treatment of hypoactive sexual desire disorder in surgically menopausal women: a randomized, placebo-controlled trial. *Menopause*. 2006 Jun;13(3):387–96.
41. Viganò L, Benfenati E, van Cauwenberge A, Eidem JK, Erratico C, Goksøyr A, et al. Estrogenicity profile and estrogenic compounds determined in river sediments by chemical analysis, ELISA and yeast assays. *Chemosphere*. 2008 Oct;73(7):1078–89.
42. EP05A3: Evaluating Quantitative Measurement Precision [Internet]. Clinical & Laboratory Standards Institute. [cited 2022 Jun 14]. Available from: <https://clsi.org/standards/products/method-evaluation/documents/ep05/>

43. Stanczyk FZ, Lee JS, Santen RJ. Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Sep;16(9):1713–9.
44. Paduch DA, Brannigan RE, Fuchs EF, Kim ED, Marmar JL, Sandlow JI. The laboratory diagnosis of testosterone deficiency. *Urology.* 2014 May;83(5):980–8.
45. Clinical and Laboratory Standards Institute, editor. *Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline.* 3. ed. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010. 60 p. (Document / Clinical and Laboratory Standards Institute).
46. Certified Total Testosterone Assays. 2021;7. https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/hs/CDC_Certified_Testosterone_Assays-508.pdf (acceso 15/11/2022)