

Señor Director de
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
Prof. Dr. Juan Miguel Castagnino

De mi mayor consideración

Por este medio le hago llegar un resumen de la situación actual que involucra la determinación de Testosterona en sangre periférica a los efectos que considere la posibilidad de su difusión en *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*.

Significado clínico de la determinación de Testosterona. Utilidad y problemas metodológicos

► Hugo Estanislao Scaglia¹

¹ Bioquímico. Especialista en Bioquímica Endocrinológica y Especialista en Andrología. Categoría: consultor

La Testosterona (TT) es un esteroide de acción androgénica, pero su mayor efecto es la capacidad a nivel genómico de expresar la 5 alfa reductasa que la transforma en dihidro TT (DHT) que resulta 1,6 veces de mayor poder androgénico que su precursor.

Debido a que la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos todavía no dispone de métodos accesibles para determinar DHT, la valoración del estado androgénico se realiza determinando los niveles circulantes o en saliva de TT.

En esta comunicación trataré de resumir tres aspectos del problema:

- 1) La utilidad clínica de su determinación tanto para hombres como para mujeres
- 2) Los diferentes métodos para su valoración y las limitaciones que presentan
- 3) La disparidad de los niveles de TT entre laboratorios que utilicen métodos diferentes

1) La utilidad clínica de su determinación tanto para hombres como para mujeres

Algunas de las indicaciones más frecuentes en la determinación de TT son las siguientes:

En mujeres, desde el punto de vista clínico su valoración está orientada como parte del diagnóstico del hiperandrogenismo. Esta patología puede presentarse como una expresión clínica, el hirsutismo, y/o bioquímico, aumento de los andrógenos circulantes. El hiperandrogenismo bioquímico resulta importante para la identificación de los fenotipos del Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), para la evaluación de tumores virilizantes ováricos o adrenales así como para otras patologías

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

que presenten hirsutismo o defeminización (1). En los varones recién nacidos, para diagnosticar la presencia de testículo cuando los mismos no son palpables (intra abdominales), en la pubertad para la definición del estadio de Tanner, en la edad reproductiva para el diagnóstico de hipogonadismo y en hombres en edad avanzada para definir la presencia posible de andropausia (2).

2) Diferentes métodos para su valoración y las limitaciones que presentan

EVOLUCIÓN DE LA METODOLOGÍA

Originalmente se evaluaban metabolitos urinarios de la TT por reacciones colorimétricas (17 cetoesteroides y su separación cromatográfica en 11 desoxi, mayoritariamente metabolitos de la TT o de sus precursores y 11 oxo esteroides, mayoritariamente metabolitos de los glucocorticoides). Posteriormente se desarrolló un método en orina de 24 horas, extractivo y con purificación cromatográfica del extracto y reacción final valorada por espectrofotometría. Estos métodos no tenían la sensibilidad y especificidad apropiadas resultando de limitada utilidad clínica.

El desarrollo del método por doble dilución isotópica en sangre periférica permitió por su sensibilidad, pero sobre todo por su especificidad, aumentar el conocimiento fisiopatológico de la acción androgénica (3). Este método de gran confiabilidad, representativo de los niveles de TT, resulta de difícil aplicación en los laboratorios de análisis clínicos y tiene la limitación del número escaso de muestras que pueden evaluarse simultáneamente.

METODOLOGÍA ACTUAL DE DIFUSIÓN MASIVA. LIMITACIONES

La aparición del radioinmunoanálisis (RIA) rápidamente se difundió en la práctica clínica, debido a su sensibilidad y relativo bajo costo, entre otros factores. Cuando se logró su automatización fue posible la resolución de numerosas muestras simultáneamente. La limitación fundamentalmente de estos estudios está dada por la utilización de isótopos radioactivos, con la posible contaminación ambiental y del personal técnico. Es necesario en nuestro medio tener permiso personal e institucional, conseguido por cursos dictados o supervisados por la Comisión Nacional de Energía Atómica, y que este ente regulador realice una estrecha auditoría técnica e institucional de quienes lo realizan y de las instalaciones de sus laboratorios.

El RIA, si bien todavía está en vigencia, fue reemplazado por métodos que no emplean isótopos radioactivos. Fundamentalmente emplean reacciones colorimétricas, fluorescentes, fluorescentes de tiempo resuelto, enzimáticas, quimioluminiscentes y electro-quimioluminiscentes, entre otras.

Algunos laboratorios productores de *kits* comerciales, con tecnologías diferentes en sus aparatos suelen emplear el mismo principio de reacción aunque con distintos marcadores finales; por ejemplo, para quimioluminiscencia se han empleado para distintas marcas comerciales ésteres de acridina, luminol, isoluminol, enzimas con reacción final de quimioluminiscencia como el dioxetano fosforilado o el dioxetano con fosfatasa alcalina. Los métodos fluorescentes utilizan en diferentes marcas comerciales, entre otros, substratos fluorométricos como fluoresceína, quelatos de lantánidos o métodos enzimáticos con substrato fluorescente como el 4-metilumbeliferil-fosfato. El Osmio, Rutenio y el Renio son substratos quimioluminiscentes empleados por laboratorios comerciales para métodos de electro-quimioluminiscencia. Otra técnica enzimática en su *kit* comercial emplea el substrato cromogénico, tetrametilbenzidina para la reacción final.

Estos métodos tienen ventajas y desventajas. Son sensibles, fácilmente automatizables, reproducibles y en general todos cumplen los requisitos de control de calidad. Para el caso particular de TT es importante tener presente que el método elegido debe en su valoración cubrir la concentración circulante del andrógeno, para lo cual tendría que poder definir con precisión niveles de corte para la prepubertad en ambos sexos, para mujeres en edad reproductiva, en la menopausia y en hombres normales. Para cada una de estos grupos etarios los niveles serán de distinto orden de magnitud, desde picogramos hasta nanogramos.

La gran desventaja es la variabilidad de los resultados entre los diferentes métodos y también entre laboratorios que utilicen la misma metodología.

En los últimos años se han desarrollado métodos empleando cromatografía gaseosa o cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (GC MSMS o LC MSMS, respectivamente) La técnica de LC MSMS actualmente ha sido considerada como el método de referencia para la determinación de TT. Últimamente han sido desarrolladas técnicas como ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionisation – APCI*) y *electro spray ionisation (ESI)*, que permiten acoplarse directamente a LC MSMS sin derivatización previa. Estos ensayos de LC de ultra *performance* redundarán en mejorar la sensibilidad, velocidad y resolución en la determinación de esteroides (4).

Estas metodologías no resultan en general de fácil implementación para la mayoría de los laboratorios por su elevado costo, sin embargo deberían tratar de conseguirse en el futuro, condiciones para facilitar el acceso de LC MSMS para la investigación y la práctica clínica.

Numerosas publicaciones demostraron la gran variabilidad entre los diferentes *kits* comerciales así como la significativa diferencia entre los resultados de los diferentes *kits*

comerciales respecto a los métodos por GC-MSMS o LC MSMS, llevando a erróneas interpretaciones clínicas (5).

Por esta falta de precisión y variabilidad en los resultados del andrógeno la Sociedad de Endocrinología (EE. UU.) reunió un grupo de expertos que desarrollaron un protocolo de estudio al respecto (6).

Evaluaron en alícuotas idénticas de suero de la misma muestra obtenidas de un *pool* de 3 diferentes grupos:

- 1) mujeres normales en 1108 diferentes laboratorios,
- 2) mujeres hirsutas y hombres hipogonádicos en 1133 laboratorios,
- 3) hombres normales en 1135 laboratorios.

Cada laboratorio que participó de este estudio utilizó su método habitual. Los métodos empleados por los diferentes laboratorios fueron los siguientes:

- Abbott-Architect
- Bayer-ACS 180 y Bayer-Centaur
- Beckman-Access/2 y Beckman-UniCelDxl
- DPC-Coat a Count; DPC-Immulinite 1000; DPC-Immulinite 2000 y DPC-Immulinite 2500
- Roche-Elecsys 1010 y Roche-Elecsys/E 170
- Tosoh-AIA-Pack
- Vitros-Eci
- MS

Los resultados expresados como el rango de concentración mínimo y máximo entre todos los participantes y el coeficiente de variación (CV) promedio de todos, para los 3 grupos fueron: grupo 1: 0,07–0,77 ng/mL; CV: 35%; grupo 2: 0,55–2,00 ng/mL; CV 32% y grupo 3: 3,44–7,44 ng/mL; CV: 17%. Claramente puede observarse que la variabilidad expresada como el CV disminuye en función de la concentración de TT.

Cada miembro revisó en detalle los resultados, además de las publicaciones previas sobre base de datos de *PubMed*, *Ovid*, *MEDLINE*, *Google Scholar* *College of American Pathologists*. Las recomendaciones surgieron de la capacidad de cada método para evaluar adecuadamente muestras con concentraciones conocidas y no por la concordancia con métodos similares.

Con los resultados obtenidos comunicaron su posición así como sugerencias de cómo intentar corregir estas dificultades (6). Según los autores “este estudio demostró que las metodologías empleadas en numerosos ensayos, realizados actualmente, son decididamente no satisfactorias. La tecnología existe para realizar esta determinación en forma segura, precisa y reproducible; los laboratorios necesitan cambiar las técnicas para poder garantizar que esta determinación se estandarice de forma que todos los ensayos estén validados. Deben evitarse los ensayos directos, aquellos que utilizan el suero entero, cuya *performance* es muy pobre a niveles bajos de TT, por ejemplo en niños, mujeres y hombres hipogonádicos. De no disponer de LC

MSMS se sugiere extraer el suero y su posterior purificación seguida de MS o RIA”.

A los efectos de tratar de estandarizar el proceso de valoración en los aspectos pre y post analíticos así como el rango de referencia, problema general de los laboratorios, *The Centers for Disease Control (CDC) and Prevention's Hormone Standardization Project (CDC-HoST Program. National Center for Environment Health, Division of Laboratory Sciences* www.cdc.gov/info ha establecido diversas pautas para la certificación de validación de cada método respecto al método patrón de CDC (LC MSMS)

El procedimiento para validar un método acorde a CDC consta de los siguientes pasos:

1. CDC envía un determinado número de muestras con valores conocidos de TT en 4 oportunidades en el primer año. Con los valores de las muestras enviadas y los propios, se re-calibra el método que se está validando.
2. En el segundo año se envían nuevamente un número igual de muestras, también en 4 oportunidades, pero con valores desconocidos.
3. El laboratorio envía los resultados obtenidos a CDC en cada una de las 4 oportunidades que recibió las muestras incógnitas. CDC analiza los resultados comparativamente a su método de referencia y determina el bias del laboratorio y del método de referencia, convalidando el método si ambos bias no difieren en $\pm 6,4\%$.

Actualmente algunos laboratorios comerciales establecen en sus insertos que sus *kits* comerciales están calibrados contra LC MSMS, mejorando significativamente los resultados con esos métodos.

Previamente hemos realizado un estudio cooperativo con 16 laboratorios donde se analizaron alícuotas idénticas de muestras de mujeres y hombres, normales o con patologías diversas por el método que normalmente emplea cada participante. Los métodos empleados en ese estudio incluían 2 métodos calibrados con LC MSMS. Una alícuota fue determinada por LC MSMS (laboratorio Quest). Analizamos el *bias* obtenido en cada método, así como el de LC MSMS. Los 2 métodos calibrados fueron los únicos cuyo *bias* fue $\pm 6,4\%$ del *bias* de LC MSMS (7). Esos resultados fueron confirmados en un nuevo estudio (8).

En las condiciones actuales es posible sugerir que se elijan métodos por lo menos validados directa o indirectamente por LC MSMS

3) La biodisponibilidad de los niveles de TT entre laboratorios que utilicen métodos diferentes

Actualmente, tanto para TT como para otras determinaciones hormonales, el concepto es que el seguimiento

del tratamiento en un determinado paciente, se sugiere que se realice en laboratorios que empleen la misma metodología o preferiblemente en el mismo laboratorio.

Las discrepancias se manifiestan también aun si los *kits* fueron validados por resultados obtenidos por LC MSMS, excepto que el método a que los fabricantes de los *kits* hacen referencia, esté validado por LC MSMS. Recientemente fue comunicado que diferentes métodos desarrollados empleando LC MSMS, no validados por CDC, también presentan diferencias en sus resultados (9). En consecuencia para obtener resultados comparables con diferentes técnicas, debería intentarse que las mismas hayan sido convalidadas en CDC o indirectamente contra resultados por LC MSMS validado por CDC.

El desafío de los analistas clínicos es revertir ese concepto, con la comodidad que les permita a los pacientes que las indicaciones médicas puedan ser valoradas con resultados comparables, independientemente de la metodología empleada. Esto requerirá de un importante trabajo cooperativo en el futuro.

Referencias bibliográficas

1. Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES, Moran C, Lazenby J, Stephens KC, *et al.* Androgen excess in women: Experience with over 1000 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 (2): 453-62.
2. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, *et al.* Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndrome. An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1995-2010.
3. Lipsett MB, Sarfaty GA, Wilson SH, Bardin CW, Fishman LM. Metabolism of testosterone and related steroids in metastatic interstitial cell carcinoma of the testis. *J Clin Invest* 1966; 45 (11):1700-09.
4. Zhao X, Metcalfe CD. Characterizing and compensating for matrix effects using atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-tandem mass spectrometry: analysis of neutral pharmaceuticals in municipal wastewater. *Anal Chem* 2008; 80 (6): 2010-7.
5. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman R, *et al.* Definition and significance of polycystic ovarian morphology: atask force from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update* 2014; 20: 334-52.
6. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, PM Sluss PM, Raff H. Position statement: Utility, limitations and pitfalls in measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 405-13.
7. Scaglia HE, Buccini G, Chichizola C, Colombani ME, Corazza N, Corthey C, *et al.* Comparación de los resultados de Testosterona (T) por diversos métodos empleando técnicas convalidadas o no y por cromatografía líquida en tandem con espectrometría de masa (LC MSMS). *RAEM* 2015; 52: 137-52.
8. Scaglia HE, Buccini G, Chichizola C, Colombani ME, Corazza N, Corthey C, *et al.* A comparison of serum Total Testosterone (TT) measurements by various methods, employing current validated techniques, and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). A Multicentric Study. Possible interferences affecting laboratories variability in TT measurements. Meeting de la Endocrine Society. Orlando USA April 2017. Abstract RE 29713.
9. Büttler RM, Martens F, Fanelli F, Pham HT, Kushnir MM, Janssen MJW *et al.* Comparison of 7 published LC MSMS methods for the simultaneous measurement of Testosterone, Androstenedione and Dehydroepiandrosterone in serum. *Clin Chem* 2015; 61: 1475-83.

El autor expresa su profundo agradecimiento a los colegas integrantes del estudio multicéntrico: Buccini G, Chichizola C, Colombani ME, Corazza N, Corthey C, Guevel L, Ibañez G, Lacoste E, Nosetto S, Piaggio R, Riesco O, Sandoz S, Scaglia J, Viola AM, Wolfthal D, Zylbersztejn CC, todos los cuales declaran no tener conflictos de interés.