

DOCUMENTO DE CONSENSO

Resumen ejecutivo del documento de posicionamiento SEQC^{ML}/SEEN/SEEP. Recomendaciones para la medición de esteroides sexuales en la práctica clínica



Gregori Casals^{a,*}, Roser Ferrer Costa^b, Eulàlia Urgell Rull^c,
Héctor F. Escobar-Morreale^d, Jesús Argente^e, Gemma Sesnilo^f y Betina Biagetti^{g,*}

^a Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERHD, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^b Servicio de Bioquímica, Laboratoris Clínics, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^c Servicio de Bioquímica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

^d Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Ramón y Cajal, Universidad de Alcalá, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria IRYCIS, CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas CIBERDEM, Madrid, España

^e Departamento de Pediatría y Endocrinología Pediátrica, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Universidad Autónoma de Madrid, CIBEROBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

^f Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitari Dexeus, Barcelona, España

^g Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 15 de noviembre de 2022; aceptado el 15 de noviembre de 2022

PALABRAS CLAVE

Esteroides sexuales;
Testosterona;
Estradiol;
Inmunoanálisis;
Espectrometría de masas;
Hiperandrogenismo

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 la 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.

© 2022 SEEN y SED. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autores para correspondencia.

Correos electrónicos: casals@clinic.cat (G. Casals), betinaloys.biagetti@vallhebron.cat (B. Biagetti).

KEYWORDS

Sex steroids;
Testosterone;
Estradiol;
Immunoassay;
Mass spectrometry;
Hyperandrogenism

Executive summary of the position statement of the Spanish Societies SEQML/SEEN/SEEP. Recommendations for the measurement of sex steroids in clinical practice

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.

© 2022 SEEN y SED. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

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, la sensibilidad, la exactitud, la precisión y la estandarización de la medición de estas hormonas son muy relevantes 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 los diferentes métodos de medición y su impacto en la práctica clínica, y proporcionamos unas recomendaciones consensuadas por las Sociedades Españolas de Medicina de Laboratorio (SEQC^{LM}), Endocrinología y Nutrición (SEEN) y Endocrinología Pediátrica (SEEP).

Consideraciones preanalíticas

Las condiciones preanalíticas en cualquier medición 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%³, 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 la globulina transportadora de hormonas sexuales (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 asistenciales⁴⁻⁶. 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 radioinmunoanálisis 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 albúmina⁷.

El estradiol circula unido a la SHBG en un 95%. La concentración sanguínea de estradiol no muestra 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.

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 de que un consorcio de numerosas sociedades científicas estadounidenses se ha posicionado a favor de su sustitución por métodos de análisis basados en espectrometría de masas, mucho más exactos^{8,9}. La *Endocrine Society* de Estados Unidos se posicionó ya en 2007⁸ recomendando el empleo de la espectrometría de masas como método de referencia, y los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) iniciaron seguidamente un proyecto para la estandarización de la medida de la concentración de testosterona y estradiol denominado programa *Hormone Standardization* (HoST)¹⁰. Los resultados de seguimiento en los últimos años muestran de forma consistente que, aunque se observan mejoras en algunos métodos de inmunoanálisis, las técnicas basadas en la espectrometría de masas son las que presentan mejores resultados.

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 estructuralmente 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)¹¹. 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 química¹². Existen también reacciones cruzadas con otros metabolitos endógenos, como 11-ketotestosterona o 11-hidroxitestosterona, o con esteroides sintéticos, como nandrolona, danazol o noretisterona¹³. 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 exemestano¹⁴ (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 fulvestrant¹⁵. Más recientemente, se ha descrito que el tratamiento oral con estradiol puede resultar en concentraciones falsamente disminuidas de estradiol cuando se mide por inmunoanálisis¹⁶. 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.

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 métodos de laboratorio basados en inmunoanálisis y de espectrometría de masas, estos 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 (fig. 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 la espectrometría de masas en aquellos trabajos en los que los resultados de esteroides sexuales fueran un *endpoint* relevante¹⁷. Poco después, la misma revista publicó una *Letter of concern* valorando la complejidad del tema¹⁸ y concretó unas instrucciones para los autores relacionadas con los requisitos de las mediciones de hormonas esteroides¹⁹.

La figura 2 compara las ventajas y las 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 de reacciones cruzadas por metabolitos endógenos o exógenos, p.ej., fármacos¹³⁻¹⁵), 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 de puntos de corte de decisión médica comunes entre laboratorios. Sin embargo, la espectrometría de masas es una instrumentación relativamente costosa y requiere en general una preparación previa de la muestra que suele

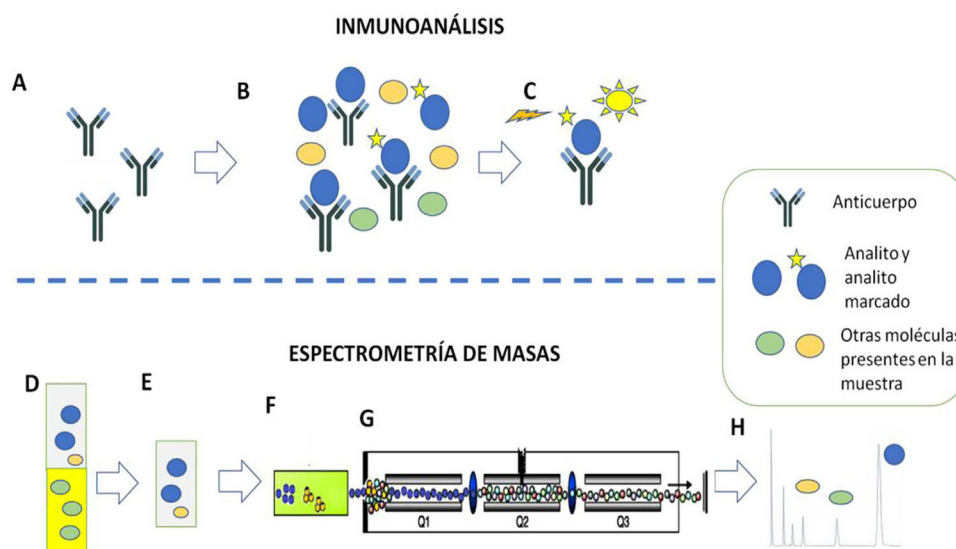


Figura 1 Inmunoanálisis (A-C). Ejemplo de inmunoanálisis competitivo quimioluminiscente. A) El método se basa en un anticuerpo específico que reconoce el analito de interés. B) Se incuba el anticuerpo con la muestra (que contiene el analito de interés y otras moléculas) y con el analito marcado. Analito 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,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.



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

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 radioinmunoanálisis con extracción (fig. 3). En nuestro país la experiencia en la incorporación de métodos de espectrometría de masas para mediciones hormonales distinta a los esteroides sexuales a nivel asistencial se centra especialmente en los últimos

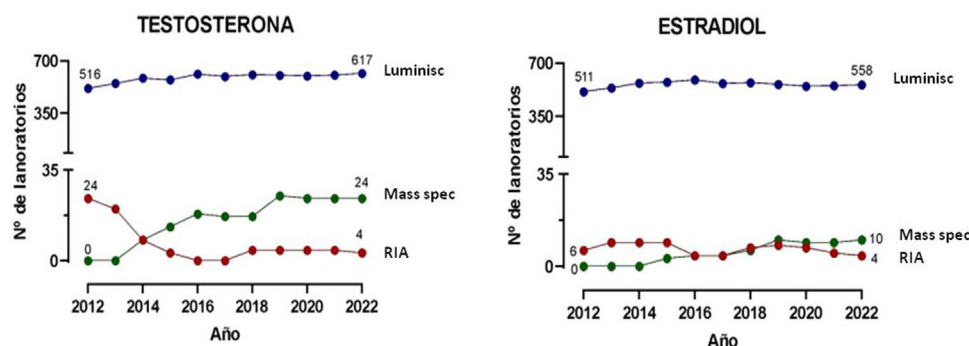


Figura 3 Número de laboratorios que proporcionan los resultados de testosterona y estradiol con inmunoanálisis quimioluminiscentes (Luminisc), espectrometría de masas (Mass Spec) y radioinmunoanálisis (RIA) en el programa de control de calidad externo europeo organizado por el Referenzinstitut für Bioanalytik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

3-4 años, en los que diversos laboratorios han podido disponer de instrumentación dedicada a las hormonas.

Situaciones clínicas en las que la espectrometría de masas presenta mayor interés

Tal y como hemos reseñado, los métodos de análisis de esteroides sexuales deben ser sensibles, específicos, exactos y precisos en un amplio rango de concentraciones^{8,9,20,21}. Hay algunas situaciones de especial relevancia en la práctica clínica que merecen una mención especial.

Sensibilidad: medición de esteroides a bajas concentraciones

a) 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 métodos deben poder distinguir entre concentraciones suprimidas de menos de 1 pg/ml²² 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 metabólico²⁰.

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 método²⁰. Además, la ginecomastia puberal en los niños, que implica un desequilibrio de testosterona y estrógenos, no se puede distinguir con los inmunoanálisis habituales²³.

b) 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^{24,25}, aunque, tal como se explicó anteriormente, la testosterona libre no está disponible en los laboratorios clínicos de rutina. 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 solo 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 pacientes²⁶.

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 las que se sugiere una mejora el deseo sexual con el reemplazo de testosterona en mujeres con hipopituitarismo²⁷ o en mujeres premenopáusicas ovariectomizadas²⁸, 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: 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.

Especificidad

Los pacientes pueden tener estrógenos/andrógenos circulantes derivados de fuentes exógenas, por ejemplo, hormonas esteroides sexuales de los alimentos, suplementos nutricionales, etc.²⁹. 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.

Exactitud

Finalmente, los resultados deberían ser comparables entre diferentes laboratorios; los datos reproducibles son esenciales para el análisis y el control del paciente cuyas pruebas son realizadas por varios laboratorios diferentes utilizando diferentes métodos. La introducción de métodos correctamente estandarizados 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 de reproducibilidad inter-ensayo entre centros.

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 CLSI³⁰ de la población a la que se da servicio, y que cada laboratorio defina sus propios intervalos de referencia³¹⁻³³. En este sentido, el programa HoST de los 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 HoST³⁴.
- 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 aromatasas 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 los métodos de medición basados en espectrometría de masas en todos los centros hospitalarios nacionales, el grupo de trabajo recomienda introducir estos métodos 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 expandirlos paulatinamente al resto de la red hospitalaria, y adaptar de esta forma el sistema nacional de salud a las recomendaciones internacionales vigentes.

Bibliografía

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;87:905-31.
2. Berkovitz GD, Brown TR, Migeon CJ. Androgen receptors. *Clin Endocrinol Metab.* 1983;12:155-73.
3. 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;87:589-98.
4. Rosner W. An extraordinarily inaccurate assay for free testosterone is still with us. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2903.
5. 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103:1715-44.
6. 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103:1233-57.
7. 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;84:3666-72.
8. 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;92:405-13.
9. Rosner W, Vesper H, Endocrine Society; American Association for Clinical Chemistry; American Association of Clinical Endocrinologists; Androgen Excess/PCOS Society; American Society for Bone and Mineral Research; American Society for Repro-

- ductive Medicine; American Urological Association; Association of Public Health Laboratories; Endocrine Society; Laboratory Corporation of America; North American Menopause Society; Pediatric Endocrine Society. Toward excellence in testosterone testing: A consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:4542–8.
10. Vesper HW, Botelho JC, Shacklady C, Smith A, Myers GL. CDC project on standardizing steroid hormone measurements. *Steroids.* 2008;73:1286–92.
 11. Middle JG. Dehydroepiandrosterone sulphate interferes in many direct immunoassays for testosterone. *Ann Clin Biochem.* 2007;44 Pt 2:173–7.
 12. 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;82:249–55.
 13. Jeffery J, MacKenzie F, Beckett G, Perry L, Ayling R. Norethisterone interference in testosterone assays. *Ann Clin Biochem.* 2014;51 Pt 2:284–8.
 14. 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;54:402–5.
 15. 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;16:e11–3.
 16. 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.* 2022;11:e210550 [consultado 4 Sep 2022]. Disponible en: <https://ec.bioscientifica.com/view/journals/ec/11/2/EC-21-0550.xml>.
 17. Handelsman DJ, Wartofsky L. Requirement for mass spectrometry sex steroid assays in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:3971–3.
 18. Letter of concern. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:1499.
 19. 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;99:4375.
 20. 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;98:1376–87.
 21. Demers LM, Hankinson SE, Haymond S, Key T, Rosner W, Santen RJ, et al. Measuring estrogen exposure and metabolism: Workshop recommendations on clinical issues. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100:2165–70.
 22. Bellet M, Gray KP, Francis PA, Lång 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;34:1584–93.
 23. Large DM, Anderson DC. Twenty-four hour profiles of circulating androgens and oestrogens in male puberty with and without gynaecomastia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1979;11:505–21.
 24. 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;83:1717–23.
 25. Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: How to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol.* 2015;173:D1–12.
 26. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandaraki 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;91:456–88.
 27. 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;91:1683–90.
 28. 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;13:387–96.
 29. 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;73:1078–89.
 30. Evaluating Quantitative Measurement Precision. Clinical & Laboratory Standards Institute [consultado 14 Jun 2022]. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/method-evaluation/documents/ep05/>.
 31. Stanczyk FZ, Lee JS, Santen RJ. Standardization of steroid hormone assays: Why, how, and when? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:1713–9.
 32. Paduch DA, Brannigan RE, Fuchs EF, Kim ED, Marmar JL, Sandlow JL. The laboratory diagnosis of testosterone deficiency. *Urology.* 2014;83:980–8.
 33. The Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory: Approved Guideline. 3rd ed. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
 34. Certified Total Testosterone Assays. 2021;7 [consultado 15 Nov 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/hs/CDC.Certified.Testosterone.Assays-508.pdf>.