Evaluación de una técnica de inmunoanálisis para la determinación de testosterona libre

Martínez Jabaloyas JM, Queipo Zaragoza A*, Gil Salom M, Chuan Nuez P.

Servicio de Urología. *Laboratorio de Bioquímica Clínica. Hospital Clínico Universitario. Valencia.

Actas Urol Esp 2006; 30 (6): 598-601

RESUMEN

EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA DE INMUNOANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA LIBRE.

Introducción y objetivos: Los mejores indicadores bioquímicos para el diagnóstico del hipogonadismo son la testosterona libre y la biodisponible. La determinación de ambas fracciones de testosterona es compleja, aunque se han desarrollado técnicas de inmunoanálisis que permiten la determinación de la testosterona libre de manera directa y sencilla. Valoramos la utilidad de una técnica no evaluada de enzimoimmunoanálisis para la determinación de testosterona libre.

Material y métodos: En el estudio se incluyeron 133 varones sanos en los que se determinó la testosterona total, la SHBG, la albúmina y la testosterona libre. La testosterona libre fue determinada mediante 2 métodos diferentes: determinación directa mediante enzimoimmunoanálisis (DSL 10-49100 ACTIVE® Free Testosterone EIA, Diagnostics System Laboratories) y mediante cálculo matemático utilizando la fórmula desarrollada por Vermeulen, que utiliza la concentración de albúmina, testosterona total y SHBG para calcular la testosterona libre (método recomendado por la "International Society for the Study of the Aging Male"). Comparamos los valores obtenidos mediante un test de comparación de medias y realizamos un análisis de regresión para observar el grado de correlación existente entre ambos tipos de determinaciones.

Resultados: La edad media fue de 37 ± 11 años. Los niveles medios de testosterona total fue de $21,43 \pm 6,8$ nmol/L y los de testosterona libre de $0,0508 \pm 0,0118$ nmol/L para el método directo y de $0,474 \pm 0,123$ nmol/L para el método matemático ($p < 0,05$). En el estudio de regresión lineal se observa que aunque existe una correlación positiva entre ambos métodos ($p < 0,05$) el coeficiente de correlación es bajo ($r = 0,25$).

Conclusiones: Existen diferencias significativas entre los valores de testosterona libre determinados por el método directo de enzimoimmunoanálisis y la testosterona libre calculada. Aunque se observa una cierta correlación, esta es tan baja que hace poco fiable la utilización del enzimoimmunoanálisis para la determinación de la testosterona libre.

Palabras clave: Andropausia. Andrógenos. Testosterona. Inmunoanálisis.

ABSTRACT

EVALUATION OF AN IMMUNOASSAY KIT TO MEASURE FREE TESTOSTERONE

Introduction and objectives: The best indicators to the diagnosis of hypogonadism are free and bioavailable testosterone circulating levels. Free and bioavailable testosterone measurements are complex. However, simple kits for direct measurement of free testosterone by analog immunoassay are available. We examined the utility of an enzymeimmunoassay kit for free testosterone measurement.

Material and method: One hundred thirty-three healthy males were included. Total testosterone, SHBG, albumin and free testosterone was measured. We used two different methods to free testosterone estimation: direct measurement by enzymeimmunoassay and mathematical calculation with Vermeulen's formula, which uses albumin concentration, total testosterone and SHBG to calculate free testosterone (method recommended by the International Society for the Study of the Aging Male). We compared the two methods means values and a linear regression study was performed.

Results: Mean age was 37 ± 11 years. Mean serum concentration for total testosterone was 21.43 ± 6.8 nmol/L. The mean value for free testosterone measured by direct and mathematical method was 0.0508 ± 0.0118 nmol/L and 0.474 ± 0.123 nmol/L respectively. In linear regression study exists a positive correlation between both methods ($p < 0.05$), although correlation coefficient is very low ($r = 0.25$).

Conclusions: There are significant statistical differences between the measurements of free testosterone by direct and mathematical methods. Although certain correlation is observed, this is very low. In conclusion, free testosterone measurement by enzymeimmunoassay is not reliable.

Keywords: Andropause. Androgens. Testosterone. Immunoassay.

La testosterona plasmática se divide en 3 fracciones: la fracción unida a la globulina fijadora de hormona sexual o SHBG (Sex-Hormone Binding Globulin), la fracción unida a la albúmina y la libre. La fracción realmente activa es la libre¹, que supone el 2% de la testosterona total². Debido a la lábil unión entre la testosterona y la albúmina existe un fácil intercambio de esta con la libre (tiempo medio de disociación menor de 1 segundo)³, por lo que la fracción unida a la albúmina tiene una alta actividad biológica. Por ello a estas dos fracciones (libre y unida a la albúmina) se las denomina también testosterona biodisponible o bioactiva. La unión de la testosterona con la SHBG es muy fuerte⁴, por lo que su actividad biológica es escasa, considerándose un depósito circulante de hormona.

Con la edad se observa un descenso de la testosterona plasmática total⁵, aunque existen grandes diferencias interindividuales, con un incremento de los niveles de globulina transportadora de hormona sexual (SHBG)⁶. Este descenso de la producción de testosterona y el aumento de la producción de SHBG resulta en que la testosterona biodisponible y la libre descienden aún más que la testosterona total, por lo que determinar la testosterona total puede ser un índice engañoso de la actividad androgénica. Por ello será más fiable la determinación de testosterona libre o la biodisponible.

El método de referencia para determinar la testosterona libre es la diálisis en equilibrio y para la biodisponible la precipitación con sulfato amónico, pero tienen el inconveniente de que son métodos complejos y caros. De los métodos alternativos el más fidedigno, respecto a los de referencia, ha resultado ser el método matemático⁷⁻¹⁰, siendo el método de determinación de testosterona libre recomendado por la "International Society for the Study of the Aging Male" (ISSAM)¹¹ para el diagnóstico de hipogonadismo de comienzo tardío o andropenia.

Los métodos directos, que utilizan el inmunoanálisis, principalmente radioinmunoanálisis (RIA), han sido criticados por su inexactitud^{7,12}, pero son aún ampliamente utilizado en los laboratorios por su comodidad.

Intentamos establecer la validez de un método directo de enzimoimmunoanálisis (EIA) para la

determinación de la testosterona libre, comparándolo con el método matemático desarrollado por Vermeulen.

PACIENTES Y MÉTODO

Estudio en el que se incluyeron 133 varones sanos donantes de sangre del banco de sangre de nuestro hospital, a los que se les realizó la extracción entre las 8 y las 10 de la mañana. En ellos se determinó la testosterona total (CMIA: *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*, ARQUITECT Abbott Laboratories), la albúmina (BCG de Olympus System Reagent) y la SHBG (Fluoroinmunoensayo, Kit DELFIA, Wallac Oy Turku, Finlandia) y testosterona libre. La testosterona libre fue determinada por un método directo, mediante análogos marcados, que utiliza el enzimoimmunoanálisis (DSL 10-49100 ACTIVE® *Free Testosterone EIA, Diagnostics System Laboratories*) y por el método del cálculo matemático, utilizando la fórmula descrita y validada por Vermeulen et al⁷. Este método matemático consiste en una ecuación de segundo grado basada en la ley de acción de masas. Aunque es una fórmula compleja, con las actuales hojas de cálculo es fácil la determinación, de tal forma que introduciendo en la fórmula la concentración de testosterona total, de albúmina y de SHBG se obtiene la concentración de testosterona libre.

Analizamos los resultados mediante un estudio de comparación de medias (t de student) y realizamos un análisis de regresión lineal para observar el grado de correlación existente entre ambos tipos de determinaciones.

RESULTADOS

La edad media de los pacientes incluidos en el estudio fue de 37 ± 11 años. Los niveles medios de testosterona total fue de $21,1 \pm 6,8$ nmol/L ($6,1 \pm 2,0$ ng/ml) y los de testosterona libre de $0,0508 \pm 0,0118$ nmol/L ($14,68 \pm 3,42$ pg/ml) para el método directo (EIA) y de $0,474 \pm 0,123$ nmol/L ($136,9 \pm 35,5$ pg/ml) para el método matemático, con diferencias significativas entre ambas medias ($p < 0,05$).

El nivel medio de albúmina fue de $4,2 \pm 0,2$ g/dl y el de SHBG de $31,6 \pm 12,2$ nmol/L.

En el estudio de regresión lineal (Fig. 1) se observa que existe una correlación significativa

FIGURA 1. Análisis de regresión lineal entre los valores de testosterona libre determinados mediante enzimoimmunoanálisis (E.I.A.) y mediante cálculo matemático. Test libre E.I.A. = Test libre calculada * 0,024 + 0,039.

entre ambos métodos ($p < 0,05$) pero con un coeficiente de correlación de 0,25 (coeficiente de determinación $r^2 = 0,06$).

La testosterona libre determinada mediante la fórmula matemática supuso el 2,2% de la testosterona total, mientras que la determinada mediante EIA supuso el 0,24%.

DISCUSIÓN

En los últimos años hemos asistido, entre la comunidad urológica, a un incremento sustancial del interés por la andropenia o lo que es lo mismo, el descenso de los niveles de andrógenos en el varón durante el envejecimiento y su repercusión clínica¹³. Aunque la actividad androgénica puede verse influenciada, además de por los niveles de andrógenos, por la interacción de estos con el receptor androgénico a nivel de los tejidos, hasta el momento, el mejor test diagnóstico de hipogonadismo es la determinación de la testosterona libre o la bioactiva¹⁴, por lo que es fundamental la correcta determinación de éstas.

Los métodos por los que se puede determinar la testosterona libre y la biodisponible son: diálisis en equilibrio, precipitación por sulfato amónico, índice androgénico libre, cálculo matemático, inmunoanálisis (RIA y EIA). La *diálisis en equili-*

*biro a 37° C*¹⁵ es el método de referencia, pero es una técnica compleja, requiere alto grado de experiencia y mucho tiempo de realización, por lo que no se puede adaptar a la clínica diaria.

La *precipitación por sulfato amónico*¹⁶ es el método de referencia para la testosterona biodisponible pero es complejo y caro.

El *índice androgénico libre* (testosterona total/SHBG), como parámetro de testosterona biodisponible, no tiene en cuenta la concentración de albúmina ni las constantes de disociación de la testosterona con la SHBG y únicamente es un parámetro válido de la testosterona biodisponible cuando la concentración de testosterona es baja en comparación a la capacidad de fijación de la SHBG¹⁷, por lo que puede ser útil en mujeres pero no en varones adultos.

El *método matemático*⁷ (Vermeulen) consiste en el cálculo de la testosterona libre a partir de la testosterona total, la SHBG y la albúmina. Es el método recomendado por la ISSAM¹¹ y en la página web de esta sociedad (www.issam.ch) existe una calculadora en la que introduciendo los valores de los anteriores parámetros, calcula la testosterona libre y la biodisponible. También se puede desarrollar la fórmula en una hoja de cálculo.

Los métodos directos, por técnicas de *inmunoanálisis*, que utilizan análogos marcados de testosterona libre son los más atractivos y simples para el uso clínico, siendo ampliamente utilizados, incluso en publicaciones científicas. Sin embargo, cuando se han validado estos métodos se ha observado una gran inexactitud^{7,10}, ya que sólo consiguen determinar una fracción de la testosterona libre (del 20 al 60%)^{7,18,19}. Recientemente se han intentado validar 5 métodos de determinación de testosterona libre, entre los que se encontraban 4 inmunoanálisis y el método de cálculo matemático¹⁰. El que mayor concordancia tenía con los valores de referencia fue el método matemático. Los 4 métodos de inmunoanálisis detectaban valores aproximadamente 5 veces inferiores a los de referencia, de tal forma que la fracción libre representaba del 0,17 al 0,38% de la testosterona total, cuando lo real era alrededor del 2%. Sin embargo, 2 métodos, Active® (DSL, Veghel, The Netherlands) y Coat-A-Count® (DPC, Los Angeles, CA), a pesar de presentar valores muy bajos de

testosterona, ofrecían una correlación aceptable (mayor del 90%), por lo que estos autores se replantea su futura validez recalibrando dichos tests. Sin embargo, Morley et al⁸ describen previamente una baja correlación entre la testosterona libre determinada mediante diálisis y la prueba Coat-A-Count[®] (DPC, Los Angeles, CA). En nuestro estudio la correlación del método es muy baja, lo que unido a la detección de únicamente del 0,24% de la testosterona total lo invalidaría como método de rutina para la detección de la testosterona libre.

A pesar del error que supone la determinación de la testosterona libre por inmunoanálisis (tanto RIA como EIA), aún se aceptan trabajos en revistas de prestigio en la que la determinación se realizó por este método, lo que ha supuesto la crítica severa de algunos autores¹².

CONCLUSIONES

Existen diferencias significativas entre los valores de testosterona libre determinados por el método directo de EIA y la testosterona libre calculada. Aunque se observa una correlación significativa, ésta es tan baja que hace poco fiable la utilización del método directo analizado (EIA) para la determinación de la testosterona libre. Por el momento, en base a nuestros resultados y a los datos analizados en la literatura, no es aconsejable la utilización de ningún método de inmunoanálisis para la determinación de la testosterona libre.

REFERENCIAS

- Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev.* 1989;10(3):232-274.
- Pardridge WM. Selective delivery of sex steroid hormones to tissues in vivo by albumin and by sex hormone-binding globulin. *Ann NY Acad Sci.* 1988;538:173-192.
- Manni A, Pardridge WM, Cefalu W, Nisula BC, Bardin CW, Santner SJ et al. Bioavailability of albumin-bound testosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;61:705-710.
- Mendel CM: Rates of dissociation of sex-steroid-hormone-binding globulin: a reassessment. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1990;37(2):251-253.
- Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, Longcope C. Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73(5):1016-1025.
- 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(2):589-598.
- 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(10):3666-3672.
- Morley JE, Patrick P, Perry HM 3rd. Evaluation of assays available to measure free testosterone. *Metabolism.* 2002;51(5):554-559.
- Miller KK, Rosner W, Lee H, Hier J, Sesmilo G, Schoenfeld Det al. Measurement of free testosterone in normal women and women with androgen deficiency: comparison of Methods. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(2):525-533.
- Van Uytanghe K, Stockl D, Kaufman JM, Fiers T, De Leenheer A, Thienpont LM. Validation of 5 routine assays for serum free testosterone with a candidate reference measurement procedure based on ultrafiltration and isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2005;38(3):253-261.
- Morales A, Lunenfeld B. Standards, Guidelines and Recommendations of The International Society for The Study of the Aging Male (ISSAM). Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. Official Recommendations of ISSAM. *The Aging Male.* 2002;5:74-86.
- Rosner W: An extraordinarily inaccurate assay for free testosterone is still with us. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(6):2903.
- Schulman CC. The aging male: a challenge for urologists. *Curr Opin Urol.* 2000;10(4):337-345.
- Vermeulen A. Diagnosis of partial androgen deficiency in the aging male. *Ann Endocrinol.* 2003; 64(2):109-114.
- Vermeulen A, Stoica T, Verdonck L. The apparent free testosterone concentration, an index of androgenicity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1971; 33(5):759-767.
- Cumming DC, Wall SR. Non sex hormone binding globulin bound testosterone as a marker of hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;61(5):873-876.
- Kapoor P, Luttrell BM, Williams D. The free androgen index is not valid for adult males. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993;45:325-326.
- Wilke TJ, Utley DJ. Total testosterone, free-androgen index, calculated free testosterone, and free testosterone by analog RIA compared in hirsute women and in otherwise-normal women with altered binding of sex-hormone-binding globulin. *Clin Chem.* 1987;33:1372-1375.
- Rosner W. Errors in the measurement of plasma free testosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(6):2014-2015.

Dr. J.M. Martínez Jabaloyas
Servicio de Urología. Hospital Clín. Univ. de Valencia
Avda. Blasco Ibáñez, 17 - 46010 Valencia
E-mail: jaba@pulso.com

(Trabajo recibido el 21 junio de 2005)