



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Cirurgia

Facultat de Medicina

Programa de doctorat en cirurgia i ciències morfològiques

Tesi doctoral

Estudi de la concentració de testosterona en pacients amb càncer de pròstata durant la supressió androgènica mitjançant diferents procediments de mesura

**Autora de la tesi**

Immaculada Comas Reixach

**Directors de la tesi**

Dr. Joan Morote Robles

Dra. Roser Ferrer Costa

**Tutor de la tesi**

Dr. Joan Morote Robles

Universitat Autònoma de Barcelona. 2020



# ÍNDIX

ÍNDIX.....	i
AGRAÏMENTS.....	iii
ÍNDIX D'ABREVIATURES.....	v
ÍNDIX DE FIGURES.....	ix
ÍNDIX DE TAULES.....	x
<b>1 INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 INTRODUCCIÓ AL CÀNCER DE PRÒSTATA.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Epidemiologia.....	2
1.1.2 Classificació i estratificació del càncer de pròstata.....	5
1.1.3 Diagnòstic del càncer de pròstata.....	8
1.1.4 Tractament del càncer de pròstata.....	11
1.1.5 Control de la supressió androgènica.....	13
<b>1.2 HORMONA ANDROGÈNICA: TESTOSTERONA.....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Formulació química.....	15
1.2.2 Síntesis.....	15
1.2.3 Metabolisme.....	18
1.2.4 Transport.....	19
1.2.5 Excreció.....	19
1.2.6 Concentració fisiològica.....	20
1.2.7 Accions fisiològiques en homes.....	20
1.2.8 Mecanisme d'acció.....	21
<b>1.3 REGULACIÓ DE LA SÍNTESIS D'ANDRÒGENS.....</b>	<b>24</b>
1.3.1 Origen i formulació química.....	24
1.3.2 Funcions al testicle.....	25
1.3.3 Regulació.....	25
1.3.4 Concentracions fisiològiques.....	26
<b>1.4 PAPER DELS ANDRÒGENS EN EL CÀNCER DE PRÒSTATA I     AGONISTES DE LA LHRH.....</b>	<b>27</b>
1.4.1 Anàlegs de la LHRH.....	27
1.4.2 Concentració hormonal durant el tractament.....	28
<b>1.5 MESURA DE LA CONCENTRACIÓ DE TESTOSTERONA.....</b>	<b>31</b>

1.5.1	Mètodes de mesura.....	31
1.5.2	Mesura de la concentració de testosterona en pacient amb càncer de pròstata sotmesos a castració.....	34
1.6	JUSTIFICACIÓ DE LA HIPÒTESIS.....	36
2	HIPÒTESIS DE TREBALL.....	39
3	OBJECTIUS.....	41
4	METODOLOGIA.....	43
4.1	REVISIÓ SISTEMÀTICA DE LA LITERATURA.....	43
4.2	PACIENTS.....	45
4.3	MÈTODES ANALÍTICS.....	46
4.3.1	Mètodes quimioluminiscent.....	46
4.3.2	Mètodes LC-MSMS.....	47
4.4	ANÀLISI ESTADÍSTIC.....	49
5	RESULTATS.....	52
6	DISCUSSIÓ.....	88
7	CONCLUSIONS.....	96
8.	ANNEXES.....	99
8.1	INFORME CEIC.....	99
8.2	RESULTATS NO RECOLLITS EN ARTICLES.....	101
8.2.1	Resultats d'imprecisió dels diferents mètodes.....	101
8.2.2	Concentració de castració pels diferents mètodes.....	102
9	BIBLIOGRAFIA.....	104

## AGRAÏMENTS

Arribar a aquest moment, després de que comencés la tesis ja fa uns quants anys, no hagués estat possible sense el Dr. Joan Morote i la Dra. Roser Ferrer. Agrair al Dr. Morote haver confiat amb mi, haver-me donat la oportunitat de treballar conjuntament i per les facilitats prestades per a l'elaboració d'aquesta tesis. Admiro la seva saviesa i la seva capacitat de treball. Gràcies per la seva inquietud com a clínic per conèixer i entendre el treball del Laboratori. A la Roser li he d'agrair haver confiat en mi des del primer moment que vaig entrar al Laboratori de resident. Sempre ha estat un referent en totes les meves etapes professionals, companya, amiga, directora de tesis, "jefa". Gràcies per haver-me creat la inquietud de conèixer més de les Hormones, per transmetre tanta passió per la nostra professió, per ser un motor incansable del dia a dia, per ensenyar-me predicant amb l'exemple que treballant es pot aconseguir tot, per estar sempre a qualsevol hora i moment. Gràcies per haver-me posat totes les facilitats per a l'elaboració i redacció d'aquesta tesis. No acabaria mai i no em vull deixar res... gràcies per TANT i per TOT, sense tu no seria el que sóc.

Agrair també a tot el personal tècnic del procés d'Hormones el seu suport, en especial a la Lúdia i la Irene. També a la Carmen i l'Àngels per ajudar-me sempre en el processament de les mostres.

No em puc oblidar d'agrair a Mario Ferrer de Teknokroma el seu suport en el desenvolupament i processament de mostres per LCMSMS, així com al personal de Izasa Scientific, a Sergio Miranda i en especial al Ciro.

Aquesta tesis no hagués estat possible sense el meus companys. Al Roberto Calatan per haver-me transmès la passió per les Hormones, a la Dra. Pelegrí per ser un referent en la bioquímica, a l'Albert pel seu suport informàtic, a la Marina per alliberar-me de l'assistència quan necessitava temps, a la Dra. Andrea Caballero per recolzar-me i ser un referent, a la Sílvia Camós per ser més que la meva Co-R. I especialment a la Luzma per ser companya i sobretot amiga, per fer-me veure els meus errors, debilitats i ensenyar-me a superar-los, per no deixar que tirés mai la tovallola, però sobretot per la teva paciència, afecte i recolzament en tot moment. Gràcies futura Dra. Cruz!!!

A les meves farmacèutiques, Laia, Elena, Mercè i Blanca, per estar sempre al meu costat. A la família del Cuban Trail Team, en especial al "Presi" Reinier per la teva

generositat i per ensenyar-me a lluitar pel que un vol, i a la Cris per transmetre tanta passió per la teva professió i pels teus ànims.

Als meus pares i germans per haver-me acompanyat tota la meva vida. Sense vosaltres no estaria aquí.

Als meus primis, Duny i Yenisel, per creure sempre en mi i estar sempre al meu costat.

I finalment gràcies a la meva petita gran família, Yuniel i Eloy, simplement per estar al meu costat i per la vostra paciència. A l'Eloy per ser el meu motor en aquesta recta final i pel teu somriure que "ho cura tot". Us estimo!

**Moltes gràcies a tots/es!!**

## ÍNDEX D'ABREVIATURES

ABP: Proteïna fixadora d'andrògens, de l'anglès *Androgen binding protein*

ACTH: Hormona Corticotropa

ADT: Teràpia de supressió androgènica, de l'anglès *Androgen deprivation therapy*

AF1: funció d'activació 1

AF2: funció d'activació 2

AR: Receptor Androgènic

AVAC: Anys de vida ajustats per qualitat

BMD: Densitat mineral òssia

BMI: Índex de massa corporal

C: Carboni

CaP: Càncer de Pròstata

csCaP: Càncer de Pròstata significatiu

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CRPC: Càncer de Pròstata Resistent a la Castració

CV: Coeficient de variació

CYP: Citocrom P450

Da: Daltons

DBD: domini d'unió al DNA

DHEA: Di-hidroepiandrosterona



DHEA-S: Di-hidroepiandrosterona Sulfat

DHT: Di-hidrotestosterona

DNA: àcid desoxiribonucleic, de l'anglès *deoxyribonucleic acid*

E: Estradiol

EAU: European Association of Urology

EIA: Enzimimmunoanàlisi

ERSPC: de l'anglès *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer*

ETR: Ecografia Transrectal

FDA: Food and Drug Administration

FSH: Hormona fol·liculoestimulant de l'anglès *Follicule-Stimulating Hormone*

GC: Cromatografia de Gasos

GnRH: Hormona alliberadora de gonadotropina, de l'anglès *Gonadotrophin Releasing Hormone*

HBP: Hiperplàsia Benigna de pròstata

hCG: Gonadotropina Coriònica Humana, de l'anglès *Human Corionic Gonadotropin*

HDL: Lipoproteïnes d'alta densitat, de l'anglès *High density lipoprotein*

HPLC: Cromatografia líquida d'alta eficiència, de l'anglès *high-performance liquid chromatography*

HRE: elements de resposta a hormones, de l'anglès *Hormone Response Element*

IA: immunoanàlisi

ISUP: *International Society for Urological Pathology*

LBD: domini d'unió al DNA

LDL: Lipoproteïnes de baixa densitat, de l'anglès *Low density lipoprotein*

LH: Hormona luteïnitzant, de l'anglès *Luteinizing Hormone*

LHRH: Hormona alliberadora de la hormona luteïnitzant

M/Z: massa del ió /càrrega del ió

MALDI: desorció/ionització làser assistida per matriu, de l'anglès *Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization*.

MeSH: de l'anglès *Medical Subject Headings*

mpMRI: Ressonància magnètica multiparamètrica, de l'anglès *Multiparametric magnetic resonance imaging*

MRM: *Multiple Reaction Method*

MS: Espectrometria de masses

MSMS: Espectrometria de masses en tàndem

NIST: *National Institute of Standard and Technology*

NTD: domini N-terminal

OMS: Organització Mundial de la Salut

ON: Òxid Nítric

PCA3: Gen de càncer de pròstata 3, de l'anglès *Prostate cancer gene 3*

PIRADS: *Prostate Imaging-Reporting and Data System*

PHI: Índex de Salut de la Pròstata, de l'anglès *Prostate Health Index*

PLCO: de l'anglès *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian*

POMC: Proopiomelanocortina

PR: Prostatectomia radical

PRIMA: de l'anglès *Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-analyses*

PSA: Antigen prostàtic específic

PSA II: PSA lliure, antigen prostàtic específic no unit a proteïnes

PSA II/t: Quocient PSA lliure/PSA total

QoL: Qualitat de vida

R<sup>2</sup>: coeficient de determinació de la corba de calibració

RIA: Radioimmunoanàlisi

RNA: àcid ribonucleic, de l'anglès *deoxyribonucleic acid*

RTU: Resecció transuretral

SD: Desviació Estàndard

SHBG: Globulina transportadora d'hormones sexuals de l'anglès *Sex Hormone Binding Globulin*

SNC: Sistema Nerviós Central

TBP: Proteïna d'unió a la caixa TATA, de l'anglès *TATA-box protein*

TFIIF: Factor de transcripció IIF, de l'anglès *transcription factor IIF*

TNM: Tumor primari (T), ganglis limfàtics regionals (N), metàstasis (M)

TR: Tacte rectal

TSH: Tirotropina, de l'anglès *Thyroid-Stimulating Hormone*

UICC: International Union Cancer Control

UPLC: Cromatografia líquida d'alta i ràpida eficiència, de l'anglès *Ultra Performance Liquid Chromatography*

## ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1: Taxa d'incidència de CaP estandarditzada per edat, per països

Figura 2: Taxa de mortalitat de CaP estandarditzada per edat, per països

Figura 3: Taxa d'incidència de CaP ajustada per edat a Espanya de 1975 a 2004

Figura 4: Estructura química de la testosterona

Figura 5: Control de l'eix hipotàlem-hipòfisi-testicles

Figura 6: Síntesis suprarenal d'andrògens

Figura 7: Vies alternatives per a la síntesis de DHT

Figura 8: Metabolisme de la testosterona

Figura 9: Estructura del gen del receptor d'andrògens i de la proteïna AR

Figura 10: Mecanisme d'acció dels andrògens

Figura 11: Esquema del funcionament d'un espectròmetre de masses

Figura 12: Diagrama de flux del procés de cerca i selecció d'estudis

Figura 13: Exemple de cromatograma obtingut pel mètode de LCMSMS

Figura 14: Comportament de la concentració de testosterona, segons l'equip de mesura, (a) diagrama de dispersió amb línia de regressió, (b) diagrama de caixa de la concentració de testosterona als dos equips.

Figura 15: Histograma de la distribució de la concentració de testosterona mesurada (A) Advia Centaur®XP i (B) LC-MSMS.

Figura 16: Diagrama de caixa de la concentració de testosterona mesurada Advia Centaur®XP i LC-MSMS.

Figura 17: Diagrama mostrant el percentatge de variació de la concentració de testosterona mesurada per IA comparada amb la mesurada per LC-MSMS.

Figura 18: Corbes ROC de la concentració de LH i testosterona en sèrum segons l'activitat de l'anàleg; (a) incloent pacients "Off" i "No anàlegs LHRH" i (b) incloent només pacients "Off".

Figura 19: Corba ROC de la concentració de LH i testosterona en sèrum mesurada per IA o LC-MSMS, segons si estan en tractament amb l'anàleg de la LHRH.

## ÍNDEX DE TAULES

Taula 1: Classificació TNM

Taula 2: Grups de risc per a recidiva bioquímica del CaP localitzat i localment avançat

Taula 3: Classificació de l'*International Society for Urological Psychology* 2014

Taula 4: Risc de CaP en relació a valors baixos de PSA

Taula 5: Guia pel tractament del CaP metastàtic

Taula 6: Distribució de la concentració de testosterona per ambdós mètodes segons els intervals de concentració

Taula 7: Concentració de LH i testosterona mesurada per LCMSMS segons el grup de tractament amb l'anàleg LHRH

Taula 8: Bondat diagnòstica de la concentració de castració de LH i la concentració de testosterona, mesurada per IA i LC-MSMS, per a diferenciar pacients amb CaP "On anàlegs LHRH" dels "Off anàlegs LHRH a la cohort de validació"

Taula 9: Concentració de testosterona per LC-MSMS i quimioluminescència segons els intervals de concentració de LH



# 1 INTRODUCCIÓ

## 1.1 INTRODUCCIÓ AL CÀNCER DE PRÒSTATA

### 1.1.1 Epidemiologia

#### 1.1.1.1 Incidència i mortalitat de càncer de pròstata en l'actualitat

El càncer de pròstata (CaP) és el tumor maligne més freqüentment diagnosticat entre homes dels països industrialitzats<sup>1</sup>. Representa la segona causa de càncer en l'home a nivell mundial, i el quarta si tenim en compte tota la població. S'estima que a l'any 2018 es van diagnosticar 1.276.106 casos nous i es van registrar 358.989 morts per aquesta causa<sup>2,3</sup>. S'estima que al 2020 continua sent la el càncer més freqüentment diagnosticat en homes i la tercera causa de mort<sup>4</sup>. La incidència i la taxa de mortalitat per CaP estandarditzada per edat per països al 2018 es mostra a la figura 1 i a la figura 2 respectivament.

Figura 1: Taxa d'incidència de CaP estandarditzada per edat, per països<sup>5</sup>.

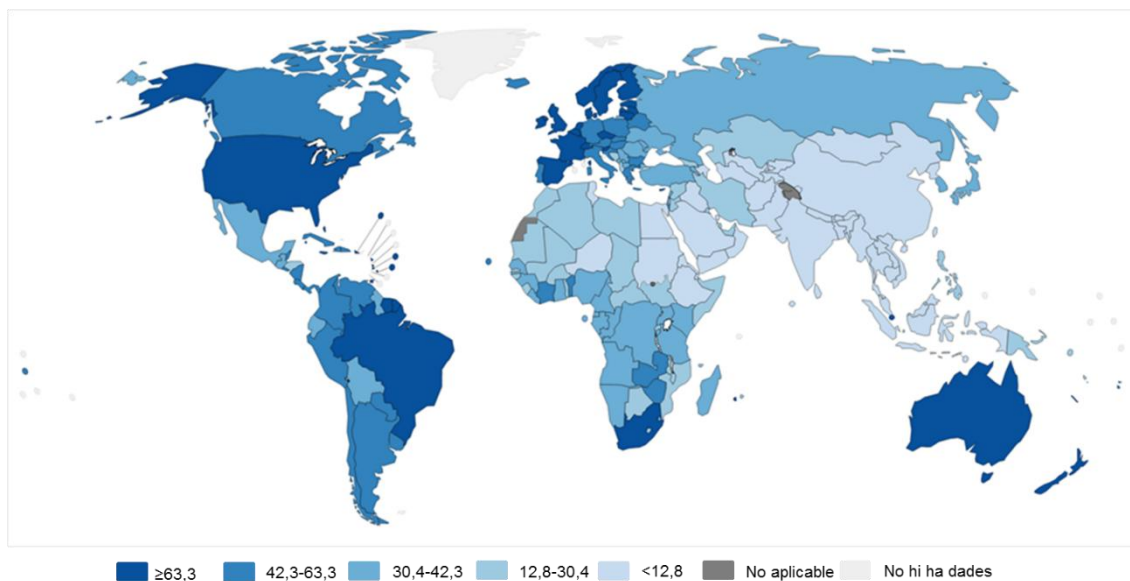
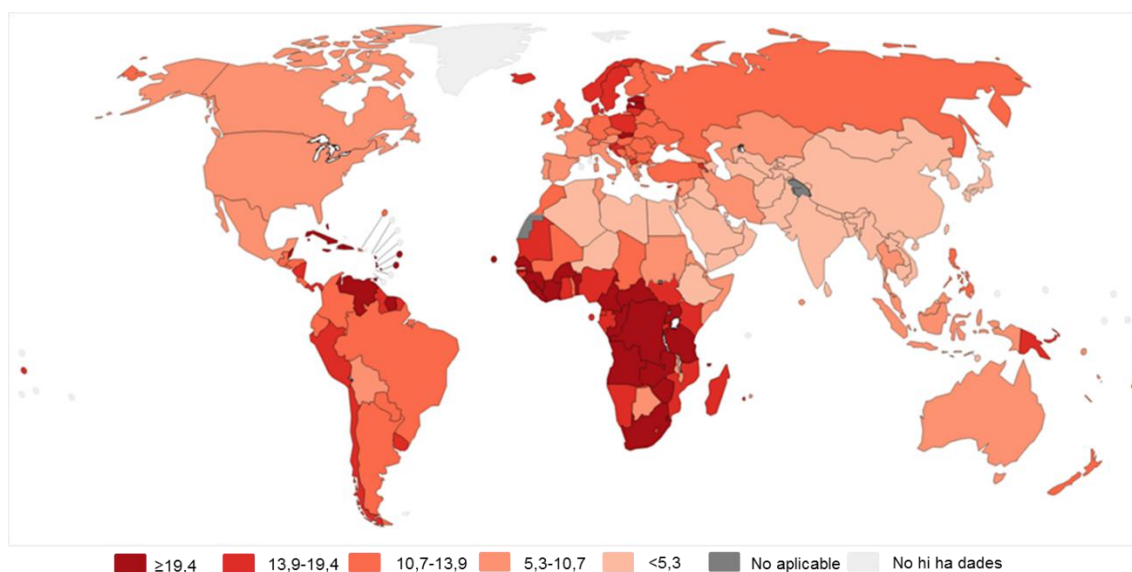


Figura 2: Taxa de mortalitat de CaP estandarditzada per edat, per països<sup>5</sup>.



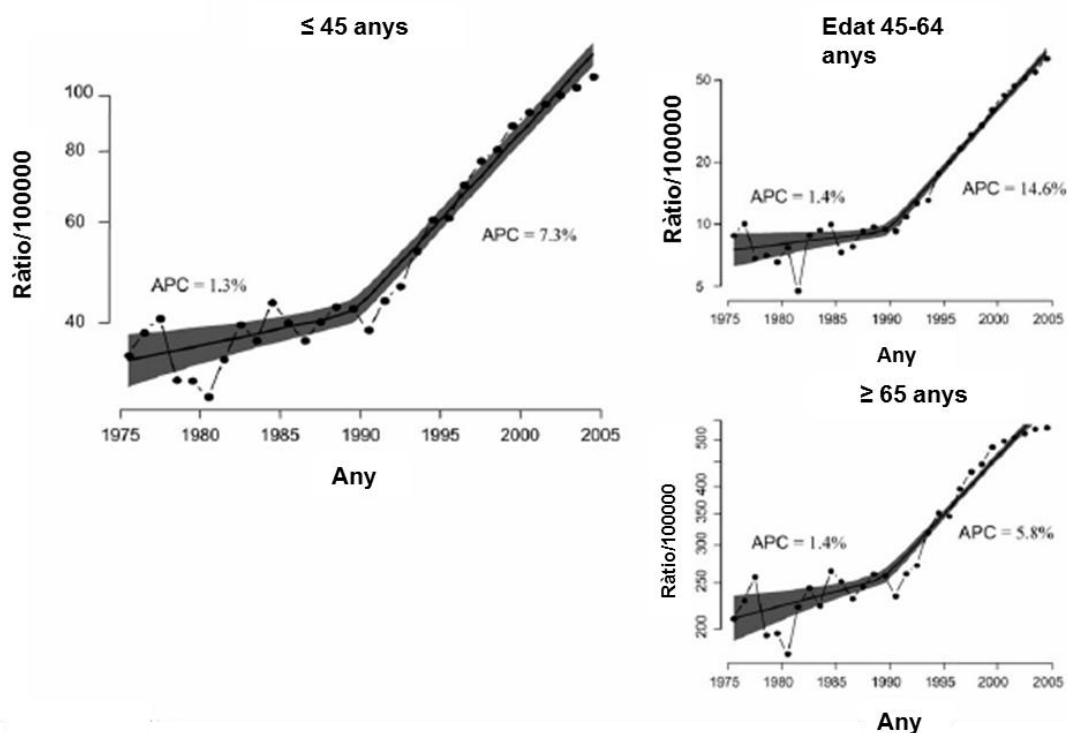
El CaP representa quasi el 70% dels casos en països desenvolupats. Les taxes d'incidència són més altes a Austràlia / Nova Zelanda i Amèrica del Nord (taxes estandarditzades per edat de 111,6 i 97,2 per 100.000, respectivament), i en Europa Occidental i Septentrional, degut a l'ús de l'antigen prostàtic específic pel diagnòstic (PSA). Les taxes segueixen sent baixes en poblacions asiàtiques amb taxes estimades de 10,5 i 4,5 a l'est i sud d'Àsia Central. En canvi, les taxes de mortalitat no varien tant en el món (3 a 30 per 100.000), sent la taxa superior en països en vies de desenvolupament<sup>6,7</sup>.

#### 1.1.1.2 Incidència i mortalitat de càncer de pròstata: evolució històrica

La incidència de CaP des de 1992 fins 2014 ha anat disminuint progressivament. Durant els anys 80 y 90 es va produir un notable augment en el número de casos nous, com a conseqüència de la introducció i generalització d'ús de l'antigen prostàtic específic (PSA) pel diagnòstic<sup>8,9</sup>. A partir del 2004 el patró d'evolució varia en funció de l'edat: mentre que el percentatge d'augment va ser baix pels dos grups d'edat (el grup entre 45 i 64 anys i el de superior a 65 anys) fins a 1990, seguidament va produir-se un augment més pronunciat en ambdós grups i en homes més joves (en particular de 45-65 anys), amb una disminució que només es va observar en els grups de 80-84 i més de 85 anys (veure figura 3).



Figura 3: Taxa d'incidència de CaP ajustada per edat a Espanya de 1975 a 2004<sup>8</sup>.



Respecte a la mortalitat per CaP, s'ha observat una evolució similar a la incidència, observant-se un descens des dels anys 90 d'una taxa de 39 per 100.000 homes a una taxa de 19 per cada 100.000 homes al 2017.

Dos tipus de factors explicarien les tendències temporals de la incidència i mortalitat del CaP. Per una banda, l'augment real degut a una major exposició a un o més factors de risc<sup>10</sup> (síndrome metabòlic<sup>11,12</sup>, diabetis<sup>13</sup>, colesterol<sup>14</sup> o obesitat<sup>15,16</sup>)<sup>17</sup> per altra banda, un augment en la detecció de tumors degut a la introducció de noves tecnologies diagnòstiques i terapèutiques com la mesura de l'antigen prostàtic específic (PSA) i la prostatectomia radical<sup>18</sup>.

A Espanya la supervivència relativa a 5 anys dels pacients diagnosticats durant el període 2000-2007 va ser del 84,6%, la més elevada entre els tumors més freqüents<sup>18,19</sup> mentre que en el període 1995-1999 va ser del 75,4%<sup>18</sup>. Aquest increment és el més elevat entre els tumors més freqüents i és degut principalment a la inclusió d'un elevat nombre de casos de tumors de bon pronòstic com a conseqüència de l'ús del PSA<sup>20</sup>. Aquest motiu també justifica que aquest càncer presenti una prevalença més elevada en homes.

Respecte a la previsió d'incidència als propers anys, s'estima que al 2018 hi ha hagut 1.276.106 nous casos de CaP al món<sup>3</sup>.

L'estimació de la incidència de CaP a Espanya per l'any 2014<sup>18</sup> està subjecta a una gran dificultat ja que podria està influenciada per l'ús del PSA.

Per interpretar correctament les tendències temporals de la incidència i mortalitat del CaP, hem de considerar dos factors<sup>8</sup>. En primer lloc hi pot haver un augment real de la incidència degut a un augment de la exposició a factors de risc i en segon lloc hi ha una major detecció pel PSA.

### **1.1.2 Classificació i estratificació del càncer de pròstata**

L'estratificació del CaP es regeix pel sistema TNM de la UICC (*International Union Cancer Control*), que té en compte la mida i extensió del tumor primari (T); la presència o absència d'afectació adenopàtica regional (N); i l'existència o no de metàstasis a distància (M). La classificació TNM del CaP<sup>21</sup> es reflexa de forma abreviada a la taula 1 i la classificació del CaP localitzat i localment avançat de la EAU, en grups de risc, de la *European Association of Urology*, basada en el sistema de classificació de D'Amico<sup>22</sup> a la taula 2.

Taula 1: Classificació TNM<sup>17</sup>.

<b>T-Tumor primari</b>	
<b>TX</b>	No es pot avaluar el tumor primari
<b>T0</b>	No hi ha evidència de tumor primari
<b>T1</b>	Tumor clínicament inaparent no palpable
<b>T1a</b>	El tumor és una troballa histològica fortuïta en el 5% o menys del teixit ressecat
<b>T1b</b>	El tumor és una troballa histològica fortuïta en més del 5% del teixit ressecat
<b>T1c</b>	Tumor identificat en una biòpsia per punció (per exemple, degut a una concentració elevada d'antigen prostàtic específic (PSA))
<b>T2</b>	Tumor que és palpable i confinat dins de la pròstata
<b>T2a</b>	El tumor afecta a la meitat d'un lòbul o menys
<b>T2b</b>	El tumor afecta a més de la meitat d'un lòbul, però no als dos lòbuls
<b>T2c</b>	El tumor afecta als dos lòbuls
<b>T3</b>	El tumor s'estén a través de la càpsula prostàtica
<b>T3a</b>	Extensió extracapsular (uni o bilateral)
<b>T3b</b>	El tumor envaeix una o ambdues vesícules seminals
<b>T4</b>	El tumor està fix o envaeix estructures adjacents diferents de les vesícules seminals: esfínter extern, recte, músculs elevadors o paret de la pelvis
<b>N-Ganglis limfàtics regionals</b>	
<b>NX</b>	No es poden avaluar els ganglis limfàtics regionals
<b>N0</b>	Absència de metàstasis ganglionars regionals
<b>N1</b>	Metàstasis ganglionars regionals
<b>M-Metàstasis a distància</b>	
<b>M0</b>	Absència de metàstasis a distància
<b>M1</b>	Metàstasis a distància
<b>M1a</b>	Ganglis limfàtics no regionals
<b>M1b</b>	Ossos
<b>M1c</b>	Altres focus

Taula 2: Grups de risc per a recidiva bioquímica del CaP localitzat i localment avançat<sup>17</sup>.

<b>Definició</b>			
<b>Baix risc</b>	<b>Risc entremig</b>	<b>Alt risc</b>	
PSA < 10 ng/mL i Gleason < 7 (ISUP grau 1) i cT1-2a	PSA 10-20 ng/mL o Gleason 7 (ISUP grau 2/3) o cT2b	PSA >20 ng/mL i Gleason > 7 (ISUP grau 4/5) i cT2c	Qualsevol PSA qualsevol Gleason (qualsevol grau ISUP)cT3-4 o cN+
Localitzat		Localment avançada	

ISUP: *International Society for Urological Pathology*

### 1.1.2.1 Puntuació Gleason i grup de grau de la *International Society for Urological Pathology 2014*

La puntuació Gleason és un sistema per a graduar l'adenocarcinoma de pròstata, introduït per Donald Gleason al 1974<sup>23</sup>. Només es pot avaluar amb material de biòpsia i no han d'utilitzar-se preparacions citològiques. La puntuació Gleason és la suma dels dos patrons més freqüents (grau 1 a 5) de creixement tumoral observats i oscil·la entre 2 i 10, sent 2 el menys agressiu i 10 el més agressiu. En la biòpsia per punció, es recomana incloure sempre el grau més alt, encara que sigui menys del 5% del material de la biòpsia<sup>24,25</sup>.

La *International Society for Urological Pathology* (ISUP) de 2005<sup>26,27</sup> va modificar la puntuació Gleason incloent el patró més extens detectat per biòpsia, més el segon patró més comú, si n'hi ha dos de presents. Si hi ha un patró present, s'ha de duplicar per obtenir la puntuació Gleason. Per a tres graus, la puntuació Gleason de la biòpsia comprèn el grau més comú més el grau més alt, independentment de la seva extensió. A més d'informar sobre les característiques del carcinoma per a cada biòpsia, es pot proporcionar una puntuació Gleason general basada en les biòpsies de carcinoma positius. Aquesta puntuació general té en compte l'extensió de cada grau de totes les biòpsies de pròstata.

La ISUP va aprovar el 2014 un nou sistema de classificació basat en el grau de Gleason<sup>26</sup> que limita el número de classificacions de CaP a 5 (veure taula 3) per:

1. Alinear la classificació de CaP amb la classificació d'altres carcinomes.
2. Eliminar les puntuacions inferiors a 6 que ja no es consideraven càncer.
3. Definir millor la diferenciació clínicament significativa entre la puntuació Gleason 7 (3+4) i 7 (4+3).

Taula 3: Classificació de *International Society for Urological Pathology 2014*<sup>17</sup>.

Puntuació Gleason	Grau ISUP
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4 o 3+5 o 5+3)	4
9-10	5

### 1.1.3 Diagnòstic del càncer de pròstata

La majoria dels CaP no són clínicament evidents. A més, molts progressen lentament, de tal manera que és possible que no apareguin símptomes durant la vida de l'home. Per tant, avui en dia és important la detecció precoç del CaP clínicament significatiu i probablement reduir la detecció de Cap insignificants o indolents. La detecció del CaP té com objectiu la reducció de la seva mortalitat i el manteniment de la qualitat de vida, expressada en anys de vida ajustat per qualitat (AVAC). La sospita del CaP es realitza a través del tacte rectal i la mesura del PSA. Una vegada es confirma la sospita serà a través de la biòpsia prostàtica que s'establirà el diagnòstic amb certesa. Actualment existeix controvèrsia respecte a l'eficàcia del cribratge de CaP. L'estudi aleatoritzat europeu del cribratge del càncer de pròstata (ERSPC)<sup>28</sup> va observar una reducció significativa de la mortalitat per CaP del 21% en la cohort en la que es va utilitzar la mesura del PSA, mentre que als EEUU l'estudi del cribratge de càncer (PLCO, de l'anglès *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian*)<sup>29</sup> no va observar diferències significatives en la mortalitat per CaP. Les diferències en la selecció de les poblacions i els diferents protocols, incloent les diferències en el cribratge previ a l'anàlisi, la recepció de les biòpsies, i molt especialment la contaminació del grup control del PLCO, poden ser les principals causes de les diferències observades entre els dos estudis<sup>30</sup>. Recentment s'han actualitzat les dades de l'estudi *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC)*<sup>31</sup> corroborant els resultats anteriors de que la detecció del CaP amb la mesura del PSA redueix la mortalitat per CaP.

Si bé el cribratge mitjançant la mesura del PSA pot comportar un elevat risc de sobre-diagnòstic, falsos positius i complicacions derivades de la biòpsia, la evidència suggereix el seu benefici a llarg termini reduint la mortalitat per CaP<sup>32,33</sup>.

Les guies de la EAU recomanen el cribratge del CaP amb la mesura de PSA a pacients de risc de CaP<sup>17</sup>, que són:

- Homes de més de 50 anys d'edat.
- Homes de més de 40 anys d'edat i antecedents familiars de CaP.
- Homes de ascendència africana de més de 45 anys d'edat.
- Homes portadors de mutacions BRCA2 de més de 40 anys d'edat.

Les principals eines diagnòstiques per sospitar de CaP són el tacte rectal (TR) i la determinació sèrica de PSA. La major part dels CaP es localitzen a la zona perifèrica i poden detectar-se mitjançant TR quan el volum és d'aproximadament 0,2 mL o més. Al voltant del 18% de tots els pacients es detecta CaP a partir d'un TR sospitós aïllat, independentment del valor de PSA. L'antigen prostàtic específic (PSA) és una serin proteasa que produeixen quasi exclusivament les cèl·lules epitelials de la pròstata mitjançant un procés que ve afavorit per l'acció dels andrògens, sent una proteïna específica d'òrgan, el que comporta que es pugui elevar en presència d'hipertrofia benigna de pròstata (HBP), prostatitis i altres malalties no malignes; no és específic de tumor (baixa especificitat diagnòstica)<sup>17</sup>.

El risc de patir CaP augmenta a mesura que augmenta la concentració de PSA. A la taula 4 es presenta el risc de CaP a valors baixos de PSA. Molts homes poden presentar CaP tot i tenir concentracions baixes de PSA<sup>17</sup>.

Taula 4: Risc de CaP en relació a valors baixos de PSA<sup>17</sup>.

PSA (ng/mL)	Risc de CaP (%)	Risc de Gleason $\geq 7$ CaP (%)
0,0-0,5	6,6	0,8
0,6-1,0	10,1	1,0
1,1-2,0	17,0	2,0
2,1-3,0	23,9	4,6
3,1-4,0	26,9	6,7

Aquestes dades mostren la importància d'establir el valor discriminant de la concentració de PSA, evitant la detecció de CaP insignificants que per la seva evolució natural tingui poques probabilitats de ser potencialment mortal.

L'ús del PSA com a marcador de CaP va revolucionar el seu diagnòstic<sup>34</sup>. La seva utilització en el CaP és un fet clau en el maneig d'aquest tumor<sup>35</sup>. La mesura de la concentració de PSA actualment es realitza mitjançant immunoanàlisi. L'any 1999 l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va establir el material de referència 96/670 com a material de referència certificat per als mesuraments de la concentració de PSA, després que la Segona Conferència d'Estandardització de Stanford, celebrada al 1994, va recomanar que l'esmentat material tingués una proporció 90:10 de PSA unit i PSA lliure, respectivament<sup>35</sup>. Aquest material havia de permetre superar els problemes derivats de la resposta no equimolar d'alguns procediments de mesura que, en

mesurar inadequadament la concentració de PSA total comportaven resultats falsament per sobre o per sota del valor discriminant.

Progressivament els diferents fabricants han anat substituint el seu propi calibrador per calibradors traçables al material de referència de la OMS. La introducció de l'estàndard de l'OMS comporta la necessitat d'ajustar el valor discriminant de PSA i de considerar la variabilitat en la concentració mesurada d'aquest marcador en relació a l'ús de diferents procediments de mesura. Així, el valor discriminant per a la concentració de PSA ha de ser ajustat en cada centre segons el sistema de mesura utilitzat.

A la pràctica clínica, per diferència HBP de CaP s'utilitza el quocient PSA lliure/PSA total (PSA lliure/t) que permet estratificar el risc de CaP en homes amb una concentració de PSA total entre 4 i 10 ng/mL i amb TR negatiu. Només el 8% dels pacients amb PSA lliure/t superior a 0,25 es van identificar CaP en la biòpsia<sup>36</sup>.

En els últims anys, diversos estudis han definit la tendència a sobrediagnosticar el CaP que ha donat lloc a l'important nombre de tumors indolents que es diagnostiquen sense que signifiquin cap risc pel pacient. Aquesta tendència es relaciona en bona part amb la introducció de la mesura del PSA en la detecció del tumor i augmenta en relació a l'elecció de valor discriminants cada vegada més baixos.

Els problemes que en deriven han impulsat el desenvolupament de protocols de vigilància activa per reservar el tractament únicament a aquells pacients que, per l'agressivitat del tumor, ho necessitin<sup>35</sup>.

Actualment existeixen altres marcadors pel diagnòstic. En concret estan disponibles varius procediments de mesura que mesuren cal·licreïnes en sèrum, com són l'Índex de Salut de la Pròstata (PHI) que combina la mesura de PSA lliure i total i la isoforma (-2)-proPSA, i la prova de puntuació de quatre cal·licreïnes (4K). En orina, la mesura del microARN no codificant del gen de càncer de pròstata 3 (PCA3) després de massatge prostàtic està indicat per determinar si cal repetir biòpsia després d'una biòpsia inicial negativa<sup>17</sup>, tot i presentar eficàcia clínica incerta.

La biòpsia de pròstata és la prova que permet confirmar el diagnòstic de CaP. La necessitat d'una biòpsia de pròstata ha de determinar-se en funció de la concentració de PSA, un TR sospitós o ambdós. També cal tenir en compte l'edat del pacient, possibles malalties concomitants i les conseqüències terapèutiques<sup>37</sup>. Un valor elevat de PSA hauria de comprovar-se passades unes setmanes en condicions pre-

analítiques normalitzades, és a dir, sense ejaculació ni manipulació i sense infecció urinària<sup>38,39</sup>.

La ultrasonografia transrectal de pròstata permet una mesura adequada del volum prostàtic, però tradicionalment no ha pogut demostrar lesions per a localitzar el CaP. Així, la forma tradicional de biopsiar ha estat amb assistència ecogràfica per a fer una presa sistematitzada de mostres. Els esquemes més recents de biòpsies sistemàtiques recomanen la presa de 12 punçons de les parts més perifèriques de ambdós lòbuls prostàtics<sup>40,41</sup>.

La prova d'imatge de ressonància magnètica multiparamètrica (mpMRI) ha estat introduïda recentment en el diagnòstic precoç del CaP i ha representat una gran evolució, millorant l'eficàcia del diagnòstic precoç del CaP significatiu (csCaP). La mpMRI proveeix la possibilitat de detectar lesions amb una probabilitat progressiva d'allotjar csCaP. El PIRADS (*Prostate Imaging-Reporting and Data System*) és una puntuació que oscil·la entre 1 i 5 i permet ubicar en certes àrees prostàtiques lesions amb baixa-moderada-alta-molt alta sospita de csCaP<sup>42</sup>. De la mà d'aquest avanç s'han desenvolupat sistemes per realitzar biòpsies dirigides a aquestes zones de sospita, de manera que es poden realitzar aquestes biòpsies dirigides amb la RM "in bore". No obstant, aquest és un sistema car i que requereix molt temps de màquina pel que s'han difós sistemes de fusió cognitiva amb software que fusiona les imatges de la RM amb les d'ecografia. Inclòs certs prototips permeten la direcció de l'agulla mitjançant sistemes pseudorobòtics o guiats amb geolocalització.

La biòpsia prostàtica actual combina les biòpsies dirigides a zones de sospita amb la biòpsia sistemàtica ja que s'ha evidenciat la complementarietat d'ambdós esquemes de biòpsia. D'aquesta manera s'ha millorat els programes de diagnòstic precoç, evitant biòpsies innecessàries quan la mpMRI és negativa o amb molt baixa sospita (PIRADS <3) i la sobredetecció de CaP no significatiu, a més d'incrementar-se la sensibilitat pels csCaP<sup>17</sup>.

#### **1.1.4 Tractament del càncer de pròstata**

El tractament del CaP depèn del seu estadi clínic, basant-se el tractament local en cirurgia o radioteràpia i el tractament de la disseminació en la supressió androgènica (ADT). A principis dels anys 2000 es va demostrar que la hormonoteràpia neoadjuvant a la radioteràpia incrementa la supervivència dels pacients tractats amb radioteràpia<sup>43-47</sup>.



Actualment s'accepta la indicació de la supressió androgènica en pacients tractats amb radioteràpia, amb una durada que pot oscil·lar entre 6 i 36 mesos segons el seu risc i en tumors disseminats.

La ADT es basa fonamentalment en la castració, que pot ser quirúrgica o mèdica, majoritàriament amb anàlegs de la LHRH i també amb antagonistes de la LHRH. La castració basada en l'administració d'estrògens està en desús pels efectes cardiovasculars que produeix<sup>48-50</sup>.

Els agonistes de l'hormona alliberadora d'hormones luteïnitzant s'han convertit en el tractament d'elecció en la teràpia hormonal. Aquesta teràpia presenta l'avantatge que evita les molèsties físiques i psicològiques associades a l'orquiectomia, tenen menor risc de toxicitat que l'observat amb estrògens, i donen com a resultat una eficàcia oncològica equivalent. Els anàlegs de la LHRH s'administren com a injeccions *depot* en pautes de cada 1, 2, 3 o 6 mesos o anualment<sup>17</sup>. A diferència dels agonistes, els antagonistes de la LHRH comporten una disminució ràpida de la concentració de l'hormona luteïnitzant, de la hormona fol·liculoestimulant i de la testosterona, al unir-se als receptors de la LHRH. Aquesta ràpida i efectiva castració ha resultat un paper important dels antagonistes de la LHRH. No obstant, la superioritat sobre els agonistes de LHRH no s'ha demostrat, i la falta de formulació *depot* d'acció perllongada els fa menys pràctics que els agonistes.

Es pot aconseguir un bloqueig androgènic major amb l'administració d'antiandrògens clàssics com ara bicalutamida, tot i que aquest tipus de bloqueig presenten una discreta eficàcia i no comporta una millora de més del 5% de la supervivència dels pacients amb tumors disseminats<sup>51-53</sup>.

Finalment, s'ha observat als últims anys com l'administració de quimioteràpia basada en el docetaxel en càncer hormono-sensibles disseminats millora la seva supervivència quan presenten una càrrega tumoral alta<sup>54</sup>, de la mateixa manera que recentment s'ha observat amb l'administració associada a castració d'acetat de abiraterona<sup>55-57</sup> i enzalutamida<sup>58-60</sup>.

En pacients amb CaP hormono-sensible metastàtic, el tractament d'elecció és la ADT. La taula 5 mostra la guia pel tractament de CaP metastàtic.

Taula 5: Guia pel tractament del CaP metastàtic<sup>17</sup>.

Recomanació	Qualificació
Oferir tractament sistemàtic immediat amb ADT per pal·liar els símptomes i reduir el risc de seqüeles potencialment greus de malaltia avançada (compressió de medul·la espinal, fractures patològiques, obstrucció uretral) a pacients simptomàtics M1	Força
Oferir antagonistes de la LHRH, especialment a pacients amb una imminent compressió de la medul·la o obstrucció de la bufeta.	Dèbil
Oferir cirurgia i/o radioteràpia local a qualsevol pacients amb malaltia M1 i evidències de complicacions imminents com ara compressió de medul·la o fractura patològica	Força
Oferir tractament sistèmic immediat també als pacients M1 asimptomàtics	Dèbil
Discutir la ADT diferida en pacients M1 ben informats que no es mostren asimptomàtics, ja que redueix els efectes secundaris relacionats amb el tractament, sempre que el pacient estigui monitoritzat	Dèbil
Oferir l'administració a curt termini d'un antagonista del receptor androgènic d'antiga generació a pacients amb M1 que inicien un agonista de la LHRH per reduir el risc del fenomen de brot	Dèbil
No oferir monoteràpia amb antagonistes del receptor androgènic a pacients amb malaltia M1	Força
Oferir ADT combinada amb quimioteràpia (docetaxel) a pacients que tinguin com a primera presentació la malaltia M1 i que són aptes per Docetaxel	Força
Oferir ADT combinada amb acetat de abiraterona més prednisona o apalutamida o enzalutamida a pacient que tinguin com a primera presentació la malaltia M1 i que estiguin en forma per tractament	Força
Oferir ADT combinada amb radioteràpia de pròstata a pacients que tinguin com a primera presentació la malaltia M1 i que tinguin un baix volum de malaltia segons els criteris CHARTED	Força
No oferir ADT combinada amb cap tractament local (radioteràpia/cirurgia) a pacients amb malaltia d'alt volum (criteris CHAARED) M1 fora d'assaigs clínics (excepte per control de símptomes)	Força

### 1.1.5 Control de la supressió androgènica

El seguiment dels pacients amb CaP avançat o disseminat amb tractament hormonal té per objectiu controlar la resposta al tractament, assegurar el seu compliment, avaluar els efectes secundaris i identificar el desenvolupament de la resistència a la castració (CRPC)<sup>61</sup>.

El seguiment clínic i no només el bioquímic és important realitzar-lo periòdicament, de manera especial en situacions de metàstasi per a detectar els primers signes de compressió de la medul·la espinal, complicacions obstructives del tracte urinari o lesions òssies que suposen un risc més elevat de fractura.

La mesura de la concentració de PSA és un bon marcador pel seguiment del CaP sensible a andrògens i pot utilitzar-se per avaluar la resposta al tractament mitjançant la variació de la concentració de PSA.

La mesura de la concentració de testosterona en sèrum també ha de realitzar-se en la pràctica clínica del seguiment dels pacients amb CaP tractat amb anàlegs de la LHRH. Tot i que no està establert el període de temps en el que s'ha de realitzar, es recomana mesurar-la als 3-6 mesos per avaluar l'efectivitat del tractament i assegurar que s'aconsegueix la concentració de castració<sup>17</sup>. En pacient amb PSA creixent i/o progressió clínica, s'ha de mesurar la concentració de testosterona per a confirmar un estat resistent a la castració.

En els pacients en que s'observi una progressió bioquímica o clínica de la malaltia hem de diagnosticar l'estat de resistència a la castració.

Segons la EAU-ESTRO-SIOG *Guidelines on Prostate Cancer 2020*<sup>17</sup> el càncer de pròstata resistent a la castració es defineix per concentració sèrica de testosterona de castració <50 ng/dL o <1,7nmol/L, que garanteix una adequada castració, més un dels següents criteris de progressió:

- Progressió bioquímica: tres augments consecutius del PSA, amb una setmana de diferència, que donen lloc a increments del 50% respecte al nadir, amb un PSA>2 ng/mL.
- Progressió radiològica: aparició de noves lesions: aparició de dos o més lesions en l'exploració òssia o lesions de teixits tous utilitzant els criteris d'avaluació de resposta en tumors sòlids.

## **1.2 HORMONA ANDROGÈNICA: TESTOSTERONA**

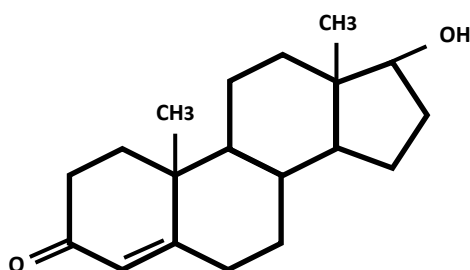
Els andrògens actuen fisiològicament a les cèl·lules prostàtiques estimulant el seu creixement, funció i proliferació. La testosterona, tot i no ser oncogènica, és essencial pel creixement i perpetuació de les cèl·lules tumorals del CaP. Com ha quedat reflectit anteriorment, la quantificació de la concentració de testosterona en sèrum durant el tractament és important durant el seguiment dels pacients per a avaluar l'eficàcia de la supressió androgènica i pel diagnòstic de la resistència a la castració, mentre que es disposa d'informació limitada respecte a la concentració òptima de testosterona durant el tractament amb ADT.

A continuació es descriuran els aspectes bioquímics i del metabolisme dels andrògens.

### 1.2.1 Formulació química

La testosterona és una hormona sexual del grup dels andrògens i molecularment és un esteroide, derivat del ciclopentaperhidrofenentè, que conté quatre anells, amb un total de 19 àtoms de carboni (C), un doble enllaç entre el carboni 4 (C4) i el 5 (C5), un àtom d'oxigen al carboni 3 (C3) i un radical hidroxil (OH) al carboni 12 (C12) (veure figura 4). Aquesta estructura és necessària pel manteniment de l'activitat androgènica. La testosterona pot ésser aromatitzada a varis teixits per donar lloc a estradiol (E). El paper de l'E en homes no està clar, però el seu excés pot donar lloc al desenvolupament de caràcters sexuals secundaris femenins com ara ginecomàstia.

Figura 4: Estructura química de la testosterona<sup>62</sup>.



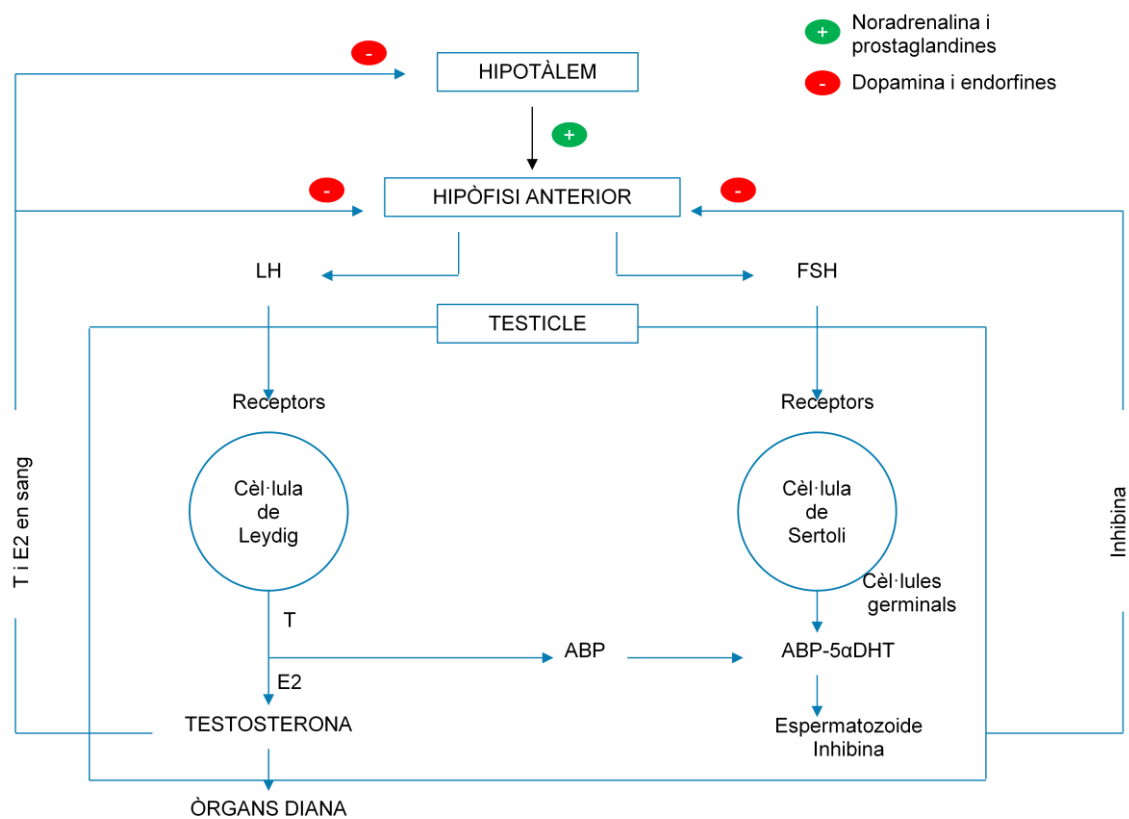
### 1.2.2 Síntesis

En homes, la testosterona és el principal androgen circulant. Més del 95% de la testosterona és secretada per les cèl·lules de Leydig als testicles, mentre que l'escorça suprarenal també contribueix en la seva producció (del 2 al 4%)<sup>63</sup>. La via de síntesis androgènica, els metabòlits i enzims relacionats es descriuen a continuació.

Les cèl·lules de Leydig produeixen testosterona en resposta a l'estímul de la hormona luteïnitzant (LH), l'alliberació de la qual està controlada per l'hormona alliberadora de gonadotropines (GnRH), secretada per l'hipotàlem de forma pulsativa (figura 5).

Els impulsos alfa-adrenèrgics estimulen la secreció de GnRH, la noradrenalina i les prostaglandines augmenten la secreció hipotalàmica. Els impulsos beta-adrenèrgics i dopaminèrgics tenen acció inhibidora de la secreció de GnRH. Les endorfines, la testosterona, la progesterona i la prolactina, secretada en situacions d'estrès, disminueixen la secreció de GnRH.

Figura 5: Control de l'eix hipotàlem-hipòfisi-testicles<sup>64</sup>.



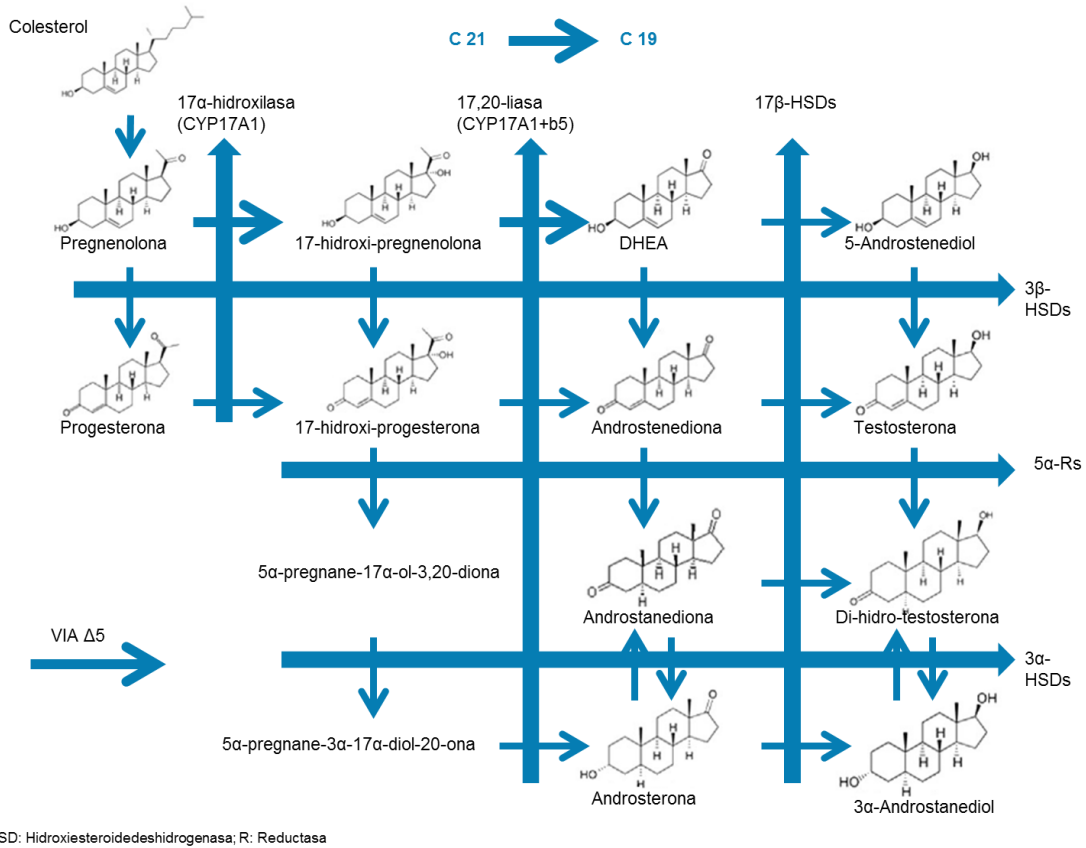
T: Testosterona; E2: Estradiol; DHT: Dihidrotestosterona; ABP: Androgen binding protein

La síntesis de la testosterona (veure figura 6) s'inicia per l'acció de les 17 $\alpha$ -hidroxilases esteroides sobre el colesterol i seguidament per les 17,20-liases esteroides (CYP17A1: Citocrom P450, família 17, subfamília A, polipèptid 1), situades a les membranes del reticle endoplasmàtic de les cèl·lules esteroidogèniques. CYP17A1 catalitza la reacció de 17 $\alpha$ -hidroxilació dels esteroides  $\Delta$ 4-C21 (derivats de la progesterona) i dels esteroides  $\Delta$ 5-C21 (derivats de la pregnenolona). Posteriorment es produeix la reacció de la 17, 20 liasa que formarà els esteroides de 19 carbons (C19), punt clau per a la síntesis d'hormones esteroides, que dóna lloc a la formació de dihidroepiandrosterona (DHEA) i androstendiona. El conjunt d'esteroides de C19 que circulen en sang, inclou el subgrup d'andrògens adrenals (C19 sintetitzats a l'escorça adrenal)<sup>63</sup>.

L'acció dels enzims 17-hidroxisteroid deshidrogenasa sobre els andrògens C19 generarà testosterona. Als teixits diana la testosterona es convertirà per l'acció de l'enzim 5 $\alpha$ -reductasa en dihidrotestosterona (DHT), l'hormona androgènica més activa.

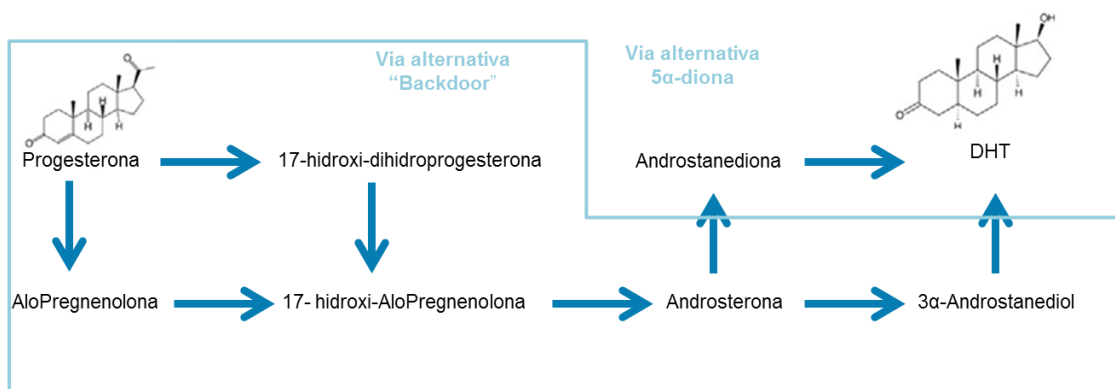
La regulació de la síntesis d'andrògens C19 a l'escorça suprarenal està regulada per l'hormona adrenocorticotropa (ACTH)<sup>63</sup>.

Figura 6: Síntesi suprarenal d'andrògens<sup>63</sup>.



A part de la via clàssica de síntesis d'andrògens a partir del colesterol, hi ha dos vies alternatives per sintetitzar directament DHT<sup>65</sup> (veure figura 7): la via alternativa "del darrera" (de l'anglès *backdoor*) i la via de la 5α-diona, que sintetitzen directament DHT, sense passar per la testosterona.

Figura 7: Vies alternatives per a la síntesis de DHT<sup>65</sup>.



HSD: Hidroxiesteroidedeshidrogenasa

Estudis recents han demostrat que alguns metabòlits derivats de la testosterona, obtinguts per l'acció dels enzims suprarenals CYP11B1, com són la 11-ceto-testosterona i la 11-ceto-5α-dihidrotestosterona, tenen el mateix potencial d'activació de AR, el que planteja la possibilitat d'un paper important d'aquests andrògens en la transmissió de l'acció dels andrògens biològics<sup>65</sup>.

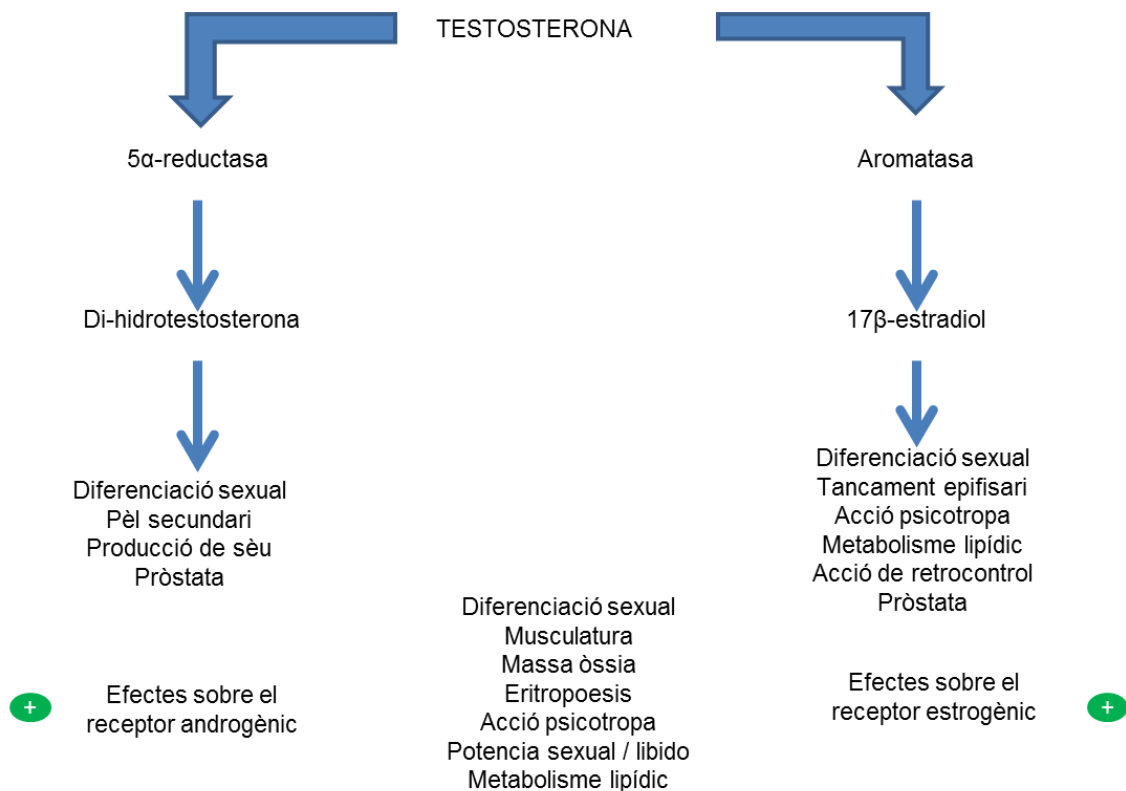
### 1.2.3 Metabolisme

La testosterona lliure difon passivament cap a les cèl·lules diana on seran metabolitzades mitjançant la 5α-reductasa donant lloc a la 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT), i mitjançant l'aromatasa (CYP19A1) donant lloc a 17β-estradiol (figura 8). Existeixen dos isoenzims de la 5α-reductasa, el tipus I que es troba a la pell i fetge, i el tipus II que es troba a la pròstata, glàndula suprarenal, vesícula seminal, pell genital, fol·licle pilós i escorça cerebral.

La majoria de DHT circulant, el 80%, és produïda per la conversió perifèrica de testosterona i el 20% és secretada directament pels testicles<sup>66</sup>.

Tant la testosterona com la DHT es fixen al mateix receptor AR i els seus efectes es complementen entre sí. No obstant, la DHT presenta més afinitat pel receptor, unes 6 a 10 vegades més, pel que és un androgen més potent que la testosterona.

Figura 8: Metabolisme de la testosterona<sup>67</sup>.



#### 1.2.4 Transport

La testosterona és una hormona lipòfila, pel que en sang el 98% circula unida a proteïnes, i només un 2% es troba en forma lliure, sent la biològicament activa. El 60% de la testosterona circulant s'uneix amb elevada afinitat a la globulina transportadora d'hormones sexuals (SHBG)<sup>68</sup>, sintetitzada principalment al fetge. La resta, el 38% de la testosterona, circula unida laxament a l'albumina. Conseqüència d'aquesta baixa afinitat, la testosterona pot alliberar-se fàcilment als capil·lars per entrar a les cèl·lules dels òrgans diana<sup>69,70</sup>.

#### 1.2.5 Excreció

La testosterona i la DHT es desactiven mitjançant un enzim que hidroxila les posicions 6, 7, 15 o 16 i posteriorment es conjuguen, i s'eliminen per orina i per via biliar<sup>71</sup>.



### **1.2.6 Concentració fisiològica**

La concentració fisiològica de testosterona varia segons la fase de la vida sexual masculina: fetal, neonatal, puberal i adult<sup>72</sup>.

La síntesis de testosterona s'inicia durant les primeres setmanes de gestació, i les concentracions sèriques augmenten fins a valors de 300-400 ng/dL i es mantenen durant el segon trimestre. En néixer les concentracions baixen fins al punt que nens i nenes presenten concentracions similars.

La concentració de testosterona augmenta de nou durant la fase neonatal en nens<sup>73</sup> i es manté a concentracions per sota del límit baix de normalitat dels adults, i es manté durant tres o sis mesos fins a disminuir a concentracions baixes a l'any de vida. La concentració de testosterona es mantindrà baixa fins a la pubertat, quan augmenta la concentració gonadotropina i testosterona, i s'arriben a concentracions normals d'adults aproximadament als 17 anys. La concentració de testosterona es mantindrà fins a als 40-50 que comencen a disminuir<sup>72</sup>.

Els valors de referència per a cada interval d'edat dependran de cada laboratori clínic, segons el procediment de mesura utilitzat i segons la població atesa.

### **1.2.7 Accions fisiològiques en homes**

Les accions fisiològiques dels andrògens estan mitjançades a través de la unió de la testosterona i la DHT al seu receptor.

#### **1.2.7.1 Funcions a nivell reproductiu i sexual**

La testosterona exerceix un paper fonamental a nivell sexual sobre el desenvolupament i el manteniment dels caràcters sexuals i sobre el desenvolupament i funcionament de les glàndules sexuals masculines. Com a hormona del desig, els andrògens actuen sobre el sistema nerviós central (SNC), estimulants-lo i mantenint el desig i la motivació sexual. La testosterona és necessària pel funcionament normal del mecanisme d'ejaculació i el manteniment de les ereccions espontànies. Influeix també sobre la resposta erèctil, estimulants l'activitat de l'enzim òxid nítric sintetasa que contribueix en mantenir els nivells adequats d'òxid nítric (ON) al múscul llis dels cossos cavernosos del penis<sup>64</sup>.

### **1.2.7.2 Funcions a nivell metabòlic<sup>65</sup>**

1.2.7.2.1 Teixit adipós i metabolisme lipídic: augmenten la massa magra corporal. Presenten una distribució predominant de grassa androide, amb més teixit adipós visceral i menys subcutani.

1.2.7.2.2 Teixit esquelètic: els andrògens milloren la síntesis de proteïnes del múscul esquelètic, promouen el creixement muscular i afavoreixen la reparació del múscul esquelètic.

1.2.7.2.3 Metabolisme de la glucosa: la concentració de testosterona està directament relacionada amb la sensibilitat a la insulina, ja que exerceix regulació positiva del receptor de la insulina substrat-2, millora l'expressió de GLUT4 així com la senyalització d'insulina intracel·lular, i la utilització de la glucosa a les cèl·lules musculars.

1.2.7.2.4 Estimula la eritropoesis i la producció d'eritropoetina

### **1.2.8 Mecanisme d'acció**

L'acció de la testosterona als humans es produeix mitjançant dos mecanismes principals: l'activació de l'AR i la conversió a estradiol i posterior activació de receptors d'estrògens.

La LH hipofisària estimula la producció de testosterona per les cèl·lules de Leydig, situades a l'interstici testicular, i serà transportada a les cèl·lules del teixit diana on actuaran mitjançant la unió a AR o es reduirà a DHT, la qual s'unirà al mateix receptor AR.

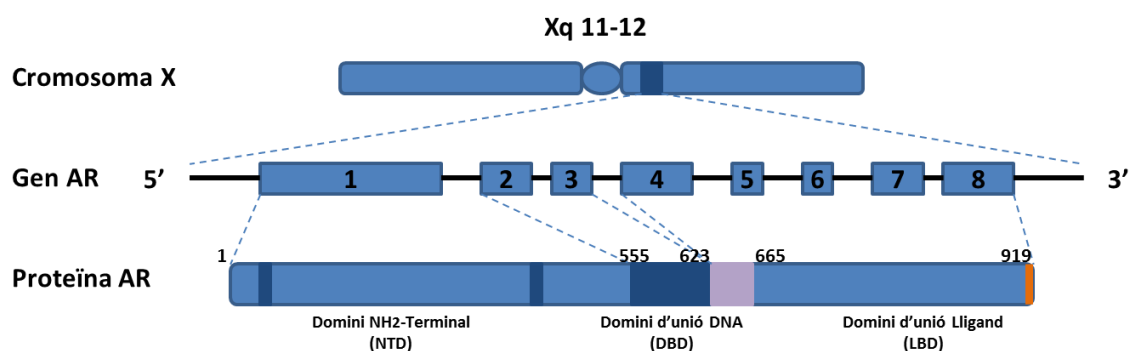
AR és una proteïna que forma part de la família de receptors d'hormones esteroides. És un factor de transcripció dependent de lligand que controla l'expressió de gens específics que pertany a la superfamília de receptor nuclears. La família de receptors nuclears inclou receptors d'hormones esteroides, d'hormones tiroides, d'àcid retinoic, de 1,25-dihidroxitamina D i receptors activats pel proliferador de peroxisoma<sup>74,75</sup>.

El gen AR està localitzat al cromosoma X al locus Xq11-Xq12 i consta de vuit exons (veure figura 9). El gen codifica una proteïna de 110 KDa. De la mateixa manera que la resta de membres de la família de receptors nuclears, l'AR consisteix en tres dominis: el domini N-terminal (NTD) (residus 1-555), el domini d'unió a l'DNA (DBD)

(residus 555-623) i el domini C-terminal d'unió al lligand terminal (LBD) (residus 665-919), unit a DBD per una regió bisagra flexible (residus 623-665)<sup>74,75</sup>.

EL DBD està altament conservat entre els membres de la família de receptor nuclear i uneix l'AR a les regions promotores i potenciadores dels gens regulats per AR mitjançant un enllaç directe al DNA per permetre les funcions d'activació de la NTD i LBD per estimular la transcripció d'aquests gens. La funció d'activació 1 (AF1) a la regió NTD és activa mentre que la funció d'activació 2 (AF2) situada a la regió LBD és dependent de lligand.

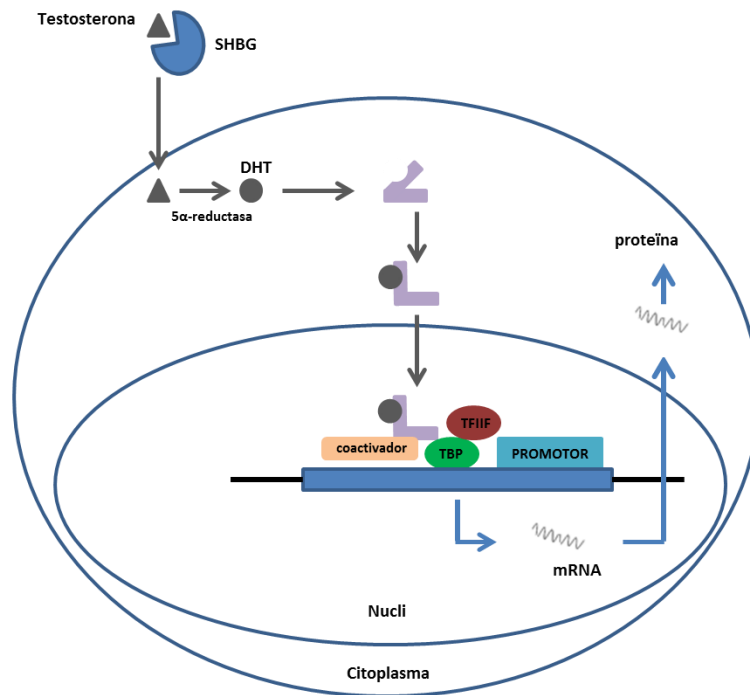
Figura 9: Estructura del gen del receptor d'andrògens i de la proteïna AR<sup>74,75</sup>.



La testosterona travessa lliurement la membrana plasmàtica i entra al citoplasma. La formació del complex AR-testosterona lliure o AR-DHT té lloc al citoplasma de la cèl·lula i va seguida d'una dissociació de les proteïnes, alhora acompanyada d'un canvi conformacional de la proteïna receptora resultant en una translocació al nucli cel·lular. El receptor es dimeritza i s'uneix a seqüències específiques de nucleòtids del DNA cromosòmic anomenades elements de resposta d'hormones (HRE) i recluta altres proteïnes addicionals (com ara coactivadors, factors de transcripció o RNA polimerasa II) que donen lloc a l'activació específica de la transcripció<sup>74</sup>. El mecanisme d'acció dels andrògens s'esquematitza a la figura 10.

En alguns dels principals teixits diana a l'home, com ara els ossos, el cervell, el sistema cardiovascular o la pròstata) el principal efecte de la testosterona és a través de l'aromatització a  $17\beta$ -estradiol, modulada directa o indirectament per lligands del receptor d'estrògens<sup>76</sup>, receptor de la mateixa família que AR, que és un receptor d'hormones nuclears.

Figura 10: Mecanisme d'acció dels andrògens<sup>74,75,77</sup>.



DHT: Dihidrotestosterona; TBP: Proteïna d'unió a la caixa TATA; TFIIIF: Factor de transcripció IIF

#### 1.2.8.1 Via no clàssica

Fa referència a aquells mecanismes que no impliquen la unió del complex testosterona – AR a elements de resposta d'hormones del DNA. Aquest via pot ser mitjançada per diferents mecanismes<sup>77-79</sup>:

- L'AR clàssic intracel·lular a través de l'activació d'un co-regulador com el co-activador del receptor d'esteroides (Src) quinasa que no requereix transcripció gènica.
- Enllaç directe a llocs d'unió específics de molècules diana en absència de l'AR.
- AR transmembranes de superfície cel·lular diferenciada, no clàssiques o set receptors transmembrana que transmeten senyals a través de proteïnes G.
- Canvis en la permeabilitat de la membrana.

## 1.3 REGULACIÓ DE LA SÍNTESIS D'ANDRÒGENS

### 1.3.1 Origen i formulació química

L'hormona precursora encarregada de la producció dels reguladors hipotalàmics s'acumula principalment al nucli arcuat i, en menor grau, a l'àrea pre-òptica. El nucli arcuat posseeix dos tipus de neurones: Tipus I (productores de GnRH) i tipus II (productores de /dopamina). Les neurones tipus I estan sotmeses a l'acció estimulants i inhibidora d'altres neurones a través de neurotransmissors, com ara noradrenalina, dopamina, opiàcids o serotonina, bé des d'altres nuclis del SNC o des de les tipus II. El nucli arcuat de l'hipotàlem té axons que li permetran alliberar l'hormona a l'eminència mitjana, on trobem la circulació portal hipofisària, que transportarà les hormones o pèptids alliberats a l'adenohipòfisi, on efectuaran l'acció sobre els gonadotrops, cèl·lules les membranes de les quals són molt riques en receptors de GnRH<sup>80</sup>.

L'Hormona alliberadora de gonadotropines (GnRH) o hormona alliberadora d'hormona luteïnitzant (LHRH) és un decapeptid senzill codificat pel cromosoma 8 i sintetitzat per l'hipotàlem com a propèptid de 92 aminoàcids. La GnRH s'allibera amb un patró pulsatiu que en l'adult es produeixen polsos cada 60 a 90 minuts i amplitud creixent. La freqüència dels polsos determinarà la taxa de producció de gonadotropines, la taxa relativa de cadenes  $\alpha$  i  $\beta$  formades de les gonadotropines i la taxa de glicosilació de les gonadotropines. El patró pulsatiu d'alliberació està regulat pels mediadors hipotalàmics, d'entre els que destaquen:

- Les catecolamines com a estimulants, excepte la dopamina local que inhibeix l'alliberació de gonadotropines,
- Els opiàcids derivats de la proopiomelanocortina (POMC), el bloqueig dels seus receptors produeix un augment de les gonadotropines.

Les cèl·lules diana de la GnRH són les cèl·lules gonadotropes de la hipòfisi anterior. Com a hormona polipeptídica que és, no pot travessar la membrana, i per tant, actuarà a través de la unió a receptors específics. La formació d'aquest complex estimularà la síntesis i secreció de gonadotropines<sup>80</sup>.

Les gonadotropines són unes hormones produïdes per la hipòfisi anterior o adenohipòfisi en resposta a la neurosecreció que allibera GnRH a l'hipotàlem. Les gonadotropines constitueixen una família d'hormones glucoproteiques que inclou l'Hormona fol·liculoestimulant (FSH, de l'anglès *Follicle-Stimulating Hormone*),

l'Hormona Luteïnitzant (LH, de l'anglès *Luteinizing Hormone*), ambdues secretades per les cèl·lules gonadotropes de l'hipòfisi, la gonadotropina coriònica humana (hCG, de l'anglès *Human Chorionic Gonadotropin*), sintetitzada a la placenta i la tirotropina (TSH, de l'anglès *Thyroid-Stimulating Hormone*)<sup>81</sup>.

La LH i la FSH estan formades per dos cadenes, una  $\alpha$  i una  $\beta$ . Les dos hormones tenen la cadena  $\alpha$  idèntica i es diferencien per la cadena  $\beta$ . Les dues cadenes estan unides per enllaços no covalents.

Al tractar-se d'hormones proteiques, no travessen la membrana cel·lular, pel que per actuar requereixen la unió a uns receptors de membrana.

### 1.3.2 Funcions al testicle

Les hormones hipofisàries, la LH i la FSH, estimulen les funcions testiculars exocrines i endocrines. A la vegada, i degut al procés de retroalimentació negativa, les testosterona i el  $17\beta$ -estradiol exerceixen efecte inhibidor sobre l'alliberació de FSH i LH<sup>82,83</sup>.

La LH regula i estimula la biosíntesis de testosterona a les cèl·lules de Leydig, localitzades a l'interstici testicular, mentre que la FSH estimula la espermatogènesis al actuar sobre les cèl·lules de Sertoli, localitzades al tub seminífer.

La LH controla i regula la funció endocrina del testicle actuant sobre les cèl·lules de Leydig estimulants la producció de testosterona, mitjançant la unió a receptors específics de la membrana d'aquestes cèl·lules. L'alliberació de LH és un procés discontinu, que es correspon amb la secreció pulsativa de GnRH hipotalàmica. La concentració de LH determinarà la quantitat de testosterona secretada. La testosterona secretada exercirà a la vegada un efecte de retroalimentació negativa sobre la hipòfisi, disminuint directament la secreció de LH, i la inhibició també directe de la secreció de GnRH a l'hipotàlem, que comportarà una disminució de la LH<sup>67</sup>.

### 1.3.3 Regulació

El principal mecanisme de control de l'alliberació de la GnRH és el de les pròpies hormones gonadotropines que al augmentar la seva concentració inhibeixen l'alliberació de GnRH per part de l'hipotàlem (*retroalimentació* negativa).

L'alliberació de la GnRH també està regulada positivament, quan es produeix una elevació de la concentració de les hormones sexuals. L'exposició crònica a les hormones sexuals conduirà a una inhibició de l'alliberació.

Altres pèptids gonadals com ara les inhibines, activines i folistatines també participen en la regulació.

El principal regulador de la secreció de LH i FSH és la GnRH. Els pèptids gonadals inhibina i activina també exerceixen efecte regulador ja que regulen la síntesis de FSH de manera independent. La inhibina suprimeix selectivament la síntesis de FSH a la hipòfisi mentre que l'activina l'estimula<sup>81</sup>

En els homes, la font d'inhibina testicular són les cèl·lules de Sertoli. Actuen a la hipòfisi disminuint la taxa de síntesis i secreció sobretot de FSH. Pel contrari, l'activina actua estimulants la síntesis i alliberament de la FSH. Per la seva banda, les folistatines actuen inhibint l'alliberació de la FSH.

#### **1.3.4 Concentracions fisiològiques**

En ésser humans, al voltant de la desena setmana de gestació l'adenohipòfisi és capaç de respondre a la GnRH. La secreció de LH i FSH s'inicia molt aviat a l'embrió. La concentració plasmàtica de gonadotropines comença a augmentar després de la setmana 12 de gestació i aconsegueix valors alts al voltant de la setmana 21 de vida fetal. Al aconseguir la concentració màxima, l'activitat hipofisària disminueix, de manera que al apropar-se al moment del naixement la concentració de gonadotropines és inferior que al segon trimestre de gestació<sup>83</sup>.

Després del naixement s'observa un pic en la concentració de LH i FSH al voltant dels 3-4 mesos de vida. Després d'aquest pic la concentració de les gonadotropines disminueix ràpidament fins a concentracions dins de l'interval de referència de la infància entre els 5 a 12 mesos després del naixement. Durant el desenvolupament puberal les concentracions de gonadotropines augmenten<sup>84</sup>, comportant la proliferació i maduració de les cèl·lules de Sertoli, les cèl·lules de Leydig i la proliferació de les cèl·lules germinals, i s'assoleixen les concentracions normals d'adults aproximadament als 17 anys<sup>73</sup>.

Els valors de referència per a cada interval d'edat dependran de cada laboratori clínic, segons el procediment de mesura utilitzat i segons la població atesa.

## **1.4 PAPER DELS ANDRÒGENS EN EL CÀNCER DE PRÒSTATA I AGONISTES DE LA LHRH**

La hormonodependència del càncer de pròstata va ser demostrada per Charles Huggins al 1941. Per aquest descobriment se li va concedir el premi Nobel al 1966. Huggins i Hodges<sup>85</sup> van realitzar un estudi intervencionista amb pacients amb càncer de pròstata avançat tractant-los o bé amb estrògens o bé amb testosterona, i uns castrats quirúrgicament. Van demostrar que la testosterona promovia CaP i que la castració quirúrgica o l'administració d'estrògens comportaven una disminució en l'activitat tumoral. Des de llavors, la testosterona es va convertir en l'objectiu terapèutic clau en el tractament del CaP.

En els últims anys, la importància de la senyalització dels andrògens en la fisiopatologia del CaP ha estat emfatitzada pel progrés de la comprensió de la malaltia a nivell molecular<sup>86</sup>.

Al llarg de la vida, la pròstata està contínuament exposada als andrògens sintetitzats als testicles com a l'escorça suprarenal, sent la DHT l'androgen que es troba en més quantitat a la glàndula prostàtica i la testosterona la més abundant en sang<sup>87</sup>.

Als teixits diana la T es converteix en DHT que s'uneix amb major afinitat a la AR, comportant entre altres, el desenvolupament i creixement del teixit prostàtic. Tot i així el seu paper exacte en el desenvolupament del CaP és desconegut; no obstant, concentracions més baixes de testosterona en el moment del diagnòstic semblen associar-se a tumors menys agressius<sup>88</sup>.

### **1.4.1 Anàlegs de la LHRH**

Des de la demostració de la hormonodependència del CaP per Huggins y Hodges<sup>85</sup>, la supressió androgènica mitjançant castració, quirúrgica o mèdica, és el tractament estàndard del CaP avançat, sent la castració mèdica mitjançant anàlegs de la GnRH la més utilitzada.

Al 1971 va ser descrita la molècula de la GnRH per Schally i Guillemin, pel que van rebre el Premi Nobel de Medicina al 1977 i al 1973 es va descobrir el primer anàleg sintètic, acetat de leuprolida. La diferència en l'estructura de la GnRH de una D-leucina per una glicina fa que la leuprolida presenti més afinitat per la unió al



receptor a la hipòfisi i major resistència a la degradació<sup>89</sup>, pel que es dissocien lentament del receptor i tenen una semivida més llarga.

L'administració crònica d'anàlegs de la LHRH comporta una supressió de la funció tant de la hipòfisi com de les cèl·lules de Leydig<sup>63,90</sup>. Inicialment, durant 7-10 dies, es produeix com a resposta, un augment de l'alliberació de LH i posteriorment de testosterona. L'exposició continua produeix dessensibilització de la hipòfisi i retroalimentació negativa sobre els receptors, el que dóna lloc a una disminució de la concentració de testosterona<sup>63,88,91-93</sup>. Habitualment, a les quatre setmanes de l'inici de l'administració dels anàlegs de la LHRH, la concentració de testosterona es redueix prop de la concentració de castració<sup>94,95</sup>. Inicialment es produeix un pic de LH, al segon dia de l'administració (el mateix que passa amb la concentració de testosterona) però disminueix ràpidament, a partir del setè dia.

A causa de la inhibició de la secreció de LH en administració contínua, els anàlegs de la GnRH són efectius en el tractament del CaP en homes i el càncer de mama dependent d'hormones en dones<sup>96</sup>.

## **1.4.2 Concentració hormonal durant el tractament**

### **1.4.2.1 Concentració de castració de testosterona**

La majoria de pacients amb CaP tractats amb anàlegs de la LHRH aconsegueixen concentracions de testosterona iguals o inferiors a la denominada concentració de castració<sup>17,97</sup>. No obstant, fins un 24% dels pacients poden experimentar elevacions de la concentració de testosterona per sobre de 50 ng/dL fet que es considera un "escapament"<sup>88</sup>.

La castració comporta una ràpida disminució de la concentració de testosterona, persistint únicament la font adrenal que en condicions normals representa entre el 2 i el 4% de la seva concentració total<sup>98</sup>.

La concentració reduïda de testosterona, anomenada concentració de castració, va ser establerta en 50 ng/dL per la Food and Drug Administration (FDA) a principis dels anys vuitanta, a partir de mesures realitzades en pacients amb CaP sotmesos a orquiectomia, i corresponia la mínima concentració quantificables (LOQ) dels radioimmunoanàlisi (RIA) utilitzats en aquell moment<sup>99</sup>. Des de llavors, aquesta concentració ha estat utilitzada per totes les agències reguladores per avaluar l'eficàcia de qualsevol producte amb objectiu de comportar castració, sent a més, la

concentració considerada en moltes guies clíniques per a diagnosticar la resistència a la castració<sup>61</sup>. També ha estat adoptada per les guies de càncer de pròstata per a avaluar la eficàcia de la supressió androgènica i, més recentment, per a definir la resistència a castració quan es detecta una progressió bioquímica pel PSA o clínica<sup>17</sup>.

Es disposa d'informació limitada respecte a la definició de la concentració de testosterona de castració després de la introducció d'altres mètodes de mesura. L'any 2000, Oefelein et al<sup>100</sup> van redefinir la concentració de castració de testosterona en 20 ng/dL, després d'observar que aquesta era la concentració mitjana de testosterona observada en trenta pacients amb càncer de pròstata sotmesos a castració quirúrgica, utilitzant un nou procediment de mesura de quimioluminescència. També mitjançant un altre equip de quimioluminescència, l'Immulite® 2500 (Siemens Healthineers) un estudi del nostre grup al 2007<sup>101</sup>, va establir 32 ng/dL com a concentració òptima de castració al demostrar que els pacients que no tenien pics per sobre d'aquesta concentració van estar més temps sense resistència a la castració respecte als que van tenir increments per sobre. Altres estudis recents han relacionat concentracions inferiors de testosterona amb una major supervivència<sup>63,102,103</sup>. Recentment, Klotz et al<sup>104</sup> en una revisió de l'evidència en base a 5 estudis<sup>105-109</sup>, que utilitzen diferents equips d'immunoanàlisi per a la mesura de la concentració de testosterona, conclouen que una concentració de 20 ng/dL (0,7 nmoL/L) seria la que es relaciona amb major benefici de la ADT en comparació amb altres concentracions més elevades. Els mateixos autors inclouen la recomanació d'aconseguir aquestes concentracions al document de consens de la Canadian Urological Association de 2018<sup>110</sup>.

#### 1.4.2.2 Concentració de LH i FSH

Com ja hem comentat a l'apartat 1.4.1, de manera paral·lela a la concentració de testosterona, la concentració de LH després de l'administració continuada de anàlegs de la GnRH, també disminueix dràsticament<sup>111,112</sup>.

Arnaud et al 1986<sup>113</sup>, es van qüestionar el perquè en alguns pacients, tot i tenir concentracions de castració de testosterona, la concentració de LH mesurada per RIA estava lleugerament disminuïda i fins i tot algunes vegades era normal. Per això van mesurar l'activitat de la LH en cèl·lules intersticials de ratolí, mesurant la secreció de testosterona com a resposta a l'administració de agonistes de LHRH, per així comprovar si la inhibició de la concentració d'andrògens podria ser deguda a una pèrdua de la activitat de la LH circulant. Els resultats obtinguts demostren la pèrdua quasi completa de la activitat de la LH.

Estudis més recents<sup>97</sup> confirmen que després de 3 mesos de tractament, l'activitat de LH, mesurada *in vitro* en cèl·lules de Leydig de ratolí, disminueix un 40-50%, sent la pèrdua d'activitat el principal factor responsable de la inhibició de la esteroidogènesis testicular. De fet, els agonistes de la LHRH aconseguen una hipofisectomia mèdica selectiva per a gonadotrofs.

En quan a la concentració de FSH, tot i que també disminueix, no s'assoleixen concentracions tant baixes, a diferència dels antagonistes, que s'uneixen immediatament als receptors de LHRH comportant una ràpida disminució de la concentració de LH i FSH<sup>17</sup>. En l'estudi de Klotz et al<sup>114</sup> observen una disminució de 54,8% de la concentració de FSH després de l'administració d'anàlegs de la LHRH al final de l'estudi. De la Rosette et al<sup>115</sup> també observen una disminució del 50% després d'un any en tractament amb leuprolida.

Fins al moment, la valoració de l'eficàcia del tractament amb anàlegs de la GnRH en pacients amb càncer de pròstata, s'ha realitzat segons la concentració de testosterona.

En pacients pediàtrics i en dones alguns autors suggereixen la utilització de la concentració de LH i/o FSH pel seguiment del tractament amb anàlegs de la LHRH<sup>116-118</sup>. En pacients pediàtrics amb pubertat precoç per a monitoritzar la teràpia amb anàlegs de la LHRH proposen mesurar la concentració de LH<sup>118</sup>. En aquest estudi van observar que en la majoria de pacients estudiat, la concentració de LH després de 3 mesos de tractament es suprimien a concentracions d'entre 0,5 i 1,0 UI/L, amb el seu procediment de mesura d'immunoquimioluminescència i proposen la concentració de LH de 3 mUI/mL com a límit superior per a l'adequació del tractament. Es qüestionen si concentracions de LH entre 1,5 i 3 UI/L podrien representar un menor grau de supressió androgènica.

No obstant, en una revisió de *Endocrine Society* respecte al tractament de la pubertat precoç central<sup>119</sup>, no recomanen la mesura de la concentració de LH per la monitorització del tractament al observar-se que alguns pacients en tractament amb supressió adequada de l'eix hipotàlem-hipòfisi-gònades presenten concentracions de LH normals<sup>120</sup>.

## 1.5 MESURA DE LA CONCENTRACIÓ DE TESTOSTERONA

### 1.5.1 Mètodes de mesura

Existeixen diferents mètodes per a la mesura de la concentració de testosterona, actualment principalment són mètodes d'immunoanàlisi o mètodes d'espectrometria de masses en tàndem (MSMS).

#### 1.5.1.1 Mètodes d'immunoanàlisi

Els mètodes d'immunoanàlisi es basen en la reacció d'unió entre la substància a mesurar, que actua com antigen, i un anticòs específic per aquesta molècula.

L'anticòs utilitzat pot ésser monoclonal, quan són anticossos específics front un epítop de la molècula, o policlonal, quan són barreges d'anticossos front la mateixa molècula però dirigits front a diferents epítops.

Tots els immunoanàlisi requereixen l'ús d'un material marcat per mesurar la concentració present a la mostra. Segons la naturalesa d'aquest material marcat, els immunoanàlisi es classifiquen en:

- Radioimmunoanàlisi (RIA), quan el material marcat és un radioisòtop.
- Enzimimmunoanàlisi (EIA), quan el material marcat és un enzim.
- Luminoanàlisi, quan s'utilitza una substància productora de llum. Quan l'emissió de llum té lloc com a resultat de l'oxidació d'un compost parlem d'electroquimioluminescència.

Les primeres mesures de la concentració de testosterona es van realitzar a mitjans del 1960 utilitzant procediments de captura d'electrons seguit de cromatografia de gasos<sup>121</sup> i derivatització doble isotòpica<sup>122</sup>. Aquests procediments eren molt complexes, lents i amb una sensibilitat analítica dependents de l'extracció de testosterona a partir de grans volums de mostra, sent per aquest motiu mètodes inadequats pel laboratori clínic. Amb l'objectiu de millorar la sensibilitat i especificitat analítica es van començar a utilitzar els primers RIA, que a part de millorar el límit de quantificació, requerien menys volum de mostra. Així, en els següents 30 anys, la concentració de testosterona es va mesurar mitjançant tècniques de RIA amb extracció prèvia amb columna<sup>123</sup>. Posteriorment, al disposar d'anticossos específics, es van substituir les extraccions en columna, passant a utilitzar l'equip de reactius comercials de RIA competitiu.

Més recentment, els RIA han estat substituïts per immunoanàlisi que actualment es troben completament automatitzats en diferents plataformes analítiques, instruments que utilitzen la quimioluminescència com a procediments de mesura. La seva implantació ha permès millorar l'eficiència, optimitzar recursos, millorar el límit de quantificació, la reproductibilitat i practicabilitat de la mesura de la concentració de testosterona i l'eliminació de residus radioactius.

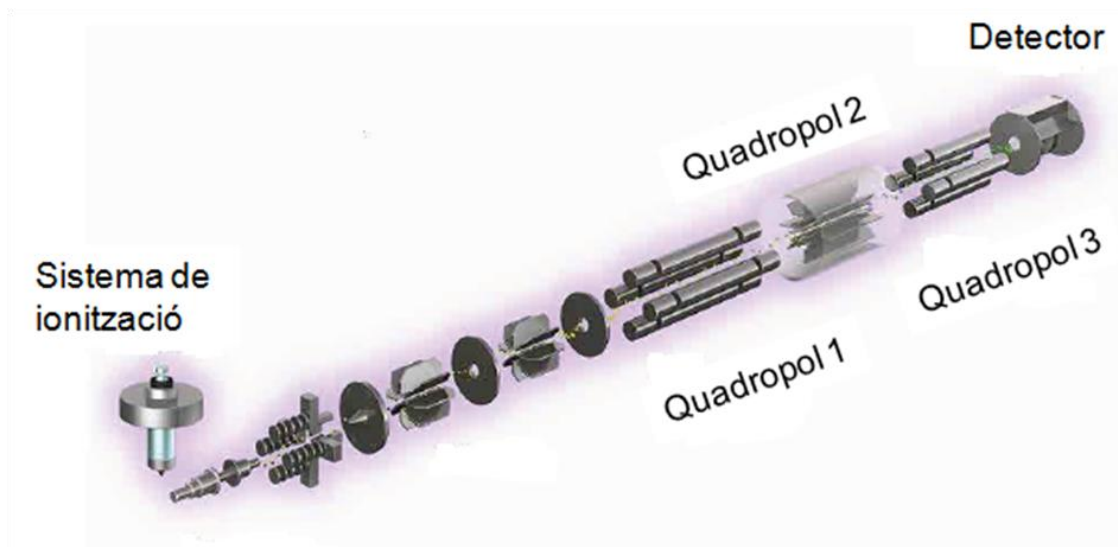
Aquests procediments de mesura utilitzen els seus propis anticossos, els seus propis estàndards i tenen els seus intervals de referència. L'ús d'aquests procediments de mesura al laboratoris clínics actuals permet la mesura de les diferents magnituds de manera més ràpida i econòmica. No obstant, les diferents plataformes d'immunoanàlisis presenten diferents característiques metrologicals, existint diferències en quant a la linealitat, reproductibilitat, especificitat i sensibilitat, el que origina que hi hagi diferències en els resultats segons el procediment de mesura usat. En el cas de la testosterona, aquestes diferències entre els instruments utilitzats augmenta quan estem mesurant concentracions baixes<sup>123</sup>, donant resultats tant subestimats com sobreestimats, segons el procediment de mesura utilitzat<sup>124,125</sup>.

#### 1.5.1.2 Mètodes d'espectrometria de masses acoblada a tècniques de separació de cromatografia

L'espectrometria de masses és una tècnica analítica en la que els àtoms o molècules d'una mostra són ionitzats, separats per la seva relació massa/càrrega ( $m/z$ ) i posteriorment detectats. Consta de quatre etapes<sup>126,127</sup>:

- Introducció de mostra
- Ionització de la mostra: els àtoms o molècules es transformen en espècies iòniques en fase gasosa. Existeixen diferents sistemes de ionització: ionització en fase gasosa o sistemes de desorció, com ara la desorció làser, MALDI (desorció/ionització làser assistida per matriu) o ionització per electrospai. Aquests dos són els més utilitzats als laboratoris clínics.
  - Separació i anàlisi dels ions moleculars i dels fragments carregats produïts en funció de la seva relació  $m/z$ . L'elecció de l'analitzador es realitza en funció de la resolució, exactitud, interval dinàmic lineal, sensibilitat, eficàcia i adaptabilitat. Entre els més utilitzats està el quadrupol.
  - Obtenció de l'espectre de masses, en el que es presenta l'abundància relativa dels ions fragments produïts respecte a la relació  $m/z$ . El detector pot ésser un fotomultiplicador o una copa de Faraday.

La figura 11, adaptada de [www.shimadzu.eu](http://www.shimadzu.eu)<sup>128</sup>, esquematitza el funcionament d'un espectròmetre de masses:



La identificació de compostos en mostres complexes, en general, no és possible utilitzant un únic espectròmetre pel que és necessari acoblar varis espectròmetres (MSMS). L'espectrometria de masses en tàndem és l'acoblament de dos espectròmetres de masses units per una càmera que fragmenta molècules. El primer espectròmetre serveix per a seleccionar un ió determinat dels produïts per la ionització (ió precursor). S'introdueix a la càmera de col·lisió, en la que es bombeja un gas inert i es fragmenta el ió generant ions producte que entraran al segon espectròmetre de masses i seran analitzats per donar un nou espectre de masses.

Prèvia a l'espectròmetre de masses es pot acoblar la separació per tècniques de cromatografia: la líquida (high-performance liquid chromatography (HPLC) o Ultra Performance Liquid Chromatography (UHPLC)) o la de gasos (GC).

Quan el mètode de mesura combina LC i MSMS, l'especificitat i sensibilitat analítiques són molt elevades i la mesura es realitza en poc temps.

Actualment, el desenvolupament de procediments per a la mesura de la concentració de testosterona mitjançant tècniques MSMS, acoblada a cromatografia líquida (LC-MSMS) o de gasos (GC-MSMS) permeten mesurar baixes concentracions de testosterona amb elevada especificitat i sensibilitat<sup>129-132</sup>. No obstant, la falta d'estandardització<sup>133-135</sup> dels procediments de mesura dóna lloc a que hi hagi diferències entre els diferents procediments que utilitzen l'espectrometria de

masses<sup>87,132,136</sup>. Aquestes diferències s'explicarien per algunes de les limitacions dels mètodes LC-MSMS: diferents processos de preparació de la mostra, tipus de columna utilitzada, l'estàndard intern escollit i un requeriment de personal especialitzat<sup>130,137</sup>.

Davant aquesta dificultat per a mesurar la concentració de testosterona amb la exactitud, reproductibilitat i sensibilitat necessària, la Societat Americana de Endocrinologia, al 2007<sup>138</sup>, es van posicionar recomanant l'ús de mètodes de Espectrometria de Masses com a mètode *Gold Standard* per a la mesura de concentració de testosterona per sota l'interval de referència. Tant mateix, al 2010<sup>139</sup>, la Societat americana de Endocrinologia junt amb *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) realitzen una declaració de consens amb l'objectiu d'estandarditzar els procediments de mesura de la testosterona. A partir d'aquests posicionaments, es va iniciar un projecte per a la estandardització de la mesura de la concentració de testosterona: Programa CDC *Hormone Standardization Program*<sup>140</sup>, amb l'objectiu de millorar la reproductibilitat, el biaix i l'error total de la mesura de la concentració de testosterona i la seva comparabilitat. Finalment, al 2013<sup>141,142</sup> publiquen el desenvolupament i validació d'un procediment de LC-MSMS calibrat amb el material SRM 971, material de referència traçable i commutable preparat per la NIST (*National Institute of Standard and Technology*).

Mentre no existeixi l'estandardització de tots els procediments de mesura, es recomana que els procediments utilitzats als laboratoris clínics estiguin validats i compleixin les característiques metrològiques de reproductibilitat, sensibilitat i exactitud analítiques requerides per mesurar les concentracions, segons les indicacions de la guia CLSI<sup>143</sup> de la població que es dona servei, i que cada laboratori defineixi els seus propis intervals de referència<sup>134,144,145</sup>.

### **1.5.2 Mesura de la concentració de testosterona en pacient amb càncer de pròstata sotmesos a castració**

Com ja s'ha explicat a l'apartat 1.1.4.1, en pacients amb CaP sotmesos a castració, es considera que el tractament és eficaç quan la concentració de testosterona és inferior a 50 ng/dL, molt per sota dels intervals de normalitat dels homes.

Per tant, per a mesurar concentracions tant baixes és necessari utilitzar procediments de mesura exactes i precisos, especialment quan es vol verificar si un pacient presenta resistència a la castració<sup>98</sup>.

Com hem vist, els immunoanàlisi ha estat una eina fonamental per a la mesura d'esteroides sexuals des de la seva aparició al 1960. No obstant, als últims anys molts estudis realitzats, principalment en dones, han demostrat que les plataformes d'immunoanàlisi utilitzades en la pràctica clínica no presenten la suficients característiques metrològiques necessàries per mesurar concentracions inferiors a la de límit inferior de referència<sup>125,133,138,139,146-148</sup>. Varis estudis han avaluat les diferents plataformes utilitzades als laboratoris clínics i han observat l'existència d'elevada variabilitat tant en homes com en dones<sup>124</sup>. La majoria d'immunoanàlisis sobreestimen la concentració de testosterona en per sota de 100 ng/dL<sup>149-151</sup>. En homes eugonadals, la correlació entre els diferents immunoanàlisi i el mètode de referència és bona, tot i que existeixen biaixos significatius, especialment a l'interval inferior de concentracions. Per aquest motiu es proposa que la mesura mitjançant immunoanàlisi no és adequada pel diagnòstic de l'hipogonadisme en homes, recomanant els mètodes LC-MSMS com a mètode de referència<sup>123</sup>.

Estudis recents també han avaluat els diferents procediments que utilitzen cromatografia i detecció mitjançant MS. La majoria coincideixen en que aquests presenten un bon límit de quantificació i precisió, exactitud i reproductibilitat a tot l'interval de mesura, inclús a concentracions pròximes al límit de quantificació<sup>132,136,152,153</sup>. No obstant, també constaten que existeix certa variabilitat entre els diferents procediments, tot i que molt inferior a la observada amb els immunoanàlisi. Com hem comentat anteriorment, aquestes diferències s'expliquen per algunes de les limitacions dels diferents procediments de MS, com ara la diversitat entre protocols de preparació de mostra, el tipus de columna utilitzada en la separació cromatogràfica, la necessitat de personal especialitzat i l'estàndard intern utilitzat<sup>130</sup>.

La evidència científica indica que els immunoanàlisi no presenten les característiques metrològiques adequades per a la mesura de concentracions baixes de testosterona<sup>154</sup>. Pel diagnòstic d'hipogonadisme en homes i hipergonadisme o síndromes dels ovaris políquístics en dones amb concentracions de testosterona al límit baix de l'interval de normalitat dels homes, els immunoanàlisi no permeten classificar correctament aquests pacients<sup>155</sup>.

Tot i que no hi ha cap estudi que hagi avaluat la reproductibilitat i exactitud en pacients amb CaP sotmesos a castració, el comportament en aquesta pacients hauria de ser similar a l'observat en dones i nens, al tractar-se de concentracions baixes.



La falta de reproductibilitat i exactitud pot donar lloc a una mala classificació dels pacients resistents a la castració<sup>156,157</sup>.

## 1.6 JUSTIFICACIÓ DE LA HIPÒTESIS

La hormonodependència del càncer de pròstata va ser demostrada per Huggins y Hodges fa més de 70 anys<sup>85</sup>. Des d'aleshores, la supressió androgènica ha estat la teràpia més utilitzada pel CaP avançat.

L'eliminació de fonts testiculars de andrògens dóna lloc una disminució de la concentració de testosterona que indueix un estat de hipogonadisme, tot i que persisteix una petita concentració de testosterona provinent de la síntesis suprarenal, el que s'anomena concentració de castració<sup>17</sup>.

Les guies clíniques del càncer de pròstata recomanen la mesura de la concentració de testosterona per avaluar l'eficàcia de la castració i per diagnosticar la resistència a la castració (CR) quan s'observa una progressió bioquímica o clínica. Així, la resposta als anàlegs de la hormona alliberadora de la hormona luteïnitzant (LH-RH) es considera eficaç quan la concentració de testosterona és manté per sota de 50 ng/dL. No obstant, aquesta concentració anomenada de castració va ser definida als anys vuitanta en pacients sotmesos a castració quirúrgica, sent el límit inferior de sensibilitat del radioimmunoanàlisi utilitzats aleshores.

Els immunoanàlisi han sigut una eina fonamental per a la mesura d'esteroides sexuals. Tot i això, als últims anys molts estudis han demostrat que els immunoanàlisi utilitzats a la pràctica clínica no tenen suficient exactitud, precisió i reproductibilitat per mesurar concentracions inferiors al límit inferior de l'interval de referència tot i ser els procediments més utilitzats als laboratoris clínics. El desenvolupament de procediments per a la mesura de la concentració de testosterona mitjançant tècniques de espectrometria de masses acoblada a tècniques de separació de cromatografia, HPLC o UHPLC o de gasos permeten mesurar les baixes concentracions de testosterona amb elevada sensibilitat i especificitat<sup>129-132</sup>.

En aquest sentit, la Societat Americana de Endocrinologia, al 2007, es van posicionar recomanant l'ús de mètodes de Espectrometria de Masses com a mètode *Gold Standard* per a la mesura de concentració de testosterona per sota l'interval de referència, especialment en nens i dones. Tant mateix, al 2010, la Societat americana de Endocrinologia junt amb *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)

realitzen una declaració de consens amb l'objectiu d'estandarditzar els procediments de mesura de la testosterona.

En el seguiment dels pacients amb càncer de pròstata amb supressió androgènica, les concentracions de testosterona són especialment baixes i per tant és necessari utilitzar procediments de mesura exactes i reproduïbles, per verificar l'eficàcia del tractament i de manera singular per definir la resistència a la castració<sup>98</sup>.

En síntesis, per tot el que s'ha considerat en la introducció d'aquesta memòria, creiem que és necessari avaluar les propietats metrològiques dels procediments de mesura utilitzats en la rutina dels laboratoris clínics, per a mesurar la concentració de testosterona en pacients amb CaP sotmesos a supressió androgènica i establir una concentració de castració que sigui real i basada amb els procediment apropiats de mesura.

Hipòtesis de treball

---

## 2 HIPÒTESIS DE TREBALL

En pacients amb càncer de pròstata (CaP) sotmesos a castració mèdica amb anàlegs de la LH-RH, la mesura de la testosterona sèrica amb cromatografia líquida i detecció per espectrometria de masses (LC-MSMS) és més precisa que quan es mesura amb els mètodes, habitualment utilitzats als laboratoris clínics, de quimioluminescència (CLIA) per a avaluar l'eficàcia del tractament i definir l'estat de resistència a la castració per a la pràctica clínica.

Durant el desenvolupament del projecte, i segons els resultats inicialment obtinguts, ens hem plantejat, com a hipòtesis addicional, que la mesura sèrica de la concentració de LH és un mètode més específic que la mesura de la concentració de testosterona per a avaluar l'activitat de la castració mèdica amb anàlegs de la LH-RH.

Objectius

---

### 3 OBJECTIUS

Per a contrastar les hipòtesis plantejades a l'apartat anterior vàrem definir els següents objectius:

1. Fer una revisió sistemàtica de la literatura dels mètodes per a mesurar les concentracions de testosterona i analitzar el seu comportament en pacients amb CaP sotmesos a supressió androgènica.
2. Avaluar alguns dels procediments de mesura quimioluminiscent per a la mesura de la concentració de testosterona en pacients amb CaP sotmesos a supressió androgènica.
3. Avaluar un dels procediments de mesura basats en LC-MSMS per a la mesura de la testosterona sèrica en pacients amb CaP sotmesos a castració i la seva comparació amb els mètodes quimioluminiscent i definir i avaluar la concentració de castració de testosterona segons el procediment de mesura utilitzat.
4. Analitzar la mesura de la concentració sèrica de LH en l'avaluació de l'estat de castració mèdica en pacients amb CaP i comparar la seva especificitat amb la de la concentració de testosterona sèrica mesurades amb LC MSMS.
5. Establir si la mesura de la concentració de LH permetria definir i diferenciar la castració mèdica òptima i subòptima.

## Metodologia

---

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 REVISIÓ SISTEMÀTICA DE LA LITERATURA

La revisió sistemàtica de la literatura es va realitzar seguint les indicacions de la guia *Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-analyses (PRISMA)*<sup>158</sup>.

Els criteris de selecció per a la identificació de publicacions útils per aquesta revisió van ser:

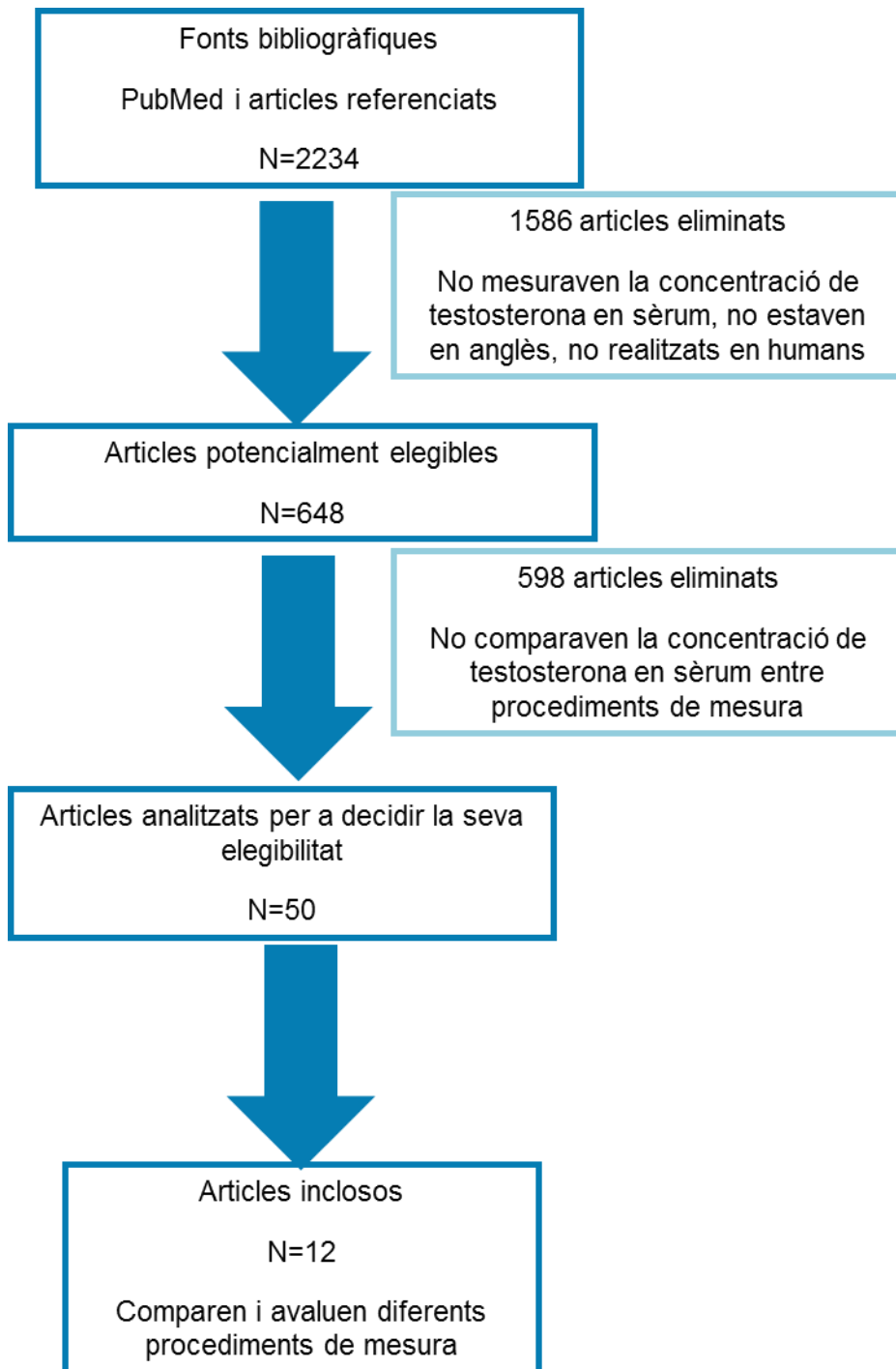
- a. Que es tractessin d'estudis que mesuressin la concentració de testosterona en sèrum en humans.
- b. Que analitzessin la mesura de la testosterona mitjançant diferents procediments de mesura.
- c. Que comparessin les característiques metrologicals d'aquests procediments.

Es va realitzar una cerca sistemàtica a la base de dades Pub-Med i la llibreria *Cochrane* entre els anys 1980 i 2016 incloent termes de cerca del *Medical Subject Headings (MeSH): measurement, testosterone, androgen suppression i prostate cancer*. A més, es va realitzar la cerca manual d'aquells articles referenciats en revisions potencialment elegibles.

Es van trobar 2.234 articles, dels quals es van seleccionar 648 realitzats en humans i publicats en anglès que mesuraven la concentració de testosterona en sèrum. D'aquests, es van seleccionar 50 que analitzaven la mesura de testosterona en diferents procediments de mesura. Finalment, es van analitzar 12 articles que comparaven les característiques metrologicals dels diferents procediments de mesura<sup>123,124,160,161,132,136,149–153,159</sup>. La figura 12 esquematitza el diagrama de flux dels procés de cerca i selecció dels estudis.



Figura 12: Diagrama de flux del procés de cerca i selecció d'estudis.



## 4.2 PACIENTS

Es va realitzar la selecció de pacients i recollida prospectiva de dades entre els anys 2016 i 2018. Els 1510 pacients seleccionats eren del servei d'Urologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron amb càncer de pròstata en tractament amb anàlegs de la LHRH als que se'ls havia sol·licitat la mesura de la concentració de testosterona com a protocol de seguiment del tractament. Es van seleccionar un grup de pacients control seleccionats a l'atzar dels homes que tenien programats biòpsia de pròstata al servei d'Urologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron degut a la sospita de CaP. L'estudi va ser aprovat pel comitè ètic institucional de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron (aprovació nº PR046/2016; veure annex 1).

L'extracció de sang es va realitzar entre les 8:00 i les 10:00 del matí. Les mostres es van centrifugar durant 10 min a 3500 revolucions per minut. Es van realitzar dues alíquotes de 1mL de sèrum, una per a mesurar la testosterona utilitzant el procediment de quimioluminescència i l'altra per a mesurar la testosterona mitjançant LC-MSMS, que es van congelar a -80°C.

A les bases de dades es van recollir dades clíniques referents al diagnòstic i al tractament, dades demogràfiques (edat) i resultats de diferents proves analítiques: concentració de LH, concentració de FSH, concentració de testosterona, concentració de testosterona lliure, concentració de PSA, concentració de SHBG i concentració de prolactina.

Per l'estudi 2 es van recollir de la nostra seroteca 249 pacients del servei d'Urologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron amb càncer de pròstata histològicament confirmat sotmesos a tractament continu amb agonistes de la LHRH, als que se'ls havia sol·licitat la mesura de la concentració de testosterona en l'analítica de control.

Per l'estudi 3 es van seleccionar 143 pacients que presentaven un resultat de concentració de testosterona mesurada amb l'equip Advia Centaur® XP inferior a 100 ng/dL.

Per l'estudi 4 es van utilitzar 1091 pacients de la seroteca que presentaven un resultat de concentració de testosterona mesurada amb l'equip Advia Centaur® XP inferior a 150 ng/dL, considerada la cohort d'estudi, 147 pacients que presentaven un resultat de concentració de testosterona mesurada amb l'equip Advia Centaur® XP

inferior a 100 ng/dL com a cohort de validació i els 303 pacients del grup control que tenien programats biòpsia de pròstata al servei d'Urologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron degut a la sospita de CaP.

Per l'estudi 5 es van seleccionar 138 pacients amb tractament amb anàlegs de la LHRH seleccionats a l'atzar de la cohort d'estudi de 1110 pacients que presentaven concentració de LH dins de l'interval de castració (concentració de LH < 1,1 U/L) publicat a l'estudi 4.

## **4.3 MÈTODES ANALÍTICS**

### **4.3.1 Mètodes quimioluminiscent**

#### **4.3.1.1 Advia Centaur®XP**

El Advia Centaur® XP mesura la concentració de testosterona mitjançant un immunoanàlisi competitiu. Pel primer reactiu l'interval de mesura és de 10 a 1500 ng/dL i pel reactiu TSTII de 7 a 1500 ng/dL. Pel primer procediment de mesura, la precisió del procediment de mesura és d'un coeficient de variació intra-assaig de 2,3 a 6,2 % i el coeficient de variació inter-assaig del 1,4-4,4% (IFU 10629910\_ES Rev. U, 2014-08; 1-18) i pel reactiu TSTII el coeficient de variació intra-laboratori 4,5 a 12,6% i el coeficient de variació inter-assaig de 3,0 a 8,5% pel reactiu TSTII (IFU: 10698331\_ES Rev. B, 2016-06).

#### **4.3.1.2 Atellica® Solutions**

La mesura de la concentració de testosterona a l'Atellica® Solutions amb el reactiu TSTII presenta un interval de mesura de 7 a 1500 ng/dL amb un coeficient de variació intra-assaig de 2,7 a 6,7% i el coeficient de variació inter-assaig de 1,2 a 3,5%. (IFU: 10995435\_ES Rev.01, 2017-06).

#### **4.3.1.3 Cobas® 8000**

El procediment de mesura de la concentració de testosterona de l'equip Cobas® 8000 presenta un interval de mesura de 2,5 a 1500 ng/dL. El coeficient de variació intra-assaig és de 3,5 a 14,6% i el coeficient de variació inter-assaig de 1,8 a 11,1% (IFU: 2017-08, V2.0 Español).

## 4.3.2 Mètodes LC-MSMS

### 4.3.2.1 LC-MSMS del centre extern

La mesura de la concentració de testosterona mitjançant LC-MSMS es va realitzar per les mostres de la base de dades de validació a un centre extern (laboratori privat) i les de la base de dades 2 al Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

El procediment mesura de la concentració de testosterona de les mostres de la base de dades de validació mitjançant LC-MSMS es va realitzar amb l'equip de cromatografia 1290 Infinity Sistema LC binari (Agilent Technologies) connectat en tàndem a l'espectròmetre de masses triple quadrupol sèrie 6430 de Agilent Technologies. Presenta un interval de mesura entre 2 i 1500 ng/dL. El coeficient de variació intra-assaig és del 4% al 5% i el coeficient de variació inter-assaig a concentració de testosterona de 50 ng/dL, entre el 7% i el 8%, segons dades del laboratori privat.

### 4.3.2.2 LC-MSMS instal·lat als Laboratoris Clínics Vall d'Hebron

El procediment mesura de la concentració de testosterona de les mostres de la segona base de dades mitjançant LC-MSMS es va realitzar utilitzant l'equip de reactius de Chromsystems® amb l'equip Shimatzdu LC/MS8050® (Izasa Scientific). L'interval de mesura del mètodes és de 0,5 a 2400 ng/dL. El coeficient de variació intra-assaig segons la informació del proveïdor (IM 72072 Steroids EN 12/2017 R1) és de 0,8% al 1,4% i el coeficient de variació inter-assaig a concentració de testosterona de 20 ng/dL és del 8,8%.

Descripció del mètode:

a. Estàndards i reactius:

Per a la mesura de la testosterona pel mètode LC-MSMS s'ha utilitzat l'equip de reactius MassChrom®Steroids in sèrum/plasma de Chromsystems.

b. Preparació de la mostra:

La preparació de la mostra es realitza mitjançant l'extracció de la mostra en fase sòlida utilitzant columnes d'extracció.

S'utilitza 500µL de calibradors, controls o sèrum a la columna i s'afegeix 50 µL d'estàndard intern. Les mostres s'extreuen amb 450µL de Buffer d'extracció i s'eliminen les molècules no retingudes a la columna amb solució de rentat. Finalment, les molècules retingudes a la columna s'elueixen amb Buffer d'elució.

Es concentra l'eluent per evaporació sota nitrogen a 50°C i el residu es reconstitueixen amb Buffer de reconstitució. S'injecta a l'equip 25 µL.

c. LC-MSMS:

L'equip de LC-MSMS que s'ha utilitzat és Shimatzdu LC/MS8050® (Izasa Scientific)

a. Separació cromatogràfica: es realitza amb una columna C18 i amb les fases mòbils proporcionades un gradient de flux en un sistema de cromatografia líquida d'alta pressió. La temperatura de la columna es de 27°C i el volum injectat 25µL.

b. MSMS:

La tècnica de ionització que utilitza l'equip és Ionització Electrospray. L'anàlisi de masses es realitza amb un triple quadrupol, treballant amb mode "Multiple Reaction Method" (MRM) com a mètode de mesura.

Les condicions de MS es van optimitzar per obtenir intensitat màxima per cada un dels compostos que mesura l'equip de reactius.

Les transicions de massa precursor/producte per a la testosterona òptimes en el nostre equip són 289,3-97,1 Da.

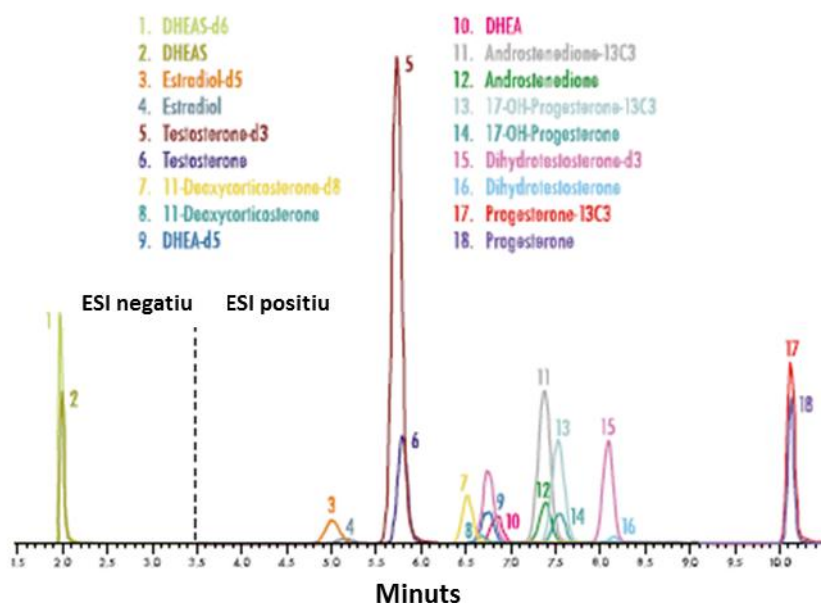
En el nostre equip, el mètode de mesura presenta una linealitat de 0,5 a 2400 ng/dL.

d. Control de qualitat

Per a l'acceptabilitat de les mesures es va considerar un coeficient de determinació de la corba de calibració  $R^2 > 0,995$  i concentració dels controls dins de 2 desviacions estàndard.

Mitjançant aquest mètode i utilitzant un calibrador específic, a part de la concentració de testosterona, també mesurem altres esteroides, sent el cromatograma que s'obté l'exemple de la figura 13.

Figura 13: Exemple de cromatograma obtingut pel mètode de LCMSMS (imatge adaptada de la informació proporcionada pel proveïdor IM 72072 Steroids EN 12/2017 R1, Chromsystems®).



#### 4.4 ANÀLISI ESTADÍSTIC

Els estadístics utilitzats per les variables quantitatives ha sigut la mitjana o la mediana amb l'interval de confiança del 95%. S'han representat la distribució de la concentració de testosterona mitjançant histogrames de barres i amb gràfiques de caixa.

L'avaluació de la normalitat de la distribució de dades es va realitzar utilitzant la prova Kolmogorov-Smirnov o la prova Shapiro-Wilk. La comparació de les concentracions mesurades entre diferents procediments de mesura es va realitzar aplicant la prova U de Mann-Whitney o la prova de Kruskal-Wallis. Es considera significatiu un valor de  $p < 0,001$ .

El càlcul de les concentracions de castració es va realitzar mitjançant el càlcul dels fractils, seguint les indicacions de la *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), guia EP28-A3<sup>145</sup>.

Es generen corbes ROC i es comparen les àrees sota la corba (AUC) per calcular les concentracions de castració. S'aplica la prova ANOVA per comparar les distribucions de dades.

L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant SPSS v. 20 (IBM Inc).

## Resultats

---



## 5 RESULTATS

Els resultats d'aquest projecte de tesis doctoral estan reflectits en les següents publicacions:

### Estudi 1:

Comas I, Ferrer R, Planas J, Celma A, Regis L, Morote J. **A systematic review of methods for quantifying serum testosterone in patients with prostate cancer who underwent castration.** *Actas Urológicas Españolas*. 2018;42(2):86-93.

### Estudi 2:

Morote J, Comas I, Planas J, Celma A, Ferrer R, Regis L . **Behavior of chemiluminescent assays to measure serum testosterone during androgen deprivation therapy.** *Int J Urol*. 2016;23(11):957-958.

### Estudi 3:

Morote J, Comas I, Planas J, Maldonado X, Celma A, Placer J, Ferrer R, Carles J, Regis L. **Serum testosterone Levels in Prostate Cancer Patients Undergoing Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonist Therapy.** *Clin Genitourin Cancer*. 2017;16(2):1-6.

### Estudi 4:

Morote J, Comas I, Ferrer R, Planas J, Celma A, Regis L. **Accuracy of serum luteinizing hormone and serum testosterone measurements to assess the efficacy of medical castration in prostate cancer patients.** *J Biomed Sci*. 2017;24(81):1-6.

### Carta a l'editor 1:

Morote J, Comas I, Planas J. **EAU-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer.** European Association of Urology; 2017. <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer>. **How to Assess the Efficacy of Medical Castration.** *Eur Urol*. 2018;73(5):e134-e135.

### Carta a l'editor 2:

Morote J, Comas I. **Replay by authors: Serum testosterone level is a useful biomarker for determining the optimal treatment for castration-resistant prostate cancer.** *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2019;37(1):571.

### Estudi 5:

Morote J, Comas I, Ferrer R, Regis L, Celma A, Santamaria A, Planas J, Trilla E. **Serum luteinizing hormone testing can identify optimal medical castration** *European Urology Open Science.* 2020;19:24-26.

### Annex 2:

Es presenten dades no publicades en articles que fan referència a resultats d'imprecisió dels diferents mètodes utilitzats i als resultats de les concentracions de castració calculades pels diferents mètodes.

## ESTUDI 1:

### 1. Introducció:

Les guies de pràctica clínica recomanen mesurar la testosterona en sèrum en pacients amb CaP sotmesos a castració<sup>162</sup>. Aquesta concentració ha de ser inferior a 50 ng/dL, una concentració establerta mitjançant un mètode de RIA<sup>99</sup>. Actualment els laboratoris clínics mesuren la concentració de testosterona amb equips d'immunoanàlisi quimioluminescent, tot i que les seves característiques metrologicals no semblen adequades per a quantificar concentracions baixes de testosterona<sup>123,124,138,156</sup>.

### 2. Objectiu:

L'objectiu d'aquesta revisió va ser analitzar els mètodes de quantificació de testosterona en sèrum i establir quina és la evidència científica que justifica que la seva mesura, en pacients amb CaP sotmesos a castració, es realitzi mitjançant un procediment de mesura diferent a IA com per exemple LC-MSMS.

### 3. Material i mètodes:

Es va realitzar un revisió sistemàtica de la literatura seguint les indicacions de la guia PRISMA<sup>158</sup>. La cerca sistemàtica a la base de dades PubMed va incloure els termes del MeSH: *measurement, testosterone, androgen suppression i prostate cancer*. Es van analitzar 12 articles<sup>123,124,160,161,132,136,149–153,159</sup> que comparaven les característiques metrologicals dels diferents procediments de mesura per a mesurar la concentració de testosterona en sèrum.

### 4. Resultats:

Referent a l'evolució dels mètodes de mesura de la testosterona, les primeres mesures al laboratori clínic van ser mitjançant RIA, prèvia extracció en columna. Posteriorment, la disponibilitat d'anticossos específics va permetre substituir les extraccions en columna i donar lloc a l'ús d'equips de reactius comercials de RIA de manera directa. Tot i representar un punt d'inflexió per a la mesura d'hormones, els diferents RIA presentaven baix rendiment degut a les reaccions creuades, la falta d'exactitud i límits de quantificació elevats.

Al 1996, McShane et al.<sup>159</sup> van analitzar les concentracions d'hormones sexuals de 4 dones i 4 homes mesurades amb dos RIA, observant que les mitjanes entre

ambdós procediments diferien entre un 10% i un 17%, amb CV inferiors al 10% a totes concentracions. Al 2002<sup>160</sup>, el mateix grup va comparar els resultats obtinguts amb els dos RIA i un GC/MS i van observar que les concentracions mesurades per RIA eren més variables que amb GC/MS. Al 2003, Taieb et al.<sup>124</sup> en una avaluació de diferent immunoanàlisi van observar que els RIA eren menys reproduïbles que GC/MS. Resultats similar van obtenir Wang et al.<sup>123</sup> comparant diferents RIA amb GC/MS, presentant els RIA diferències significatives sobreestimant la concentració de testosterona i amb major biaix a concentracions de testosterona baixes. Moal et al.<sup>149</sup> comparant els resultats obtinguts entre dos immunoanàlisi quimioluminescents, tres RIA i un LC-MS en dones i nens van trobar que la concentració de testosterona mesurada per RIA era més alta que mesurada amb LC-MSMS i cap d'ells presentava bona correlació amb LC-MSMS.

El desenvolupament dels immunoanàlisi i la seva implantació en plataformes automatitzades va permetre millorar l'eficiència, disminuir cost, millorar el límit de quantificació, la reproductibilitat i la practicabilitat de la mesura de la testosterona respecte els mètodes de RIA.

En l'avaluació de 10 immunoanàlisi realitzada per Taieb et al. al 2003<sup>124</sup> amb mostres d'homes, dones i nens, es va observar elevada variabilitat, tant subestimant com sobreestimant la concentració de testosterona obtinguda amb GC/MS, un biaix observat principalment en nens i dones els quals tenien una concentració de testosterona entre 17 i 207 ng/dL, mentre que homes, en els que la concentració de testosterona era entre 236 i 1660 ng/dL no van observar biaix significatiu.

Al 2004 Wang et al.<sup>123</sup> avaluant quatre immunoanàlisi quimioluminescents, dos RIA i un LC\_MSMS en homes sans (concentració de testosterona entre 300 i 1000 ng/dL) i amb hipogonadisme (concentració de testosterona inferior a 100 ng/dL) van trobar que tots presentaven resultats més elevats a tot l'interval de concentracions mesurades que el LC-MSMS excepte un dels procediments que subestimava la concentració de testosterona i que les diferències entre els diferents procediments i LC-MS eren més elevades. Es van trobar resultats semblants a l'estudi de Moal et al.<sup>149</sup> on comparaven tres immunoanàlisi quimioluminescents, tres RIA i un LC-MS en dones i nens amb concentració de testosterona inferior a 100 ng/dL.

El 2007 Kane et al.<sup>150</sup> van avaluar la concentració de testosterona a l'interval corresponent a dones (entre 27,4 ng/dL i 143,63 ng/dL) utilitzant controls de qualitat del programa UK-NEQAS. Els resultats avaluats van mostrar que les plataformes més

utilitzades d'immunoquimoluminescència presenta un biaix similar i sobreestimant la concentració de testosterona respecte al procediment de referència. Els autors recomanen l'implantació de mètodes de LC-MS per a la mesura de la concentració de testosterona en nens i dones. Bell et al.<sup>151</sup> obtenen resultats similars a l'estudi anterior amb dones amb hiperandrogenisme, trobant diferències més elevades a concentracions baixes de testosterona donant lloc a errors de classificació de les pacients amb clínica d'hiperandrogenisme. Finalment al 2012 Huhtaniemi et al.<sup>161</sup> comparant la concentració de testosterona mesurades per una plataforma de quimioluminescència i un GC/MS en homes amb concentració mitjana de testosterona de 475 ng/dL van observar que l'immunoanàlisi presenta bona correlació amb el MS però a concentracions inferiors a 231 ng/dL no presenten bones característiques metrologicals.

En general, els estudis coincideixen en què els immunoanàlisi sobreestimen la concentració de testosterona, especialment al mesurar concentracions de testosterona inferior a 100 ng/dL.

Actualment la LC-MS s'ha convertit en tècnica de referència a la pràctica clínica. Els estudis de Thientpont et al. de 2008<sup>136</sup>, Vesper et al. de 2009<sup>152</sup> i els de Büttler et al 2015<sup>132</sup> i 2016<sup>153</sup>, avaluant la precisió i la correlació de diferents procediments de LC-MSMS demostren que aquests mètodes presenten bona precisió i exactitud a tot l'interval de mesura i que existeix poca variabilitat entre mètodes, variabilitat que es reduiria més amb l'estandardització de la seva mesura.

Destaca que cap d'aquests estudis ha inclòs pacients amb CaP sotmesos a castració, pel que no s'ha trobat evidència relacionada amb aquest tipus de patologia.

## **5. Conclusions:**

Tot i que no existeix literatura específica, l'evidència científica actual avala que la LC-MSMS és el mètode adequat per a mesurar concentracions baixes de testosterona en sèrum. És necessari definir la concentració de castració amb aquest mètode i la concentració òptima que es relaciona amb la millor evolució de la malaltia. Cal avançar en el procés d'estandarditzar la mesura de la concentració de testosterona.



REVIEW ARTICLE

A systematic review of methods for quantifying serum testosterone in patients with prostate cancer who underwent castration<sup>☆</sup>



I. Comas<sup>a,\*</sup>, R. Ferrer<sup>a</sup>, J. Planas<sup>b</sup>, A. Celma<sup>b</sup>, L. Regis<sup>b</sup>, J. Morote<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Bioquímica Clínica, Laboratoris Clínic, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Servicio de Urología, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 29 December 2016; accepted 4 January 2017

Available online 17 January 2018

KEYWORDS

Testosterone;  
Immunoassay;  
Mass spectrometry;  
Castration  
concentration

Abstract

**Background:** The clinical practice guidelines recommend measuring serum testosterone in patients with prostate cancer (PC) who undergo castration. The serum testosterone concentration should be <50 ng/dL, a level established by using a radioimmunoassay method. The use of chemiluminescent immunoassays (IA) has become widespread, although their metrological characteristics do not seem appropriate for quantifying low testosterone concentrations. The objective of this review is to analyze the methods for quantifying testosterone and to establish whether there is scientific evidence that justifies measuring it in patients with PC who undergo castration, through liquid chromatography attached to a mass spectrometry in tandem (LC-MSMS).

**Material and methods:** We performed a search in PubMed with the following MeSH terms: measurement, testosterone, androgen suppression and prostate cancer. We selected 12 studies that compared the metrological characteristics of various methods for quantifying serum testosterone compared with MS detection methods.

**Results:** IAs are standard tools for measuring testosterone levels; however, there is evidence that IAs lack accuracy and precision for quantifying low concentrations. Most chemiluminescent IAs overestimate their concentration, especially below 100 ng/dL. The procedures that use LC-MSMS have an adequate lower quantification limit and proper accuracy and precision. We found no specific evidence in patients with PC who underwent castration.

**Conclusions:** LC-MSMS is the appropriate method for quantifying low serum testosterone concentrations. We need to define the level of castration with this method and the optimal level related to better progression of the disease.

© 2017 AEU. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

<sup>☆</sup> Please cite this article as: Comas I, Ferrer R, Planas J, Celma A, Regis L, Morote J. Métodos para cuantificar la testosterona sérica en pacientes con cáncer de próstata sometidos a castración: una revisión sistemática. Actas Urol Esp. 2018;42:86–93.

\* Corresponding author.

E-mail address: icomas@vhebron.net (I. Comas).

## ESTUDI 2:

### 1. Introducció:

Les guies clíniques de CaP recomanen la mesura de la concentració de testosterona durant el tractament amb anàlegs de la LHRH per avaluar la seva eficàcia i per diagnosticar l'estat de resistència a la castració<sup>162</sup>. Es considera una concentració de testosterona de 50 ng/dL com a la concentració de castració, concentració establerta a la dècada del 1980 corresponent al límit de quantificació del RIA que s'utilitzava en aquells moments<sup>99</sup>.

Actualment els laboratoris clínics utilitzen plataformes de IA quimioluminescents per a la mesura de la concentració de testosterona que són sensibles, ràpids i econòmics. No obstant, presenten una menor precisió i reproductibilitat a concentracions baixes<sup>124,138,156</sup>.

### 2. Objectiu:

Aquest estudi va tenir per objectiu avaluar dos plataformes de IA quimioluminescents per a la mesura de la concentració de testosterona.

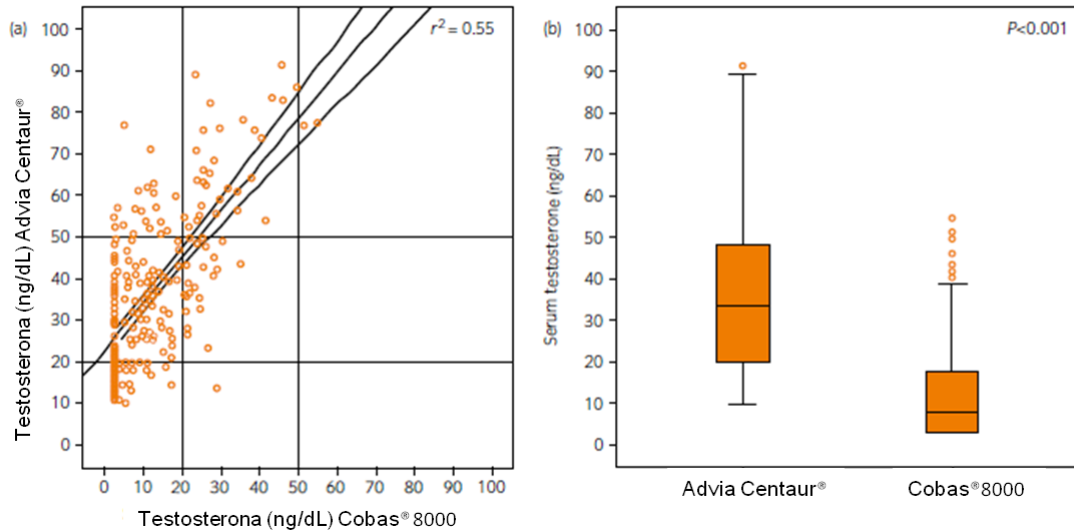
### 3. Material i mètodes:

Es va realitzar la mesura de la concentració de testosterona en 249 pacients (<10-91,6 ng/dL) de la nostra cohort amb CaP sotmesos a tractament amb anàlegs de la LHRH en dos analitzadors: Advia Centaur® XP i Cobas® 8000.

### 4. Resultats:

Les concentracions de testosterona mesurades al Cobas® 8000 (Roche) van ser significativament més baixes que les mesurades al Advia Centaur® XP (Siemens Healthineers;  $p < 0,001$ ). La correlació entre ambdós procediments va ser moderada,  $r^2 = 0,55$  (figura 14).

Figura 14: Comportament de la concentració de testosterona, segons l'equip de mesura, (a) diagrama de dispersió amb línia de regressió, (b) diagrama de caixa de la concentració de testosterona als dos equips.



## 5. Conclusions:

Aquest estudi destaca el diferent comportament de les dues plataformes de IA quimioluminescents per a la mesura de la concentració de testosterona en pacients amb CaP sotmesos a supressió androgènica. Ambdues plataformes utilitzen els propis anticossos i propis calibradors. Aquest fet podria comprometre l'avaluació de l'eficàcia del tractament així com el diagnòstic de la resistència a la castració.



**Urological Notes****Behavior of chemiluminescent assays to measure serum testosterone during androgen deprivation therapy**Juan Morote M.D., Ph.D.,<sup>1,3</sup> Inma Comas M.D.,<sup>2,3</sup> Jacques Planas M.D., Ph.D.,<sup>1,3</sup> Ana Celma M.D., Ph.D.,<sup>1,3</sup> Roser Ferrer M.D., Ph.D.,<sup>2,3</sup> and Lucas Regis M.D., Ph.D.<sup>1,3</sup>**Abbreviations & Acronyms**

ADT = androgen deprivation therapy  
CLIA = chemiluminescent assay  
CR = castration resistance  
FDA = Food and Drug Administration  
LC/GC MSMS = liquid or gas chromatography and tandem mass spectrometry  
LHRH = luteinizing hormone-releasing hormone  
LLOQ = lower level of quantification  
PCa = prostate cancer  
RIA = radioimmunoanalysis  
ST = serum testosterone

Departments of <sup>1</sup>Urology and <sup>2</sup>Biochemistry, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain, <sup>3</sup>Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain  
lregis@vhebron.net

DOI: 10.1111/iju.13180

PCa guidelines recommend ST measurement during ADT in order to evaluate its efficacy and to diagnose the CR status. Regulatory agencies and PCa guidelines consider 50 ng/dL as the castration level of ST, although some studies suggest that lower levels are associated with better outcomes of the disease.<sup>1</sup>

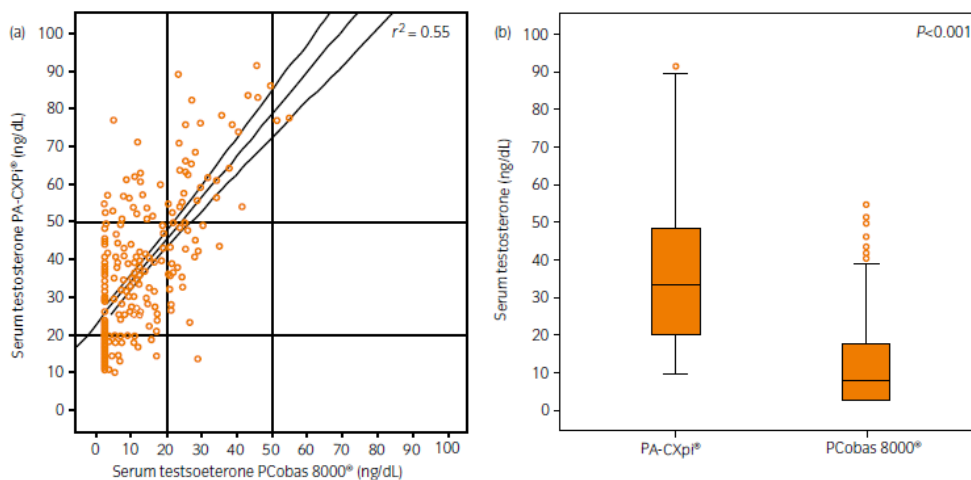
During the 1980s, the FDA established the castration level of ST at 50 ng/dL, based on studies carried out in patients who had undergone surgical castration. This level corresponded to the LLOQ from the RIAs that had been used so far.<sup>2</sup> In 2000, using a recently introduced CLIA, Oefelein *et al.* redefined the castration level of ST at 20 ng/dL in a group of 35 patients who had undergone surgical castration. The median level of ST was 15 ng/dL and the range 2–30 ng/dL. Surprisingly the level selected by the author corresponded to the 75th percentile of the distribution.<sup>3</sup> In 2007, Morote *et al.* also using a CLIA declared 32 ng/dL to be “the castrate level of ST with clinical impact” because it represented the lowest level of ST capable of significantly discriminating the progression-free survival of CR in a group of 73 non-metastatic PCa patients subjected to LHRH agonist.<sup>4</sup>

Nowadays, CLIA, which are usually integrated in automated platforms, are widely used in clinical practice to measure ST given that they are sensitive, fast and inexpensive. However CLIA have a disturbing lack of accuracy and reproducibility, especially at low levels.<sup>5</sup> That is why since 2007 the American Endocrine Society recommends only LC/GC MSMS to measure ST. These methods extract the testosterone in an initial step, avoiding its over detection caused by contamination mainly with other steroids, and MSMS ensures an accurate and reproducible measurement in a second step.<sup>5</sup> However, direct CLIA continue to be the most widely used method to determine ST in clinical practice.<sup>6,7</sup> Because of a recent change of the platforms used in our reference laboratory and the lack of information about the behavior of CLIA to measure ST in PCa patients undergoing ADT, we carried out a prospective study in order to evaluate two commercial CLIA.

Between July and December 2015, ST measurement was requested in 249 patients with histologically confirmed PCa undergoing continuous LHRH agonist treatment as part of their routine control. Blood collection was carried out between 08.00 and 10.00 hours, and two aliquots of serum were processed in the automated Cobas 8000 (Roche Diagnostics Inc., Indianapolis, IN, USA) (PC8000) and the Advia-Centaur XPI (Siemens, Munich, Germany) (PA-CXPI) platforms, both using CLIA to measure ST directly. The LLOQ were 2.5 and 10 ng/dL, respectively. According to the manufacturers' information, the intra-assay coefficients of variation ranged between 1.7% and 4.6% in the PC8000, and between 2.3% and 6.2% in PA-CXPI. The mean age of the study group was 74 years (range 48–89 years). ADT was indicated as the primary treatment in 89 patients (35.7%) with metastatic PCa, 118 (47.4%) patients who were treated with radiation therapy and 42 (16.9%) patients having a high risk of dissemination failure after primary treatment of PCa. The average period of LHRH agonist treatment was 19.6 months (range 4–57 months). The study was carried out in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration II, and written informed consent was obtained.

The levels of ST measured in the PC8000 were significantly lower than those measured in the PA-CXPI,  $P < 0.001$ , and the correlation between both measurements was only moderate,  $r^2 = 0.55$ . The median levels and ranges were 7.8 ng/dL (range <2.5–54.6 ng/dL) and 33.4 ng/dL (range <10–91.6 ng/dL), respectively. The 95th percentiles corresponded to 34.6 and 75.9 ng/dL, respectively. These levels were below 20 ng/dL, between 20 and 50 ng/dL, and above 50 ng/dL in 193 (77.5%), 54 (21.7%) and two (0.8%) cases in the PC8000, and 62 (24.9%), 134 (53.8%) and 53 (21.3%) cases in the PA-CXPI (Fig. 1).

The present study highlights the different behavior of direct CLIA to measure ST in PCa patients undergoing ADT. This fact could compromise the ADT efficacy evaluation as well as the diagnosis of CR. As the automated CLIA continue to be widely used to determine ST, because LC/GC MSMS technology is not available in most clinical laboratories, a careful selection of the CLIA used to measure ST in PCa patients under ADT is recommended.



**Fig. 1** Behavior of ST, according to the method of determination, (a) scatterplot of values with regression line, (b) boxplot analyzing the concentration of serum testosterone (median, 25th and 75th percentiles, minimum and maximum levels, and outlier values). PCobas 8000: automated Cobas 8000® platform, Roche. PA-CXPi: Advia-Centaur XPI, Siemens platform.

### Conflict of interest

None declared.

### References

- 1 Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J *et al*. EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part II: treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol.* 2014; **65**: 467-79.
- 2 The Leuprolide Study Group. Leuprolide versus diethylstilbestrol for metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 1984; **311**: 1281-6.
- 3 Oefelein M, Feng A, Scolieri M *et al*. Reassessment of the definition of castrate levels of testosterone: implications for clinical decision making. *Urology* 2000; **56**: 1021-4.

4 Morote J, Orsola A, Planas J *et al*. Redefining clinically significant castration levels in patients with prostate cancer receiving continuous androgen deprivation therapy. *J. Urol.* 2007; **178**: 1290-5.

5 Taieb J, Mathian B, Millot F *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; **49**: 1381-95.

6 Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Shuss 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 Morote J, Regis L, Celma A, Planas J. Serum testosterone assessment during androgen suppression: a systematic review. *Actas Urol. Esp.* 2016; pii: S0210-4806(16)00013-9.

### Editorial Comment

#### Editorial Comment to Behavior of chemiluminescent assays to measure serum testosterone during androgen deprivation therapy

I would like to congratulate Morote *et al.* for publishing such an important report.<sup>1</sup>

Morote *et al.* first reported that breakthrough increase of serum testosterone was the significant prognostic factor for progression-free survival in prostate cancer patients.<sup>2</sup> The clinical significance of serum testosterone levels for prostate cancer patients treated with androgen deprivation therapy has been widely recognized.

In addition to the said report, there have been several reports published in this decade to substantiate the prognostic impact of serum testosterone levels: Perachino *et al.*<sup>3</sup> showed that a serum testosterone level of 40 ng/dL at 6 months after starting androgen deprivation therapy was associated with overall survival; Bertaglia *et al.*,<sup>4</sup> Klotz *et al.*<sup>5</sup> and Kamada

*et al.*<sup>6</sup> showed that a serum testosterone level lower than 20 ng/dL was a good prognostic factor for prostate cancer patients. Recently, the development of abiraterone acetate has made it possible to block androgen synthesis almost completely, and it also highlights the clinical significance of monitoring extremely lower levels of serum testosterone of even less than 10 ng/dL.<sup>7</sup> Although a new castration level is now being discussed, as the authors mentioned, serum testosterone levels differ depending on the measurement methods; clinicians ought to take this point into consideration when comparing those reports, so as to redefine new and clinically useful castration levels.

In addition, two measurement instruments were evaluated in this study: the automated Cobas 8000 (Roche Diagnostics Inc.,

## ESTUDI 3:

### 1. Introducció:

Es recomana la mesura de la concentració de testosterona en sèrum per avaluar l'eficàcia del tractament amb anàlegs de la LHRH en pacients amb CaP i per a diagnosticar la resistència a la castració<sup>162</sup>. Actualment la concentració de castració és de 50 ng/dL<sup>99</sup>. La LC-MSMS és el mètode adequat per a mesurar la testosterona a concentracions baixes, no obstant, el procediment de mesura utilitzat als laboratoris clínics és IA quimioluminescent, aquests són automatitzables, ràpids, sensibles i econòmics, però presenten una menor baixa precisió i reproductibilitat<sup>138,139</sup>.

### 2. Objectiu:

Els objectius d'aquest estudi van ser:

- Comparar i correlacionar la concentració de testosterona en sèrum mesurada per IA quimioluminescent (Advia Centaur® XP, Siemens Healthineers) i un LC-MSMS en pacients amb CaP que reben tractament amb agonistes de la LHRH.
- Analitzar el número de pacients amb una concentració de testosterona inferior a 50 ng/dL amb ambdós procediments.
- Estimar la concentració de castració de testosterona en sèrum utilitzant el mètodes de LC-MSMS.

### 3. Material i mètodes

L'estudi va incloure 126 pacients de la base de dades de validació, als quals se'ls va realitzar l'extracció de sèrum per a la mesura de testosterona per un IA Advia Centaur® XP (Siemens Healthineers) i es va realitzar una alíquota per mesurar la concentració de testosterona mitjançant LC-MSMS, a un laboratori extern. Les alíquotes de sèrum es van emmagatzemar a -80°C per a processar-les en una mateixa sèrie.

Es va aplicar la prova U de Mann-Whitney per comparar la concentració de testosterona mesurada per IA i per LC-MSMS. Posteriorment es va analitzar la distribució de testosterona segons els intervals d'ús freqüent<sup>101</sup>: d'inferior a 20 ng/dL, de 20 a 50 ng/dL i superior a 50 ng/dL. Aquestes distribucions es van comparar amb la prova Kruskal-Wallis. Finalment la concentració de castració es va avaluar a partir del

percentil 95 de les distribucions després de transformació logarítmica donat que les dades no segueixen la distribució normal. Per a l'anàlisi es va utilitzar el programa SPSS versió 20.

#### 4. Resultats:

La figura 15 mostra la distribució de les concentracions de testosterona d'ambdós mètodes. Cap d'elles va seguir una distribució normal ( $p < 0,001$ ). Les gràfiques de caixa de les concentracions de testosterona es presenten a la figura 16.

La concentració mitjana de testosterona mesurada per IA i LC-MSMS va ser de 34,2 ng/dL (interval de confiança (IC) del 95%, 31,1-37,2 ng/dL) i de 17,9 ng/dL (IC 95%: 15,8-20,1 ng/dL), respectivament.

Després de la transformació logarítmica, el percentil 95 va ser de 66,5 ng/dL (IC 95%: 62,3-71,2 ng/dL) i 39,8 ng/dL (IC 95%: 37,1-43,4 ng/dL).

Figura 15: Histograma de la distribució de la concentració de testosterona mesurada (A) Advia Centaur®XP i (B) LC-MSMS.

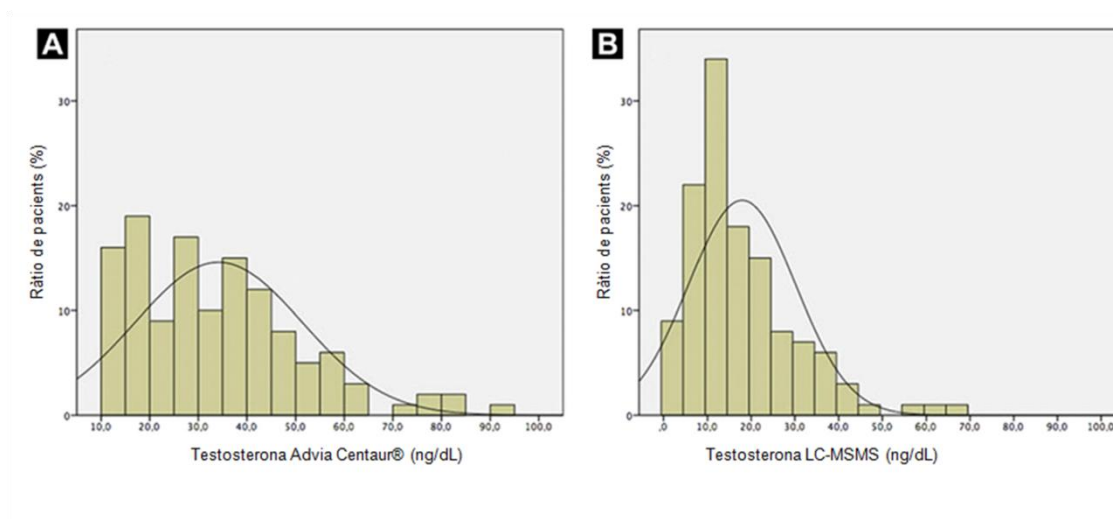
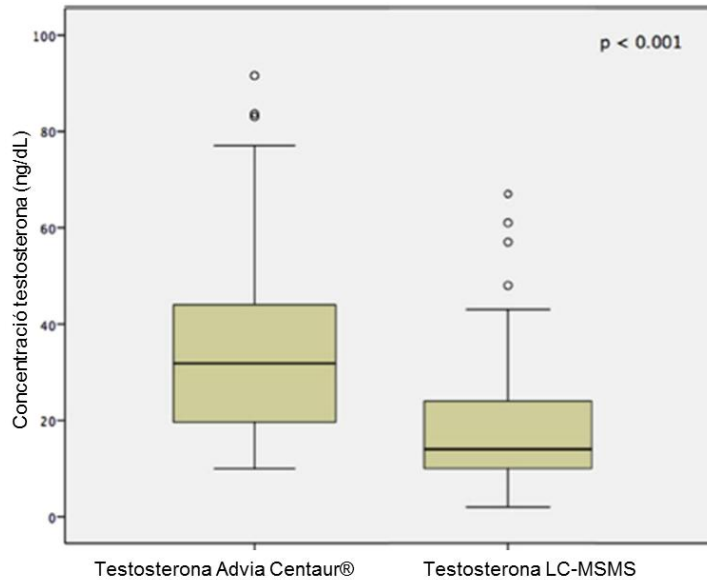
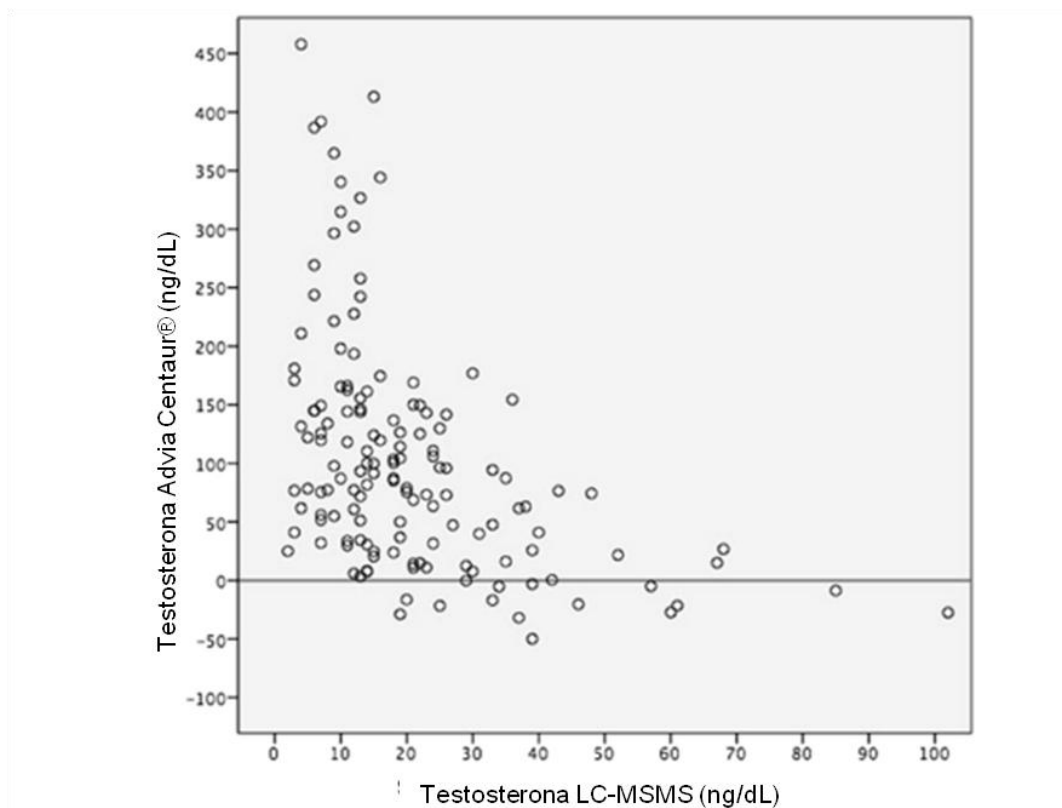


Figura 16: Diagrama de caixa de la concentració de testosterona mesurada Advia Centaur®XP i LC-MSMS.



El coeficient de correlació entre ambdues distribucions de concentració de testosterona va ser de  $r^2 = 0,644$ , observant-se una sobreestimació significativa de la mesura realitzada per IA. L'equació de la recta de regressió va ser la següent:  $y = 20,324 + 0,652x$ . La sobreestimació de la concentració de testosterona mesurada per IA va ser especialment alta a concentracions baixes de testosterona (<50 ng/dL) (figura 17).

Figura 17: Diagrama mostrant el percentatge de variació de la concentració de testosterona mesurada per IA comparada amb la mesurada per LC-MSMS.



La distribució de la concentració de testosterona per ambdós mètodes segons els intervals de concentració utilitzats es mostren a la taula 6. La concentració de testosterona mesurada per IA va ser inferior a 20 ng/dL en 34 pacients (27%), de 20 a 50 ng/dL en 72 pacients i superior a 50 ng/dL en 20 pacients (15,9%). Mesurant-la amb LC-MSMS, 83 pacients presenten una concentració de testosterona inferior a 20 ng/dL (65,9%), de 20 a 50 ng/dL en 40 pacients i superior a 50 ng/dL en 3 pacients (2,4%;  $p < 0,001$ ).

Taula 6: Distribució de la concentració de testosterona per ambdós mètodes segons els intervals de concentració.

Distribució Testosterona LC-MSMS (ng/dL)	Distribució Testosterona IA (ng/dL)			Total
	<20	20-50	>50	
<20	32 (35,4)	49 (38,9)	2 (1,6)	83 (65,9)
20-50	2 (1,6)	22 (17,5)	16 (12,7)	40 (31,7)
>50	0 (0,0)	1 (0,8)	2 (1,6)	3 (2,4)
<b>Total</b>	<b>34 (27)</b>	<b>72 (57,1)</b>	<b>20 (15,9)</b>	<b>126 (100)</b>

## **5. Conclusions:**

L'equip de IA sobreestima la concentració de testosterona en pacients amb CaP en tractament amb anàlegs de la LHRH. Per aquest motiu, la concentració de castració es considera inadequada quan es mesura la concentració de testosterona per aquest IA en quasi el 15% dels pacients. La concentració de castració utilitzant el mètode de referència és inferior a 50 ng/dL, de 39,8 ng/dL amb aquest mètode.



# Serum Testosterone Levels in Prostate Cancer Patients Undergoing Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonist Therapy

Juan Morote,<sup>1</sup> Inma Comas,<sup>2</sup> Jacques Planas,<sup>1</sup> Xavier Maldonado,<sup>3</sup> Ana Celma,<sup>3</sup> José Placer,<sup>3</sup> Roser Ferrer,<sup>2</sup> Joan Carles,<sup>4</sup> Lucas Regis<sup>1</sup>

## Abstract

Prostate cancer guidelines have recommended serum testosterone measurement during androgen deprivation therapy to assess its efficacy and diagnose castration resistance. The present study compared the testosterone levels from a widely used chemiluminescent assay (CLIA) and liquid chromatography tandem mass spectrometry method, which is the recommended method, in prostate cancer patients undergoing luteinizing hormone-releasing hormone agonist therapy. The CLIA overestimated the testosterone levels and suggested, incorrectly, the presence of inadequate castration in  $\leq 15\%$  of patients.

**Background:** Serum testosterone measurement is recommended to assess the efficacy of androgen deprivation therapy (ADT) and to diagnose castration resistance in patients with prostate cancer (PCa). Currently, the accepted castrate level of serum testosterone is 50 ng/dL. Liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC MSMS) is the appropriate method to measure testosterone, especially at low levels. However, worldwide, chemiluminescent assays (CLIAs) are used in clinical laboratories, despite their lack of accuracy and reproducibility, because they are automatable, fast, sensitive, and inexpensive. **Materials and Methods:** We compared serum testosterone levels measured using LC MSMS and CLIAs in 126 patients with PCa undergoing luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist therapy. **Results:** The median serum testosterone level was 14.0 ng/dL (range, 2.0–67.0 ng/dL) with LC MSMS and 31.9 ng/dL (range, 10.0–91.6 ng/dL) with CLIA ( $P < .001$ ). The serum testosterone levels, measured using LC MSMS, were  $< 20$  ng/dL in 83 patients (65.9%), 20 to 50 ng/dL in 40 (31.7%), and  $> 50$  ng/dL in 3 patients (2.4%). These ranges were found in 34 (27%), 72 (57.1%), and 20 (15.9%) patients when testosterone was measured using CLIA ( $P < .001$ ). The castrate level of serum testosterone using LC MSMS and CLIA was 39.8 ng/dL (95% confidence interval [CI], 37.1–43.4 ng/dL) and 66.5 ng/dL (95% CI, 62.3–71.2 ng/dL), respectively. **Conclusion:** We found that CLIA overestimated the testosterone levels in PCa patients undergoing LHRH agonist therapy. Thus, the castration level was incorrectly considered inadequate with CLIA in almost 15% of patients. The true castration level of serum testosterone using an appropriate method is  $< 50$  ng/dL.

*Clinical Genitourinary Cancer*, Vol. ■, No. ■, ■-■ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Androgen deprivation therapy, Chemiluminescence, LHRH agonist treatment, Mass spectrometry, Testosterone

<sup>1</sup>Department of Urology

<sup>2</sup>Department of Biochemistry

<sup>3</sup>Department of Radiation Oncology

<sup>4</sup>Department of Medical Oncology, Vall d'Hebron Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Submitted: Aug 7, 2017; Revised: Oct 18, 2017; Accepted: Oct 30, 2017

Address for correspondence: Lucas Regis, PhD, Department of Urology, Vall d'Hebron Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, PO Box Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain  
E-mail contact: lregis@vhebron.net

## Introduction

Prostate cancer (PCa) guidelines have recommended serum testosterone measurement during androgen deprivation therapy (ADT) to assess its efficacy and define castration resistance. Although different studies have highlighted better outcomes for patients with lower testosterone levels, regulatory authorities have considered the castration level of serum testosterone to be  $\leq 50$  ng/dL.<sup>1</sup>

During the 1980s, the Food and Drug Administration established the castration level of serum testosterone as  $\leq 50$  ng/dL. However, testosterone testing was limited at that time. This definition arose from previous studies of PCa patients who had



## ESTUDI 4:

### 1. Introducció:

Els anàlegs de la LHRH és el tractament de referència per a la supressió androgènica en pacients amb CaP. Les guies clíniques actuals recomanen mesurar la concentració de testosterona per avaluar l'eficàcia del tractament i per a diagnosticar la resistència a la castració<sup>162</sup>. No obstant la concentració de testosterona en sèrum en aquests pacients no només representa l'efecte de la castració sinó que també la producció extratesticular de testosterona<sup>163,164</sup>.

La castració mèdica, després de l'administració de l'anàleg de la LHRH, indueix una sobreproducció inicial de concentració de LH en sèrum seguida d'un ràpid bloqueig dels receptors de la glàndula pituïtària, induint una reducció severa de la concentració de LH en sèrum per retroacció negativa<sup>165</sup>.

La nostra hipòtesis va ser que la mesura de la concentració de LH en sèrum és més precisa que la concentració de testosterona en sèrum per avaluar l'activitat dels anàlegs de la LHRH.

### 2. Objectiu:

L'objectiu principal d'aquest estudi va ser avaluar si la concentració d'hormona LH en sèrum és millor marcador de castració en pacients en tractament amb anàlegs de la LHRH.

El segon objectiu va ser definir la concentració de castració de LH en sèrum i avaluar l'eficàcia d'aplicar aquesta concentració a la nostra base de dades de validació amb resultats de concentració de testosterona en sèrum mesurada amb LC-MSMS.

### 3. Material i mètodes:

Es va mesurar prospectivament la concentració en sèrum de la LH i la testosterona en 1238 homes: 1091 de la cohort d'estudi i 147 de la cohort de validació.

La cohort d'estudi estava formada per tres grups de pacients:

- Pacients "On anàlegs LHRH": 488 pacients en tractament continu amb l'anàleg durant més de tres mesos.

- Pacients “Off anàlegs LHRH”: 303 pacients que van rebre tractament amb anàlegs de la LHRH durant 24 a 36 mesos com a tractament neoadjuvant a la radioteràpia i que feia un mínim d'un mes que havien acabat el tractament amb anàlegs de la LHRH, per assegurar que no hi hagués efecte de l'anàleg.
- Grup control de pacients “No anàlegs LHRH” seleccionats a l'atzar de 864 homes que tenien programats biòpsia de pròstata degut a la sospita de CaP. Aquests mai van rebre tractament amb anàlegs ni inhibidors de la 5-alfa reductasa.

La cohort de validació on es va mesurar la concentració de testosterona en sèrum amb IA i LC-MSMS va incloure 124 pacients amb CaP “On anàlegs LHRH” i 19 pacients “Off anàlegs”.

Tant la concentració de LH com de testosterona es va mesurar per IA amb l'equip Advia Centaur® XP (Siemens Healthineers). La testosterona de la cohort de validació es va mesurar també per LC-MSMS al laboratori extern.

Es va analitzar la normalitat de distribució de les dades mitjançant la prova Shapiro-Wilks. Es van estimar els percentils 2.5, 25, 50, 75 i 97.5 de la concentració de LH i testosterona. Les comparacions entre dos o més grups es van realitzar amb la prova U de Mann-Whitney. Es van generar corbes ROC i es van calcular les àrees sota la corba. La concentració de castració de la LH es va estimar a partir de la cohort d'estudi i es van calcular la sensibilitat, especificitat i els valors predictius positius i negatius. Aquests anàlisis es van realitzar utilitzant el programa SPSS versió 20.

#### **4. Resultats:**

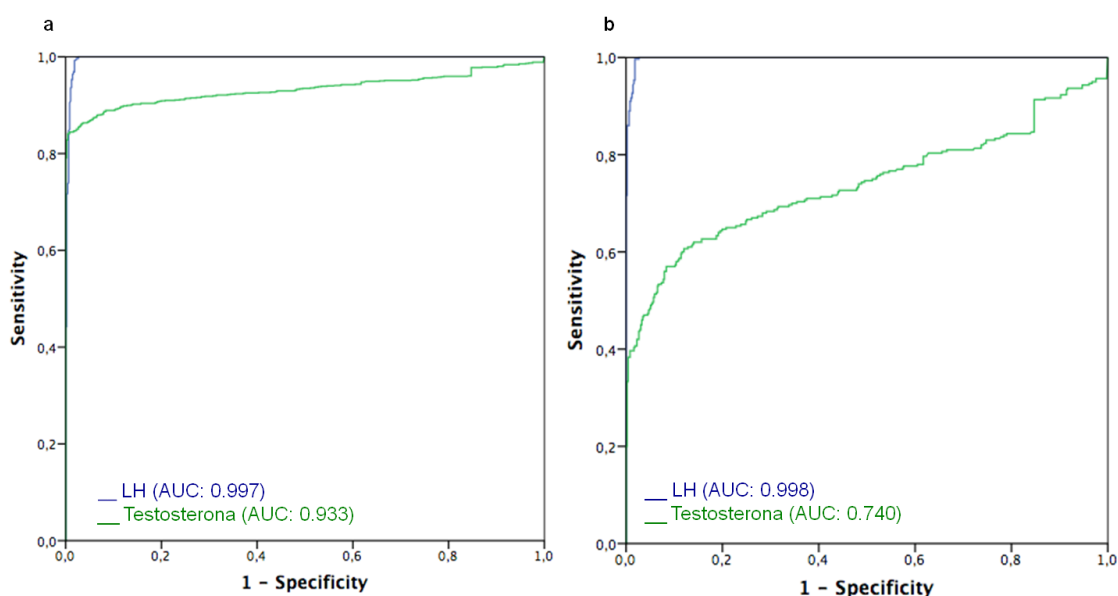
Els resultats obtinguts de concentració de LH i testosterona en sèrum a la cohort d'estudi es resumeixen a la taula 7. La mediana de concentració de LH al grup de pacients “On” estava per sota el límits de quantificació (inferior a 0,12 U/L), a diferència, la mitjana de concentració de LH del grup (“Off”) va ser més elevada (p 50: 8,69 U/L) que l'observada als pacients del grup de control que no havien estat mai en tractament amb anàlegs de la LHRH (“No anàlegs LHRH, p50: 4,45 U/L”,  $p < 0,001$ ). Respecte a la concentració de testosterona, la concentració més baixa es va observar al grup de pacients “On” (p50: 32,7 ng/dL). El grup “Off” presentaven una concentració de testosterona moderadament més alta (69,9 ng/dL,  $p < 0,001$ ), mentre que el grup de control “No anàlegs” la seva concentració era molt més alta (385,6 ng/dL,  $p < 0,001$ ).

Taula 7: Concentració de LH i testosterona mesurada per LCMSMS segons el grup de tractament amb l'anàleg LHRH.

	Concentració de LH				Concentració de Testosterona			
	p50	p25- p75	p2,5	p97,5	p50	p25- p75	p2,5	p97,5
<b>On anàleg</b>	0,12	0,12-0,12	0,12	0,85	32,7	23,8-44,9	11,6	78,4
<b>Off anàleg</b>	8,69	5,18-14,79	1,17	37,42	69,9	32,4-131,7	10	542,6
<b>NO anàleg</b>	4,45	3,11-4,46	1,39	16,51	385,6	294,5-506,4	182,9	745,7
<b>valor P On vs Off</b>	0,0001				0,0001			
<b>valor P On vs NO</b>	0,0001				0,0001			
<b>valor P Off vs NO</b>	0,0001				0,0001			

Les corbes ROC de la concentració de LH i la testosterona en sèrum per diferenciar els pacients “On” dels pacients “Off o No anàlegs LHRH” o “Off” es presenten a la figura 18. La AUC de la concentració de LH va ser de 0,998 i 0,997 respectivament, mentre que la testosterona va ser 0,993 i 0,740. La capacitat discriminativa de la concentració de LH per diferenciar els pacients “On anàlegs LHRH” d’aquells “Off o No anàlegs LHRH” va ser significativament millor que la observada amb la concentració de testosterona,  $p < 0,001$ .

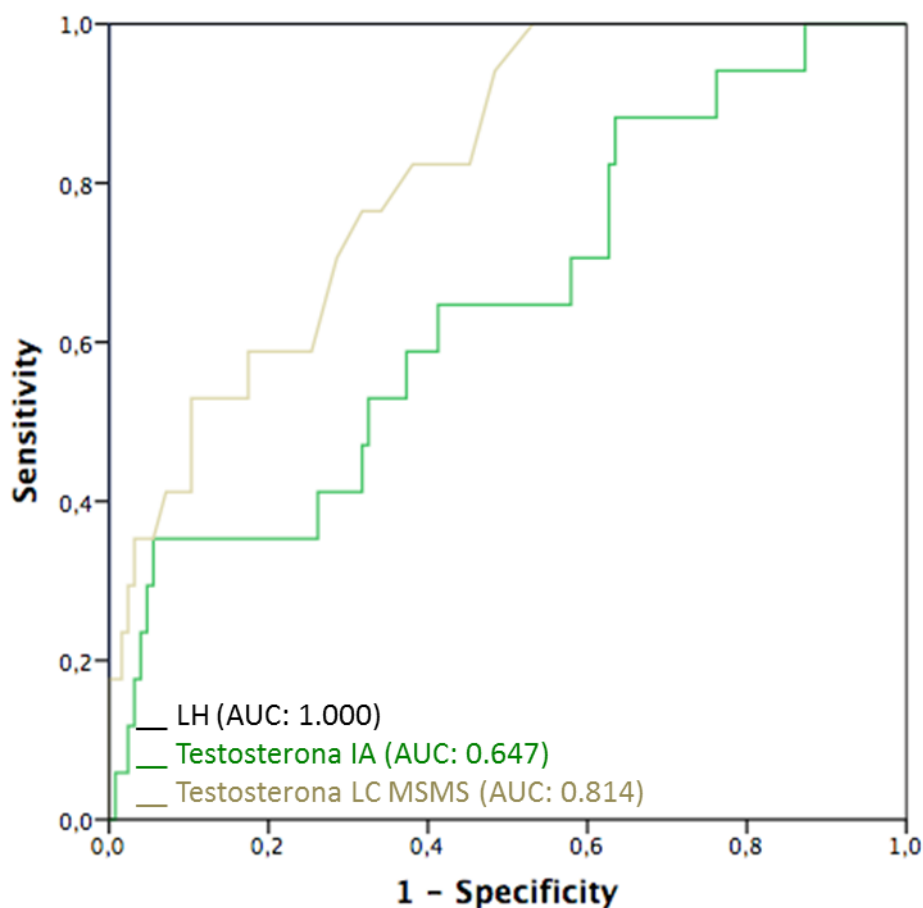
Figura 18: Corbes ROC de la concentració de LH i testosterona en sèrum per diferenciar els pacients “On” de: (a) pacients “Off” i “No anàlegs LHRH” i (b) només pacients “Off”.



La concentració de LH en sèrum més eficaç per distingir els pacients “On anàlegs LHRH” dels pacients “Off o No anàlegs de la LHRH” va ser de 1,1 U/L. Aquesta concentració de castració de LH distingeix el 99,1% dels pacients que estan en tractament amb anàlegs de la LHRH, mentre que la concentració de castració de testosterona de 50 ng/dL distingeix el 75,7% d'aquests pacients. La sensibilitat d'aquesta concentració és del 98,8% (482 dels 488 pacients “On”) i l'especificitat del 99,7% (302 dels 303 pacients “Off”). El valor predictiu positiu de la concentració de LH en sèrum inferior a 1,1 U/L va ser del 99,8% mentre que el valor predictiu negatiu va ser de 98,1%.

Les corbes ROC de la concentració de LH i de testosterona de la cohort de validació es presenten a la figura 19. La AUC per la concentració de LH 1,1 U/L va ser de 1,000, AUC de 0,647 quan es va mesurar la concentració de testosterona per IA i AUC de 0,814 quan es va mesurar per LC-MSMS,  $p < 0,001$ .

Figura 19: Corba ROC de la concentració de LH i testosterona en sèrum mesurada per IA o LC-MSMS, segons si estan en tractament amb l'anàleg de la LHRH.



Els paràmetres d'eficàcia per a una concentració de LH de 1,1 U/L i de testosterona de 50 ng/dL mesurada per IA i LC-MSMS es presenten a la taula 8.

Taula 8: Bondat diagnòstica de la concentració de castració de LH i la concentració de testosterona, mesurada per IA i LC-MSMS, per a diferenciar pacients amb CaP “On anàlegs LHRH” dels “Off anàlegs LHRH a la cohort de validació”.

	Sensibilitat (%)	ESP (%)	Eficiència (%)	VPP (%)	VPN (%)
<b>LH</b>	124/126 (98,4)	17/17 (100)	141/143(98,6)	124/124 (100)	17/19 (89,5)
<b>T IA</b>	106/126 (84,1)	6/17 (35,3)	112/143 (78,3)	106/117 (90,6)	6/26 (23,1)
<b>T MS</b>	123/126 (97,6)	5/17 (29,4)	128/143 (89,5)	123/135 (91,1)	5/8 (62,5)

ESP: Especificitat; T: Testosterona; VPP: Valor predictiu positiu; VPN: Valor predictiu negatiu

## 5. Conclusions:

La concentració de LH en sèrum és millor marcador de castració mèdica que la mesura de la concentració de testosterona en sèrum, independentment del mètode de mesura utilitzat per mesura la concentració de testosterona. La concentració de LH 1,1 presenta una millor AUC que la concentració de testosterona. Proposem la concentració de LH de 1,1 U/L com a concentració de castració de LH en sèrum capaç de distingir l'activitat de l'anàleg de la LHRH “On versus Off” amb una eficàcia del 99%. En base aquests resultats, l'avaluació de l'eficàcia dels anàlegs de la LHRH i especialment la definició de resistència a la castració s'hauria de redefinir.

RESEARCH

Open Access



# Accuracy of serum luteinizing hormone and serum testosterone measurements to assess the efficacy of medical castration in prostate cancer patients

Juan Morote<sup>1\*</sup>, Imma Comas<sup>2</sup>, Roser Ferrer<sup>2</sup>, Jacques Planas<sup>1</sup>, Anna Celma<sup>1</sup> and Lucas Regis<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonists are the standard for androgen deprivation therapy (ADT) in prostate cancer (PCa) patients. Current guidelines recommend serum testosterone measurement to assess the efficacy of ADT and to define castration resistance. However, serum testosterone does not reflect the exclusive effect of castration due to its extratesticular production. The aim of this study is to analyze if serum LH reflects better than serum testosterone the activity of LH-RH agonists.

**Methods:** Serum LH and serum testosterone were measured with chemiluminescent immunoassay (CLIA) in a cohort study of 1091 participants: 488 PCa patients "on LH-RH agonists", 303 "off LH-RH agonist" in whom LH-RH agonists were withdrawn, and 350 men with PCa suspicion "no LH-RH agonist" who never received LH-RH agonists. In a validation cohort of 147 PCa patients, 124 on "LH-RH agonists" and 19 "off LH-RH agonists", serum testosterone was also measured with liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC MSMS).

**Results:** The area under the curve (AUC) to distinguish patients "on versus off LH-RH agonists" was 0.997 for serum LH and 0.740 for serum testosterone,  $P < 0.001$ . The 97.5 percentile of serum LH in patients "on LH-RH agonists" was 0.97 U/L, been the most efficient threshold 1.1 U/L. The AUCs for serum LH, testosterone measured with CLIA and with LC MSMS, in the validation cohort, were respectively 1.000, 0.646 and 0.814,  $P < 0.001$ . The efficacy to distinguish patients "on versus off LH-RH agonists" was 98.6%, 78.3%, and 89.5% respectively, using 1.1 U/L as threshold for serum LH and 50 ng/dL for serum testosterone regardless the method.

**Conclusions:** Serum LH is more accurate than serum testosterone regardless the method, to distinguish patients "on versus off LH-RH agonists". The castrate level of serum LH is 1.1 U/L. These findings suggest that assessment of LH-RH agonist efficacy and castration resistance definition should be reviewed.

**Keywords:** Prostate cancer, Androgen deprivation therapy, LH-RH agonist, Testosterone, Luteinizing hormone

## Background

Medical castration with LH-RH agonists is currently the standard of ADT in patients with PCa [1]. PCa guidelines recommend measurements of testosterone in serum or plasma to assess the efficacy of ADT and also to define the castration resistance when biochemical or clinical progression appears [2]. The current castration

level of serum testosterone is up to 50 ng/dl; however, microelevations over this level are observed in up to 25% of PCa patients on LH-RH agonist [3]. The origin of these microelevations of serum testosterone remains unclear. They may be due to an inadequate castration or a response to a new administration of LH-RH agonist. An extratesticular over-production of testosterone in the adrenal cortex or in the tumour cells may be also considered [4]. These microelevations of serum testosterone have been associated with poorer disease outcomes [5, 6].

\* Correspondence: jmorote@vhebron.net

<sup>1</sup>Department of Urology, Vall d'Hebron Hospital, Universidad Autònoma de Barcelona, 14 Po Vall d'Hebron 119-129, 00173 Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

The behaviour of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis varies according to the type of castration. After surgical castration elevated levels of serum LH are present while medical castration promptly induces a severe reduction in serum LH due to the complete blockade of pituitary gland receptors [7]. After an acute LH-RH agonist administration an initial over-production of serum LH precedes the maximal blockade of pituitary LH receptors. This secondary flare of serum testosterone may induce clinical consequences avoidable with prophylactic administration of anti-androgens [8]. In contrast, LH-RH antagonist administration rapidly reduces serum LH and testosterone as surgical castration does [1]. The measurement of serum LH is sensible to assess the effect of LH-RH agonists or antagonists [9].

The method to measure serum testosterone is crucial [10]. Nowadays chemiluminescent immunoassays (CLIAs) are worldwide used because they are sensitive, automatable, fast and cheap. However, due to their lack of accuracy and reproducibility, they are not recommended especially to measure low levels of testosterone [11]. The only recommended methods to measure serum testosterone are those based on previous chromatography and mass spectrometry [12].

Our hypothesis is that serum LH measurements are more accurate than serum testosterone to assess the activity of LH-RH agonists. The main objective of this study was to demonstrate that serum LH correlates better than serum testosterone with LH-RH agonist's activity. Secondary objectives were to define the castrate level of serum LH and to validate previous results when serum testosterone was measured with liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC MSMS).

## Methods

### Design and participants

We prospectively measured serum LH and serum testosterone in 1238 men divided into a study cohort of 1091 participants and a validation cohort of 147. In the study cohort, 791 participants had histologically confirmed PCa and received LH-RH agonist. A subset of 488 patients "on LH-RH agonist" were on continuous treatment for longer than 3 months, and 303 patients "off LH-RH agonists" received LH-RH agonists for 24 to 36 months as a neoadjuvant treatment to radiotherapy. In all of these participants the activity of LH-RH agonist finished at least 1 month before the biochemical measurements. A control group of 350 men "no LH-RH agonist" with similar age was randomly selected from 864 men scheduled to prostatic biopsy due to PCa suspicion. Men of this control group never received LH-RH agonists or 5-alpha reductase inhibitors. The validation cohort, where serum testosterone was measured with CLIA and LC MSMS, included 124 PCa patients "on LH-RH agonists" and 19 "off LH-RH agonists".

### Measurements of serum LH and testosterone

Blood collection took place between 8:00 and 10:00 am, and serum was extracted from the samples. LH was measured with CLIA using the automated platform Advia-Centaur XPI\* (Siemens Inc., NY). The lowest level of quantification (LLOQ) was 0.12 U/L, and according to the manufacturer the intra-assay coefficient of variation ranged between 2.3% and 3.0%, and the inter-assay coefficient of variation between 1.5% and 2.9%. Testosterone was also measured with CLIA, using the automated platform Advia-Centaur XPI\* (Siemens Inc., NY). The LLOQ was 10 ng/dL, and according to the manufacturer, the intra-assay coefficient of variation ranged between 2.3% and 6.2%, and the inter-assay coefficient of variation between 2.7% and 6.9% (Manufacturer information: 10629910\_ES Rev. U, 2014-08, 1-18). Testosterone was also measured with LC MSMS in the validation cohort. An ultra high-pressure liquid chromatography with the 1290 Infinity Binary LC System (Agilent Technologies, Santa, CA) was performed. The system is connected in parallel to a tandem mass spectrometry using the 6430 Series Triple Quadruple LC/MS System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The LLOQ was 2 ng/dL and the intra-assay coefficient of variation ranged from 4% to 5% and the inter-assay coefficient of variation between 7% and 8%, at levels of ST below 50 ng/dL [13].

### Statistic analysis

The behaviours of serum LH and serum testosterone were analysed in every group using the Shapiro test. The 2.5, 25, 50, 75, and 97.5 percentiles of serum LH and testosterone were estimated and also after their logarithmic transformation if no kurtotic distribution was observed [14]. Comparisons between two or more groups were carried out with the Mann Whitney U test and the Kruskal-Wallis test. ROC curves were generated and areas under the curve (AUC) were calculated and compared. The castration level of serum LH was estimated from the study cohort, and sensitivity, specificity and positive and negative predictive values (PPV and NPV) were calculated. Up to 50 ng/dl was considered the castration level of serum testosterone regardless of the method used [2]. This analysis was carried out using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 20.

### Results

Serum LH and serum testosterone did not follow a kurtotic distribution in any group,  $P < 0.001$ . The median age was 70 years in patients "on LH-RH agonists", 71 years in patients "off LH-RH agonists" and 70 years in men "no LH-RH agonists",  $P = 0.367$ . Statistics analysing serum LH and serum testosterone levels in the study cohort are summarized in Table 1. The median serum LH was below the LLOQ in patients "on LH-RH



**Table 1** Levels of serum LH and testosterone according to LH-RH agonist activity

Group	Serum LH <sup>a</sup>				Serum testosterone			
	p 50	p 25-p75	p 2.5	p 97.5	p 50	p 25-p 75	p 2.5	p 97.5
On LH-RH agonist	0.12	0.12-0.12	0.12	0.85	32.7	23.8-44.9	11.6	78.4
Off LH-RH agonist	8.69	5.18-14.79	1.17	37.42	69.9	32.4-131.7	10.0	542.6
Never LH-RH agonist	4.45	3.11-4.46	1.39	16.51	385.6	294.5-506.4	182.9	745.7
<i>P</i> value On vs Off	0.0001				0.0001			
<i>P</i> value On vs No	0.0001				0.0001			
<i>P</i> value Off vs No	0.0001				0.0001			

<sup>a</sup>Luteinizing hormone; Values of LH and testosterone expressed as percentiles

agonist". In fact, the 75th percentile was below 0.12 U/L. In contrast, the median of serum LH in the group of patients "off LH-RH agonists" was higher than the observed in men who never received an LH-RH agonist,  $P < 0.001$ . The trend for serum testosterone was somewhat different. The lowest level of testosterone was observed in patients "on LH-RH agonists". Patients "off LH-RH agonists" had a moderately high level of serum testosterone,  $P < 0.001$ , while a much higher amount was recorded in men who never received LH-RH agonist,  $P < 0.001$ .

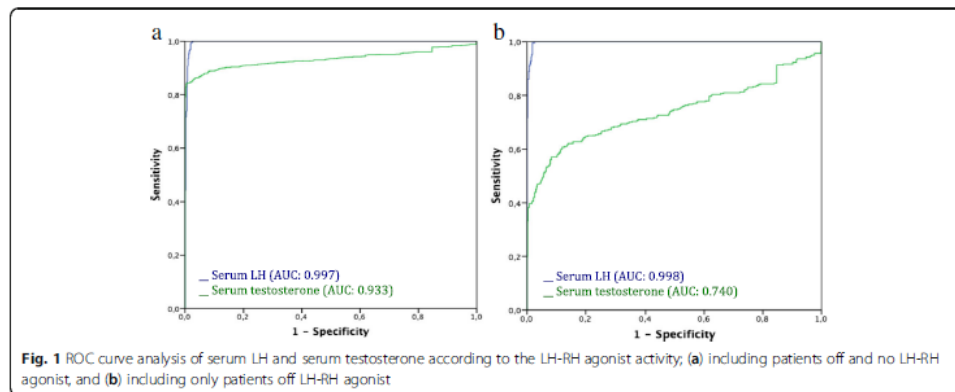
The ROC curves of serum LH and serum testosterone to distinguish patients "on LH-RH agonist" from those "off or no LH-RH agonists" are presented in Fig. 1. The AUCs of serum LH were 0.998 and 0.997 respectively, while those of serum testosterone were 0.993 and 0.740. The efficacy of serum LH to distinguish patients "on LH-RH agonists" from those "off or no LH-RH agonists" was significantly higher than the observed for serum testosterone,  $P < 0.001$ .

The 97.5th percentile of serum LH in the subset of patients "on an LH-RH agonist" was 0.85 U/L and increased to 0.97 U/L after its logarithmic transformation. However, the most efficient threshold of serum LH to distinguish patients "on LH-RH agonists" from those "off or no LH-RH agonists" was 1.1 U/L. The efficacy parameters

of 1.1 U/L of serum LH and 50 ng/dL of serum testosterone are presented in Table 2. The castrate level of serum LH distinguished 99.1% of patients while serum testosterone 75.7%. The probability to be "on LH-RH agonist" when serum LH was lower than 1.1 U/L was 99.8%, while the likelihood of being "off or no LH-RH agonists" when serum LH was higher than 1.1 U/L was 98.1%. The PPV and NPV of serum testosterone were 78.5% and 75.1%, respectively.

The ROC curves of serum LH and serum testosterone in the validation cohort are presented in Fig. 2. The AUC of serum LH was 1.000, been 0.647 when serum testosterone was measured with CLIA and 0.814 when it was measured with LC MSMS,  $P < 0.001$ .

The parameters of efficacy for 1.1 U/L of serum LH and 50 ng/dL for serum testosterone measured with CLIA and LC MSMS are presented in Table 3. The efficacy rates for distinguishing patients "on versus off LH-RH agonist" were 98.6%, 78.3% and 89.5%, respectively. Serum LH PPV and NPV were 100% and 89.5% respectively. Serum testosterone PPV and NPV were 90.6% and 23.1% when it was measured with CLIA and 91.1% and 62.5% respectively when it was measured with LC MSMS.



**Fig. 1** ROC curve analysis of serum LH and serum testosterone according to the LH-RH agonist activity; (a) including patients off and no LH-RH agonist, and (b) including only patients off LH-RH agonist



**Table 2** Serum LH and testosterone efficacy parameters according to "on versus off LH-RH agonist" in the cohort study

Marker	Sensitivity	Specificity	Efficiency	PPV <sup>a</sup>	NPV <sup>b</sup>
Serum LH <sup>c</sup>	482/488 (98.8)	302/303 (99.7)	784/791 (99.1)	482/483 (99.8)	302/308 (98.1)
Serum testosterone	408/488 (83.6)	191/303 (63.0)	599/791 (75.7)	408/520 (78.5)	191/271 (70.5)

<sup>a</sup>PPV Positive predictive value, <sup>b</sup>NPV Negative predictive value, <sup>c</sup>LH Luteinizing hormone

### Discussion

This is the first study to analyse the accuracy of serum LH and serum testosterone as markers of medical castration in patients undergoing LH-RH agonists. Our results suggest that serum LH can better distinguish patients on LH-RH agonist from those off LH-RH agonist than serum testosterone does distinguish.

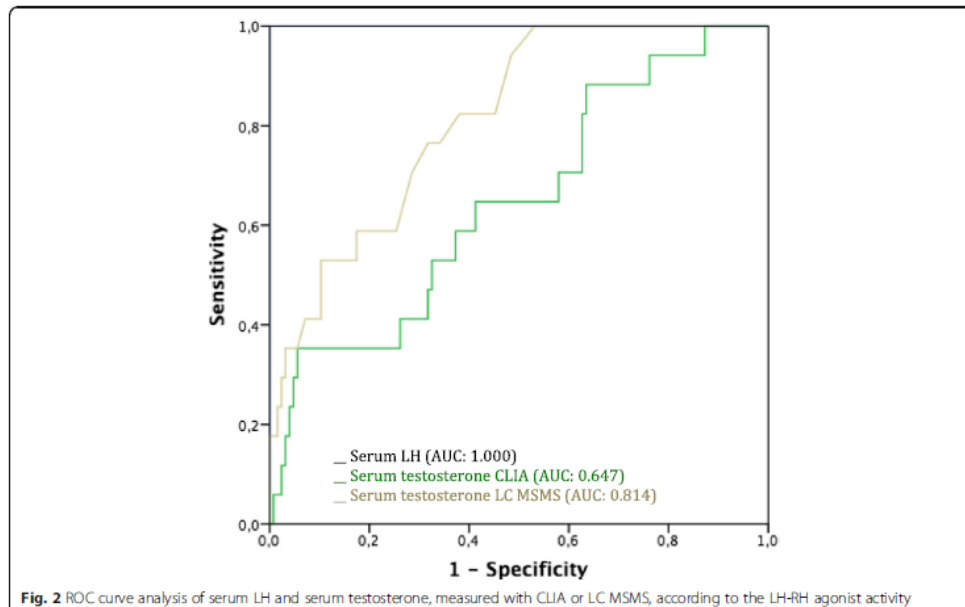
Under normal conditions, between one and 2% of serum testosterone amount is synthesised in the adrenal glands [15]. Evidence exists that testosterone may also be produced by prostate cancer cells as well [4, 16]. Microelevations of serum testosterone in patients undergoing LH-RH agonists are therefore not always secondary to an inadequate castration [3].

The acute injection of an LH-RH agonist prompts the marked release of LH, whereas prolonged administration produces inhibitory effects. Repeated injections of LH-RH agonists and the use of depot preparations suppress the function of pituitary gonadotrophs and the secretion of gonadotropins [17]. As a consequence of this serum LH

behaviour following LH-RH agonist administration, serum testosterone level increases due to a previous increase of serum LH; decreasing to castration levels usually occurs within 4 weeks after treatment [18]. The initial rise in serum testosterone does not take place if LH-RH antagonists are administered and castration levels of serum testosterone are reached within a few hours, which is similar to what happens after surgical castration [19].

The behaviour of serum testosterone and serum LH after LH-RH agonist withdrawal has also been studied. The overall impression is that serum testosterone recovery may be slow, especially following a long administration of LH-RH agonists, while serum LH quickly increases after LH-RH withdrawal, reaching levels greater than those observed before LH-RH agonist administration [18, 20, 21]. Serum LH measurement has been used to analyse the switch from LHRH antagonists to LH-RH agonists; it has been noted that it remains low and stable during this manoeuvre [22, 23].

The first objective of our study was to demonstrate that serum LH correlates better than serum testosterone with



**Fig. 2** ROC curve analysis of serum LH and serum testosterone, measured with CLIA or LC MSMS, according to the LH-RH agonist activity

**Table 3** Serum LH and testosterone efficacy parameters according to “on versus off LH-RH agonist” in the validation cohort

Marker	Sensitivity	Specificity	Efficiency	PPV <sup>a</sup>	NPV <sup>b</sup>
Serum LH <sup>c</sup>	124/126 (98.4)	17/17 (100)	141/142(98.6)	124/124 (100)	17/17 (89.5)
Serum testosterone (CLIA) <sup>d</sup>	106/126 (84.1)	6/17 (35.3)	112/143 (78.3)	106/117 (90.6)	6/26 (23.1)
Serum testosterone (LC MSMS) <sup>e</sup>	123/126 (97.6)	5/17 (29.4)	128/143 (89.5)	123/135 (91.1)	5/8 (62.5)

<sup>a</sup>PPV positive predictive value, <sup>b</sup>NPV negative predictive value, <sup>c</sup>LH Luteinizing hormone, <sup>d</sup>CLIA Chemiluminiscent immunoassay, <sup>e</sup>LC MSMS Liquid chromatography tandem mass spectrometry

the active treatment of LH-RH agonists. The ROC curves clearly indicate that the ability of serum LH to distinguish between patients currently on LH-RH agonists and those who are off LH-RH agonists is superior to that of serum testosterone, even when it is measured using LC MSMS. There is no information in the literature to compare our results with. In our study we confirm, though, a similar behaviour of serum testosterone when measured using CLIA as we had observed in our previous studies [3, 24].

Our second objective was to define the castration level of serum LH in patients undergoing LH-RH agonist, which had never been described before. We estimated this level from the 97.5 percentile of serum LH distribution in patients on LH-RH agonist, after its logarithmic transformation. The overlap of serum LH values in patients “on LH-RH” agonists and “off LH-RH” agonist was also considered. We finally established in 1.1 U/l the most efficient threshold, which was able to classify adequately the 99.1% of patients in the study cohort and the 98.6% in the validation cohort.

Finally, our tertiary objective was to validate the previous results in a validation cohort of patients in whom serum testosterone was measured simultaneously with CLIA and LC MSMS as reference method [11]. Here, the ROC curves reproduced similar results than those observed in the study cohort. The effectiveness of serum LH to distinguish patients “on versus off” LH-RH agonists was 98.6%, which was significantly higher than the 78.3% and 89.5% observed when testosterone was measured respectively with CLIA and LC MSMS.

Our data indicated that serum LH is better marker of medical castration than serum testosterone regardless the method. A limitation of our study was the difficulty to know the exact moment when a patient loses the effect of LH-RH agonist, especially in those patients using long-depot formulations. The behaviour of serum testosterone after LH-RH agonist withdrawal is well known through the intermittent ADT studies [25]; however, less is known after long periods of continuous LH-RH agonist treatment [21]. Moreover, there is a lack of knowledge about the exact behaviour of serum LH after LH-RH agonist withdrawal because the actual CLIA were not always used in the past [26]. The dynamics of serum LH after LH-RH agonist withdrawal remains unclear and should be analysed in well-designed prospective longitudinal studies.

## Conclusions

Serum LH is better marker of medical castration than serum testosterone is, regardless the method of measurement. Serum LH is able to distinguish patients “on versus off” LH-RH agonists with higher accuracy than serum testosterone does. We propose 1.1 U/l as the castrate level of serum LH, which is able to distinguish patients “on versus off” LH-RH agonist activity with an efficacy similar to 99%. Based on these findings, the assessment of LH-RH agonists efficacy and especially the definition of castration resistance should be redefined.

## Abbreviations

ADT: Androgen deprivation therapy; AUC: Area under the curve; CLIA: Chemiluminiscent immunoassay; LC MSMS: Liquid chromatography tandem mass spectrometry; LH: Luteinizing hormone; LH-RH: Luteinizing hormone releasing hormone; LLOQ: Lowest level of quantification; NPV: Negative predictive value; PCa: Prostate cancer; PPV: Positive predictive value; ROC: Receiver operating characteristic

## Acknowledgements

Not applicable.

## Funding

None.

## Availability of data and materials

Not applicable.

## Authors' contributions

JM and JP conceived design and basic concepts. IC and RF performed laboratory determinations. AC, JP and LR provided patients data. JM performed statistical analysis and wrote the article. All authors read and approved the final version of the final manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the ethical committee of Vall d'Hebron research institute, (PR/AG 048-2016). Samples were collected after obtaining informed consent from subjects and the methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

## Consent for publication

We accept the conditions of submission and the BioMed Central Copyright and License Agreement.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Department of Urology, Vall d'Hebron Hospital, Universidad Autonoma de Barcelona, 14 Po Vall d'Hebron 119-129, 00173 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Vall d'Hebron Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Received: 25 July 2017 Accepted: 7 October 2017  
Published online: 22 October 2017

#### References

- Rick RG, Block NL, Schally AV. Agonists of luteinizing hormone-releasing hormone in prostate cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14(2):237–47.
- Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*. 2014;65:467–79.
- Morote J, Planas J, Salvador C, Raventos CX, Catalan R, Reventos J. Individual variations of serum testosterone in patients with prostate cancer receiving androgen deprivation therapy. *BJU Int*. 2009;103:332–55.
- Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, Hess DL, Kalhorn TF, Higano CS, et al. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res*. 2008;68(4):447–54.
- Morote J, Orsola A, Planas J, Trilla E, Raventos CX, Cecchini L, et al. Redefining clinically significant castration levels in patients with prostate cancer receiving continuous androgen deprivation therapy. *J Urol*. 2007;178:1290–5.
- Klotz L, O'Callaghan C, Ding K, Toren P, Dearnaley D, Higano CS, et al. Nadir testosterone within first year of androgen-deprivation therapy (ADT) predicts for time to castration-resistant progression: a secondary analysis of the PR-7 trial of intermittent versus continuous ADT. *J Clin Oncol*. 2015;33(11):151–6.
- Østergren PB, Kistorp C, Fode M, Henderson J, Bennedbaek FN, Faber J, et al. Luteinizing hormone-releasing hormone agonists are superior to subcapsular Orchiectomy in lowering testosterone levels of men with prostate cancer: results from a randomized clinical trial. *J Urol*. 2017;197:441–7.
- St-Arnaud R, Lachance R, Kelly SJ, Belanger A, Dupont A, Labrie F. Loss of luteinizing hormone bioactivity in patients with prostatic cancer treated with an LHRH agonist and a pure antiandrogen. *Clin Endocrinol*. 1986;24:21–30.
- Moul JW. Prostate cancer: making the switch from LHRH antagonist to LHRH agonist. *Nat Rev Urol*. 2012;9:125–6.
- Comas I, Ferrer R, Planas J, Celma A, Regis L, Morote J. A systematic review of methods for quantifying serum testosterone in patients with prostate cancer who underwent castration. *Actas Urol Esp*. 2017. doi:10.1016/j.acuro.2017.01.007.
- 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.
- Rosner W, Vesper H, Endocrine S, American AFCC, American AOCE, Androgen ES, American SFBAMR, American SFRM, American UA, Association OPHL, Endocrine S, Laboratory COA, North AMS, Pediatric ES. Toward excellence in testosterone testing: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:4542–8.
- Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Pattison EG, Bunker AM, Fitzgerald RL, et al. Performance characteristics of a novel tandem mass spectrometry assay for serum testosterone. *Clin Chem*. 2006;52:120–8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; proposed guideline—third edition. CLSI document EP28-A3. Wayne: CLSI; 2010.
- Rove KO, Debruyne FM, Djavan B, Gomella LG, Koul HK, Lucia MS, et al. Role of testosterone in managing advanced prostate cancer. *Urology*. 2012;80:754–62.
- Regis L, Planas J, Carles J, Maldonado X, Comas I, Ferrer R, et al. Free testosterone during androgen deprivation therapy predicts castration-resistant progression better than Total testosterone. *Prostate*. 2017;77:14–20.
- Engel JB, Schally AD. Drug insight: clinical use of agonists and antagonists of luteinizing-hormone-releasing hormone. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3:157–67.
- Shahidi M, Norman AR, Gadd J, Huddart RA, Horwich A, Dearnaley DP. Recovery of serum testosterone, LH and FSH levels following neoadjuvant hormone cytoreduction and radical radiotherapy in localized prostate cancer. *Clin Oncol*. 2001;13:291–5.
- Crawford ED, Tombal B, Miller K, Boccon-Gibod L, Schröder F, Shore N, et al. A phase III extension trial with a 1-arm crossover from leuprolide to degarelix: comparison of gonadotropin-releasing hormone agonist and antagonist effect on prostate cancer. *J Urol*. 2011;186:889–97.
- Egawa S, Okusa H, Matsumoto K, Suyama K, Baba S. Changes in prostate-specific antigen and hormone levels following withdrawal of prolonged androgen ablation for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2003;6:245–9.
- Planas J, Celma A, Placer J, Cuadras M, Regis L, Gasanz C, et al. Hormonal response recovery after long-term androgen deprivation therapy in patients with prostate cancer. *Scand J Urol*. 2016;50:425–8.
- Garnick MB, Mottet N. New treatment paradigm for prostate cancer: abarelix initiation therapy for immediate testosterone suppression followed by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *BJU Int*. 2012;110:499–504.
- Miyazawa Y, Kato H, Arai S, Furuya Y, Sekine Y, Nomura M, et al. Clinical endocrinological evaluation of the gonadal axis (testosterone, LH and FSH) in prostate cancer patients switched from a GnRH antagonist to a LHRH agonist. *Basic Clin Androl*. 2015;25:7–15.
- Morote J, Esquina S, Abascal JM, Trilla E, Cecchini L, Raventos CX, et al. Failure to maintain a suppressed level of serum testosterone during long-acting depot luteinizing hormone-releasing hormone agonist therapy in patients with advanced prostate cancer. *Urol Int*. 2006;77:135–8.
- Hussain M, Tangen CM, Berry DL, Higano CS, Crawford ED, Liu G, et al. Intermittent versus continuous androgen deprivation in prostate cancer. *N Engl J Med*. 2013;368:1314–25.
- Huhtaniemi I, Venho P, Jacobi G, Rannikko S. Response of circulating gonadotropin levels to GnRH agonist treatment in prostatic cancer. *J Androl*. 1991;12:46–53.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



## CARTA A L'EDITOR 1:

Pels resultats obtinguts als estudis citats, i donat que les guies clíniques de CaP recomanen mesurar la concentració de testosterona en pacients amb CaP durant la supressió androgènica, es va escriure una carta a l'editor del *European Urology*, que va considerar aquesta carta un comentari a les guies de CaP de *l'European Association of Urology*. En aquesta rèplica es posa de manifest la necessitat de mesurar la testosterona sèrica amb un mètode apropiat i definir la seva concentració de castració. Tanmateix, l'observació de la gran eficàcia de la mesura de la concentració de LH com a marcador de castració mèdica ens va fer suggerir que aquesta podria ser el mètode per a avaluar l'eficàcia de la castració mèdica, proporcionant una informació valuosa si s'aconsegueixen concentracions de testosterona inferiors a 50 ng/dL, mesurades amb LCMSMS.

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)  
journal homepage: [www.europeanurology.com](http://www.europeanurology.com)



## Letter to the Editor

Re: Nicolas Mottet, Joaquim Bellmunt, Erik Briens, et al. EAU-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology; 2017. <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer>

### How to Assess the Efficacy of Medical Castration

Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonists are the standard for androgen deprivation therapy (ADT) in patients with prostate cancer (PCa). The European Urology Association guideline on PCa [1] recommends serum testosterone measurement during ADT to assess its efficacy and diagnose castration resistance. The castrate level of serum testosterone remains at 50 ng/dl, although recent studies have suggested better outcomes for patients who reach lower levels.

We would like to point out that the castrate level of serum testosterone was established during the early 1980s using patients who had undergone surgical castration and the lowest sensitivity limit of the radioimmunoassays used so far. We also would like to highlight that all the recent studies seeking to identify the optimal level of serum testosterone during medical castration have been carried out using chemiluminescent assays (CLIAs) [2]. CLIAs have been used in clinical laboratories worldwide since the late 1990s given that they are very sensitive, fast, and inexpensive and can be automated, despite a disturbing lack of accuracy and reproducibility especially, when low levels of testosterone are measured. This was the reason why in 2007 the American Endocrine Society and the Centre for Disease Control and Diagnosis recommended only methods using chromatography and mass spectrometry to measure testosterone, especially in children and women [3].

We are therefore facing a PCa guideline recommendation to measure serum testosterone during ADT, but without any specification regarding the appropriate method that should be used.

We recently confirmed the lack of accuracy of CLIAs compared to liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in measuring serum testosterone levels in PCa patients undergoing LH-RH agonist therapy. We found that the proportion of patients with serum testosterone >50 ng/dl was up to 16% when a widely

adopted commercial CLIA was used, but was <5% when LC-MS/MS was used [4]. Moreover, we demonstrated that serum LH reflects LH-RH agonist activity much better than serum testosterone does, even if the latter is measured via LC-MS/MS. We established a castrate level of serum LH of 1.1 U/l, and this level was able to distinguish between serum testosterone microelevations >50 ng/dl due to extratesticular production and those associated with inadequate castration [5].

To summarize, serum LH measurement is the best way to assess the efficacy of an LH-RH agonist; however, knowing the true serum testosterone level may be of help. Serum testosterone >50 ng/dl does not always reflect inadequate castration, and may actually represent extratesticular production. Similarly, serum testosterone <50 ng/dl does not always reflect optimal castration, as serum testosterone can remain below 50 ng/dl without the effect of an LH-RH agonist. A definition of the optimal castrate level of serum testosterone according to an appropriate measurement method is needed. New treatment strategies for metastatic hormone-naïve PCa seem to have benefit, but possibly not for all patients. Identification of patients who have undergone suitable castration and reach an optimal castrate level of serum testosterone may be important.

**Conflicts of interest:** The authors have nothing to disclose.

### References

- [1] Mottet N, Bellmunt J, Briens E, et al. EAU-ESTRO-ESUR-SIOG guidelines on prostate cancer. European Association of Urology; 2017 <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer>
- [2] Morote J, Regis L, Celma A, Planas J. Measurement of serum testosterone during androgenic suppression in patients with prostate cancer: a systematic review. *Acta Urol Esp* 2016;40:477-84.
- [3] Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:405-13.
- [4] Morote J, Comas I, Planas J, et al. Serum testosterone levels in prostate cancer patients undergoing luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment. *Clin Genitourin Cancer*. In press. doi:10.1016/j.clgc.2017.10.025.
- [5] Morote J, Comas I, Ferrer R, Planas J, Celma A, Regis L. Accuracy of serum luteinizing hormone and serum testosterone measurements to assess the efficacy of medical castration in prostate cancer patients. *J Biomed Sci* 2017;24:81-7.

<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.01.039>

0302-2838/© 2018 European Association of Urology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Morote J, et al. Re: Nicolas Mottet, Joaquim Bellmunt, Erik Briens, et al. EAU-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology; 2017. <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer>. *Eur Urol* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.01.039>



## CARTA A L'EDITOR 2:

Aquesta carta reflexa la nostra opinió a un article publicat recentment, el 2019, de Hashimoto et al<sup>166</sup>. sobre l'estudi "*Serum testosterone level is a useful biomarker for determining the optimal treatment for castration-resistant prostate cancer*". Els autors plantegen la hipòtesis que la concentració de testosterona en sèrum pot ser útil per seleccionar el tractament pel càncer de pròstata resistent a la castració. No obstant els autors realitzen l'estudi amb un equip de quimioluminescència, que com ja s'ha demostrat en els nostres estudis, no és un mètode adequat per a mesurar concentracions baixes de testosterona, degut a la imprecisió a aquestes concentracions. Pel que considerem que els resultats s'han de confirmar mesurant la testosterona amb un mètode adequat. Aquest escenari és el mateix que el nostre grup va difondre en relació a la validesa dels estudis que analitzen el valor de la concentració de testosterona per a definir el seu valor pronòstic de la supressió androgènica<sup>101</sup>.

Letter to the Editor

**Replay by authors: Serum testosterone level is a useful biomarker for determining the optimal treatment for castration-resistant prostate cancer**

We have reviewed with interest the recent article by Hashimoto et al. "Serum testosterone level is a useful biomarker for determining the optimal treatment for castration-resistant prostate cancer" [1]. The authors reported on the potential for serum testosterone measurement to predict the response to abiraterone or enzalutamide of patients with castration-resistant prostate cancer (CRPC). After the analysis of this retrospective study 2 relevant facts would be highlighted: (i) patients with very low serum testosterone levels (<5 ng/dl) seems to have lower PSA progression free survival and overall survival than those patients with low levels (5–50 ng/dl); (ii) patients with very low testosterone levels which received abiraterone had greater rate of PSA responses than those who underwent enzalutamide (62% vs. 32%), although overall survival was not statistically different. The authors conclude that serum testosterone is a useful biomarker for informing treatment selection for CRPC.

In my opinion the authors of this interesting study can hypothesize that serum testosterone measurement may be useful to select the treatment for CRPC, however an important limitation of this study has not been taken into account. The authors reported that ARICHITET II chemiluminiscent immunoassay (CLIA) was used to measure serum testosterone. CLIAs are worldwide used in clinical laboratories to measure serum testosterone from the latest nineties given that they are very sensitive, automatable, fast and inexpensive methods, but despite a disturbing lack of accuracy and reproducibility, especially when low levels are measured. In 2007 the Endocrine Society and the Centre for Disease Control and Diagnosis recommended only methods using chromatography and mass spectrometry to measure testosterone, especially in children and women [2]. Nonetheless we want to emphasize that all the recent studies looking for the optimal level of serum testosterone after medical castration have been carried out using distinct CLIAs [3,4]. We recently demonstrated that 2 commercial CLIAs measured differently the testosterone levels of patients with PC undergoing androgen suppression. The median levels were 7.8 and 33.4 ng/dl, the rate values up to 20 ng/dl were 77.5% and 24.9% and behind 50 ng/dl were 0.8% and 21.3% respectively [5]. We also have demonstrated the lack of accuracy of 1 CLIA

compared to liquid chromatography and tandem mass spectrometry which is an appropriate method to measure low levels of serum testosterone. The median levels were 31.9 and 14 ng/dl and the rate of levels up to 20 ng/dl were 27.1% and 65.9% respectively [6].

To summarize, the accurate measurement of low levels of serum testosterone in patients with PC undergoing androgen suppression must be measured with liquid chromatography and tandem mass spectrometry [7]. Therefore, the findings of Hashimoto et al. [1] should be confirmed using an appropriate method to measure serum testosterone.

**Conflicts of interest**

Juan Morote has been advisor and speaker of Astellas, Ipsen, Jansen, Amgen, GP Pharm, and Glaxo Smith Klein.

Juan Morote, M.D., Ph.D.  
Imma Comas, M.D.

*Department of Urology and Biochemistry, Vall d'Hebron Hospital Campus, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain*

**References**

- [1] Hashimoto K, Tabata H, Shindo T, et al. Serum testosterone level is a useful biomarker for determining the optimal treatment for castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol* 2019;16.pii:S1078-1439 (19) 30159-0. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2019.04.026>.
- [2] Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, et al. Position statement: utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:405–13.
- [3] Morote J, Orsola A, Planas J, et al. Redefining clinically significant castration levels in patients with prostate cancer receiving continuous androgen deprivation therapy. *J Urol* 2007;178:1290–5.
- [4] Morote J, Regis L, Celma A, et al. Measurement of serum testosterone during androgenic suppression in patients with prostate cancer: a systematic review. *Actas Urol Esp* 2016;40:477–84.
- [5] Morote J, Comas I, Planas J, et al. Behavior of chemiluminiscent assays to measure serum testosterone during androgen deprivation therapy. *Int J Urol* 2016;23:957–8.
- [6] Morote J, Comas I, Planas J, et al. Serum testosterone levels in prostate cancer patients undergoing luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment. *Clin Genitourin Cancer* 2017;16:e491–6. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.19.04.026>.
- [7] Morote J, Comas I, Planas J. Re: Nicolas Mottet, Joaquim Bellmunt, Erik Briers, et al. EAU-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology; 2017. <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer>. How to Assess the Efficacy of Medical Castration. *Eur Urol* 2018; 73:e134–5.

## ESTUDI 5:

### 1. Introducció:

Les guies clíniques de CaP recomanen la mesura de la testosterona en sèrum per determinar l'eficàcia de la castració i definir el CaP resistent a la castració<sup>17</sup>. Hem demostrat que només els mètodes de mesura basat en LC-MSMS són els apropiats per mesurar concentracions baixes de testosterona<sup>156,157,167</sup>.

Recentment hem trobat que la concentració de LH en sèrum és millor marcador de castració mèdica que la concentració de testosterona, fins i tot quan es mesura la concentració de testosterona per LC-MSMS<sup>168,169</sup>.

### 2. Objectiu:

El nostre objectiu va ser analitzar si els intervals de concentració de LH, dins de la concentració de castració, es correlacionen amb la concentració de testosterona, mesurada per LC-MSMS i quimioluminescència. Si és així, plantejarem la hipòtesis de que la concentració de LH pot diferenciar una castració mèdica òptima (concentració de testosterona inferior a 20 ng/dL) i subòptima (concentració de testosterona entre 20 i 50 ng/dL).

### 3. Material i mètodes:

Vam mesurar prospectivament la concentració de testosterona mitjançant LC-MSMS al nostre laboratori i quimioluminescència (IA) utilitzant Atellica Solutions®, de 138 pacients en tractament amb anàlegs de la LHRH ("On anàlegs") seleccionats a l'atzar de la cohort d'estudi, amb concentració de LH dins del rang de castració publicat a l'estudi 4. Es van seleccionar 69 pacients amb una concentració de LH inferior a 0,12 U/L i 69 d'entre 0,13 i 1,1 U/L.

El valors s'expressen en medianes (rang interquartil). Per a l'anàlisi estadístic es va utilitzar el programa SPSS v.20.

### 4. Resultats:

La mediana de la concentració de testosterona mesurada per LC-MSMS al grup amb concentració de LH inferior a 0,12 U/L va ser de 9,0 ng/dL (3,7-17,5 ng/dL) i al



grup amb concentració de LH entre 0,13 i 1,1 U/L de 12 ng/dL (7,9-21,4 ng/dL). La mediana de concentració de testosterona mesurada per IA va ser de 17,6 ng/dL (7,0-39,8 ng/dL) i 17,2 ng/dL (13,0-24,1 ng/dL), respectivament (taula 9).

Taula 9: Concentració de testosterona per LC-MSMS i quimioluminescència segons els intervals de concentració de LH.

Mesura de testosterona	Total	Interval concentració LH (U/L)		Valor p
		<0,12	0,13-1,10	
LC-MSMS (ng/dL)	11,1 (5,9-19,8)	9,0 (3,7-17,5)	12,0 (7,9-21,4)	0,028
IA (ng/dL)	17,4 (10,0-32,0)	17,6 (7,0-39,8)	17,2 (13,0-24,1)	0,918

Les distribucions de concentració de testosterona per ambdós mètodes, d'acord amb els intervals establerts de concentració de LH es presenten a la taula 10.

Quan es mesura la concentració de testosterona per LCMSMS, el 78,3 % dels pacients amb una concentració de LH inferior a 0,12 U/L i el 21,7% dels pacients amb concentració de LH superior a 0,12U/L tenen una concentració de testosterona inferior a 20 ng/dL ( $p=0,001$ ). Quan es mesura la testosterona per IA, aquest percentatge de pacients amb concentració de testosterona inferior a 20 ng/dL és de 53,6 % i 46,4% respectivament ( $p=0,295$ ). A més, tot i no trobar-se concentracions de testosterona superiors a 50 ng/dL per LCMSMS, 5 pacients presentaven concentració superior a 50 ng/dL quan es va mesurar mitjançant IA, 3 pacients (4,3%) amb una concentració de LH inferior a 0,12 U/L i 2 pacients (2,9%) amb una concentració de LH entre 0,13-1,1 U/L,  $p= 0,666$ .

Taula 10: Distribució per intervals de concentració de testosterona, mesurada amb LC-MSMS i quimioluminescència, segons els intervals de concentració de LH.

Mètode mesura Testosterona	Pacients Testosteorna <20 ng/dL, n(%)		
	LH <0,12 U/L	LH 0,13-1,1U/L	valor p
LC-MSMS	54 (78,3)	15 (27,1)	<0,001
IA	37 (53,6)	32 (46,4)	0,295

## **5. Conclusió:**

Aquests resultats ens permeten suggerir que en pacients amb CaP amb tractament amb anàlegs de la LHRH, la concentració de LH es correlaciona amb la concentració de testosterona mesurada per LCMSMS. Una concentració de LH inferior a 0,13 U/L podria definir una castració òptima, definida en base a una concentració de testosterona inferior a 20 ng/dL, mesurada amb LCMSMS. Calen estudis futurs per verificar la hipòtesis de que la concentració de LH és capaç de diferenciar castració mèdica òptima i subòptima.

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.euroopenjournal.eu](http://www.euroopenjournal.eu)

European Association of Urology



## Brief Correspondence

### Serum Luteinizing Hormone Testing Can Identify Optimal Medical Castration

Prostate cancer (PCa) guidelines recommend serum testosterone testing to assess the efficacy of castration and to define castration resistance when biochemical or clinical progression is detected. The currently accepted serum testosterone castrate level is 50 ng/dl, although levels below 20 ng/dl have been associated with longer castration resistance-free survival [1]. This castrate level of serum testosterone was established during the 1980s by the US Food and Drug Administration to evaluate products for castration. It arose from previous studies on PCa patients who had undergone surgical castration and corresponded to the lowest sensitivity level of the radioimmunoassays available [2].

In 2007, on the basis of previous studies [3,4], the American Endocrine Society and the Centers for Disease Control and Prevention recommended only methods based on mass spectrometry to measure testosterone, especially for the low levels detected in women and children [5]. In 2016, we highlighted that chemiluminescence was used in all clinical studies analyzing the prognostic value of serum testosterone. Chemiluminescent assays are the methods most used in clinical laboratories owing to high sensitivity, automatability, high speed, and low cost; however, their lack of accuracy and reproducibility at low levels make these results uncertain [6]. We have observed discrepancies in serum testosterone results from different chemiluminescent assays [7] and we have suggested mass spectrometry as the appropriate method for measuring serum testosterone in PCa patients undergoing medical castration [8]. Finally, we have observed that serum luteinizing hormone (SLH) is better associated with medical castration activity than serum testosterone is, even when measured with an appropriate method. We established a castrate level of SLH as 1.10 UI/l [9]. SLH has also been used to monitor the switch between luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist and agonist [10]. The aim of the present study was to analyze the association between SLH and serum testosterone, measured with mass spectrometry and chemiluminescence, in PCa patients undergoing medical castration and to determine if SLH can define optimal castration.

We prospectively measured serum testosterone with mass spectrometry and chemiluminescence in 138 frozen

serum samples ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) selected among PCa patients undergoing continuous medical castration with a 3-month depot LH-RH agonist. We used a Chromsystems reagent kit for the Shimadzu liquid chromatography/mass spectrometry 8050 system (Izasa Scientific) with a sensitivity limit of 0.5 ng/dl and an Atellica Solutions chemiluminescent assay (Siemens Inc.) with a sensitivity limit of 7.0 ng/dl for measurement of serum testosterone. Selected serum samples had a previous LH measurement within the castration range. LH was measured using the Advia-Centaur XPI chemiluminescent assay (Siemens Inc.) with a sensitivity limit of 0.12 UI/l. We randomly selected 69 serum samples with LH  $\leq 0.12$  UI/l and 69 with SLH between  $>0.12$  and 1.10 UI/l. The decision to use this threshold was based on our previous study, in which approximately 75% of patients on active LH-RH agonist treatment had SLH  $\leq 0.12$  UI/l [8]. Optimal castration was defined as serum testosterone  $<20$  ng/dl [6]. The study was approved by our ethics committee (PR/AG 048/2016). Associations were analyzed using the median test between the SLH interval and quantitative serum testosterone measurements, and the McNemar test between the SLH interval and semi-quantitative serum testosterone. SPSS v.20 was used for these analyses.

The median age was 72 yr (interquartile range [IQR] 63–78) for men with SLH  $\leq 0.12$  UI/l and 73 yr (IQR 66–80) for those with SLH  $>0.12$  UI/l ( $p = 0.136$ ). For the groups with SLH  $\leq 0.12$  versus  $>0.12$  UI/l, serum testosterone measured with mass spectrometry was 9.0 ng/dl (IQR 3.7–17.5) versus 12.0 ng/dl (IQR 7.9–21.4;  $p = 0.028$ ), and serum testosterone measured with chemiluminescence was 17.6 ng/dl (IQR 7.0–39.8) versus 17.2 ng/dl (IQR 13.0–24.1;  $p = 0.918$ ; Table 1). The distribution of serum testosterone results measured with both methods is presented by SLH interval in Table 2. For testosterone measured with mass spectrometry, 78.3% of patients with SLH  $\leq 0.12$  UI/l and 21.7% with SLH  $>0.12$  UI/l had serum testosterone  $<20$  ng/dl ( $p = 0.001$ ). For testosterone measured with chemiluminescence, the corresponding rates with testosterone  $<20$  ng/dl were 53.6% and 46.4% ( $p = 0.295$ ). No patients had serum testosterone  $>50$  ng/dl when measured with mass spectrometry, while five patients (3.6%) had serum testosterone  $>50$  ng/dl when measured with chemiluminescence, of whom three (4.3%) had SLH  $\leq 0.12$  UI/l and two (2.9%) had SLH  $>0.12$  UI/l.

We observed a significant association between SLH and serum testosterone only when it was measured with mass

<https://doi.org/10.1016/j.euroopen.2020.06.002>

2666-1683/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. on behalf of European Association of Urology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Discussió

---

## 6 DISCUSSIÓ

La testosterona és un dels esteroides sexuals més important per avaluar la funció gonadal tant en homes com en dones. La hormonodependència del CaP va ser demostrada al 1941 per Huggins i Hodges<sup>85</sup>. En pacients amb CaP en tractament amb anàlegs de la LHRH, el tractament es considera eficaç quan la concentració de testosterona en sèrum és inferior a 50 ng/dL<sup>17</sup>. Per a mesurar aquestes concentracions baixes de testosterona cal utilitzar mètodes de mesura exactes i precisos, per poder identificar un pacient resistent a la castració<sup>98</sup>.

La mesura precisa de les hormones és l'eix de l'endocrinologia. El moment més decisiu d'aquesta disciplina va ser l'invent de l'immunoanàlisi al 1959<sup>170</sup> amb radioimmunoanàlisi, originalment per les hormones peptídiques, però es va estendre més tard als esteroides. La capacitat de poder mesurar totes les hormones, fins i tot les que es troben en baixes concentracions, va suposar un impacte revolucionari de l'endocrinologia<sup>170</sup>. A la dècada dels 1980-1990, la creixent demanda de mesura d'esteroides en clínica va impulsar la simplificació dels anàlisi, adaptant els immunoanàlisi d'esteroides en formats d'un sol pas, sense extracció, i en plataformes d'anàlisi, millorant la velocitat i comportant un menor cost<sup>170</sup>.

Molts factors van afavorir el desús del RIA per a mesurar la concentració de testosterona: la dependència de l'ús de radioisòtops dels RIA que generen residus que s'han de tractar de manera especial, la variació significativa del marcador de lot a lot del RIA, la necessitat de personal especialitzat en RIA i d'una instal·lació autoritzada, la incapacitat d'automatitzar RIA i reduir el temps de resposta<sup>170</sup>.

Tot i que totes les mesures de magnituds biològiques requereixen un control de qualitat estricte per minimitzar errors aleatoris, les limitacions metodològiques dels immunoanàlisis d'esteroides constitueixen errors sistemàtics, com ara el biaix específic del mètode en funció de l'epítot contra el que es dirigeix l'anticòs utilitzat, presentarà reactivitat creuada amb altres metabòlits esteroides així com l'efecte matriu<sup>124</sup>.

Per a la mesura de la concentració de testosterona mesurada amb IA, aquesta pot ser tant sobreestimada com subestimada respecte al mètodes de cromatografia amb detecció per espectrometria de masses<sup>123</sup>. A valors baixos aquestes diferències són més importants, sent clínicament significatives. A més, s'ha descrit que a aquestes concentracions baixes els IA presenten problemes de precisió<sup>123-125,154</sup>. Aquest fet

dificulta el seguiment dels pacients amb CaP en tractament amb anàlegs de la LHRH, de la mateixa manera que pot dificultar la identificació de la resistència a la castració<sup>171</sup>, definida com a concentració sèrica de testosterona de castració <50 ng/dL més un dels criteris de progressió bioquímics o radiològics<sup>17</sup>.

El mètodes de mesura d'esteroides basats en MS han estat disponibles durant dècades, de fet, al mateix temps que els immunoanàlisi, sent el mètode de referència per especificitat i estructura dels esteroides, però eren cars i no disponibles a la pràctica clínica. Les millores que ha aportat l'espectrometria de masses en termes de sensibilitat i robustesa als últims anys, han donat lloc al desenvolupament de procediments de mesura sensibles i precisos per a mesurar la concentració de testosterona<sup>132,136,152,153</sup> tot i que continuen sent inversions econòmiques importants dels equips i es necessita de personal amb una formació adequada.

Basant-se en alguns estudis realitzats a principis de l'any 2000 en què es va posar de manifest aquest problema d'exactitud dels RIA i IA per mesurar la concentració de testosterona<sup>123,124</sup>, la *Endocrine Society* junt amb el *Center for Disease Control and Prevention*<sup>138</sup> es van posicionar l'any 2007 recomanant utilitzar els procediments de mesura que utilitzen l'espectrometria de masses com a mètode de detecció per a mesurar la concentració testosterona especialment en nens i dones.

Pels problemes d'exactitud i precisió dels immunoanàlisi, la revista científica *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, per a la publicació d'investigacions clíniques d'endocrinologia que informin mesures d'hormones sexuals requereixen que s'utilitzin mètodes de basats en MS<sup>170</sup>.

Tot i que cap estudi ha avaluat la reproductibilitat i exactitud en pacients amb CaP sotmesos a castració, pel seguiment del tractament dels CaP amb anàlegs de la LHRH, de manera similar als nens i dones, el comportament hauria de ser similar donat que en aquests casos també presenten concentracions de testosterona baixes, requerint utilitzar uns mètodes de mesura precisos, reproduïbles i sensibles per a mesurar la concentració de testosterona. L'evidència científica descrita en aquest estudi<sup>171</sup> avala que la LCMSMS sigui el mètode adequat per a mesurar aquestes concentracions, requerint definir la concentració de castració en pacients amb CaP sotmesos a supressió androgènica amb aquest mètode. Tot i presentar bons límits de quantificació i bona precisió, exactitud i reproductibilitat inclòs a concentracions baixes<sup>132,136,152,153</sup>, entre els diferents procediments que utilitzen cromatografia i

detecció mitjançant MS existeix certa variabilitat deguda a diferents protocols de preparació de la mostra, el tipus de columna utilitzada i l'estàndard intern escollit<sup>130,172</sup>.

La *Endocrine Society* i el *Center for Disease Control and Prevention* al 2010 van realitzar una declaració de consens per estandarditzar els procediments de mesura de la testosterona<sup>135,139</sup> amb l'objectiu de disminuir la variació entre mètodes<sup>133,134,144</sup>. El 2013 es publica el desenvolupament i la validació d'un procediment de mesura de LCMSMS calibrat amb el material de referència del NIST SRM 971<sup>141,142</sup>.

Els resultats del segon estudi del nostre projecte confirmen el diferent comportament de dues plataformes de IA per a la mesura de la concentració de testosterona en aquests pacients, a més de trobar un 23% de microelevacions (concentració de testosterona superior a 50 ng/dL) amb la plataforma Advia Centaur® (Siemens Healthineers), mentre que amb la plataforma Cobas 8000® (Roche Diagnostics) no es van detectar<sup>157</sup>. Així, el procediment de mesura utilitzat té implicacions en la pràctica clínica compromentent l'avaluació de l'eficàcia del tractament així com el diagnòstic de la resistència a la castració, de manera similar aquests mètodes no permeten classificar correctament els pacients amb sospita d'hipogonadisme en homes i hipergonadisme o síndrome dels ovaris poliquístics en dones amb concentracions de testosterona al límit baix de l'interval de normalitat dels homes<sup>155,173</sup>.

Per primera vegada en pacients amb CaP tractats amb anàlegs de la LHRH es va mesurar la concentració de testosterona utilitzant un mètode de LCMSMS i la vam comparar amb la concentració mesurada per IA<sup>174</sup>. El IA utilitzat sobreestima la concentració de testosterona respecte al LCMSMS. Resultats similars ja s'havien observat en nens i dones, poblacions que també presenten concentracions baixes de testosterona en sèrum<sup>123,124</sup>. Aquesta sobreestimació va comportar un percentatge major de pacients amb concentracions de castració inadequades<sup>175</sup> respecte als detectats amb LCMSMS (d'un 16% al 2,4% respectivament), fet que té implicacions clíniques, ja que comporta un estudi d'aquest augment de la concentració de testosterona per diferenciar la resistència a la castració de les microelevacions, a la vegada que no compleix amb els requeriments de les agències de medicaments pels productes destinats a castració mèdica<sup>176,177</sup>.

La concentració de castració mesurada pel mètode de referència no ha estat establerta. Al tercer estudi d'aquest projecte vam obtenir una concentració de castració de 40 ng/dL<sup>167</sup>, resultat inferior al recomanat a les guies de CaP de la EAU<sup>17</sup> de 50

ng/dL establert a la dècada dels anys 80 en pacients sotmesos a castració quirúrgica i mesurant la testosterona mitjançant un RIA que presentava aquest límit de quantificació<sup>99</sup>. Aquest resultat no obstant és superior a la concentració de castració redefinida per Oefelin et al<sup>100</sup> mesurant la concentració de testosterona mitjançant un IA en 35 pacients sotmesos a castració quirúrgica. Un estudi realitzat per Van Der Sluis et al<sup>178</sup> ha analitzat la concentració de testosterona mitjançant LCMSMS segons el tipus de castració. En concret en 34 pacients sotmesos a castració quirúrgica i en 32 pacients sotmesos a castració mèdica amb anàlegs de la LHRH, obtenint una concentració mediana 9,2 (2,9 a 28,8 ng/dL) i 4,0 ng/dL (2,9 a 20,2 ng/dL), respectivament. Van concloure que la concentració de testosterona en pacients sotmesos a castració mèdica era més baixa que en homes sotmesos a castració quirúrgica. Aquests resultats però no son comparables amb els nostres degut al biaix en la selecció de pacients, ja que inclou pacients amb altres patologies diferents al CaP així com altres pacients amb tractament de quimioteràpia concomitant.

La concentració de testosterona en pacients en tractament anàlegs de la LHRH d'impacte clínic, definit com a major supervivència sense resistència a la castració, es va suggerir de 32 ng/dL en un estudi del nostre grup l'any 2007<sup>101</sup>. Altres estudis presenten resultats similars, presentant tots ells concentracions de testosterona per sota de 50 ng/dL<sup>102,105,107,109,179-181</sup>. Tot i així, tots aquests estudis s'han realitzat mesurant la concentració de testosterona mitjançant diferents IA, pel que la concentració de testosterona d'impacte clínic hauria de determinar-se en estudis futurs mitjançant el procediment de mesura de referència<sup>156</sup>.

Per tot el que hem exposat, disposar de mètodes de LCMSMS per a mesurar concentracions baixes de testosterona en la pràctica clínica seria de gran utilitat. No obstant, cal considerar que la seva implantació a la rutina dels laboratoris clínics requereix d'una gran inversió inicial pel cost elevat dels equips, un major cost per prova i un major grau d'especialització respecte a la tecnologia dels IA<sup>127</sup>. El rendiment analític dels IA a gran part de l'interval de mesura és acceptable presentant bones característiques metrològiques, a més de ser tècniques ràpides, pel que caldria valorar la implementació del procediment de LCMSMS en centres de referència per a un grup concret de pacients, aquells que presenten concentracions baixes i que per la falta de precisió i exactitud dels IA requereixin d'aquest mètode més específic.

En condicions normals, entre un 2% i un 4% de la concentració de testosterona és sintetitzada a les glàndules suprarenal<sup>88,98,182</sup>, així com també pot ser produïda per les cèl·lules del càncer de pròstata<sup>164,183</sup>, pel que es pot deduir que les microelevacions de



testosterona no sempre són degudes a castració inadequada. Per aquest motiu, i sumat als problemes de precisió de la mesura de la concentració de testosterona, ens vam plantejar si la concentració de LH podria ser útil per avaluar l'eficàcia del tractament amb anàlegs de la LHRH. El comportament de la concentració de LH també s'ha estudiat en altres estudis després de la retirada d'anàlegs de la LHRH<sup>184-186</sup> observant-se un augment a concentracions majors que els observats abans de la seva mesura, que es van normalitzant amb el temps. També s'ha vist que la concentració de LH es manté estable al canviar de tractament d'anàlegs per antagonistes de la LHRH<sup>187</sup>. Els nostres resultats suggereixen que la concentració de LH en els pacients amb CaP tractats amb anàlegs de la LHRH permet distingir als pacients que estan en tractament dels que no, observant-se diferències significatives en el p50 de la concentració de LH entre els pacients que estan en "On anàlegs" dels que estan "Off anàlegs", és a dir, dels que han estat anteriorment en tractament i porten almenys un mes sense tractament<sup>168</sup>.

Els resultats de les corbes ROC del quart estudi del projecte demostren que la concentració de LH permet distingir entre els pacients que actualment prenen anàlegs de la LHRH dels que no, sent millor marcador de castració mèdica que a la concentració de testosterona, tant mesurada per IA com per LCMSMS, el que ens permetria realitzar el diagnòstic diferencial dels pacients que presenten concentracions de testosterona per sota de 50 ng/dL. Actualment no es disposa de literatura per comparar els nostres resultats. El comportament de la concentració de testosterona mesurada per IA observat en aquest estudi és similar al que ja havíem descrit en estudis previs<sup>163,188</sup>.

En aquest estudi vam estimar la concentració de castració de la LH en aquests pacients a partir del percentil 97,5 de la distribució de concentració, després de la transformació logarítmica de les dades al no seguir una distribució normal, obtenint el valor discriminant de 1,1 U/L de concentració de LH com el capaç de classificar correctament el 99,1% dels pacients de la cohort d'estudi i el 98,6% de la cohort de validació que estan en tractament amb anàlegs de la LHRH dels que no ho estan, significativament superior al 78,3% i 89,5% observats amb la concentració de testosterona mesurada per IA i LCMSMS respectivament<sup>168</sup>.

Per aquest motiu vam proposar la mesura de la concentració de LH pel seguiment del tractament amb anàlegs de la LHRH a la primera carta a l'editor inclosa en aquest projecte, i vam seguir estudiant per tal d'identificar si l'ús d'interval de concentració de LH ens permetrien definir un estat de castració òptim<sup>169</sup>.

L'ús dels intervals de concentració de LH es correlaciona significativament amb la concentració de testosterona mesurada per LCMSMS mentre que no es correlaciona amb la concentració de testosterona mesurada per IA<sup>189</sup>, fet que posa de manifest que en aquest grup de pacients és important mesurar la concentració de testosterona mitjançant LCMSMS. Tot i que la concentració mediana de testosterona mesurada per LCMSMS era similar, amb l'interval de confiança que es solapava, entre ambdós grups, observem una concentració de testosterona de 9 ng/dL (3,7-17,5 ng/dL) quan la concentració de la LH era inferior a 0,12 U/L i de 12 ng/dL (7,9-21,4 ng/dL) pel grup de concentració de LH entre 0,13 i 1,1 U/L). El percentatge de pacients amb concentració de testosterona inferior a 20 ng/dL és significativament major quan la concentració de LH és inferior a 0,12 U/L, mentre que quan la testosterona es mesura per IA no s'observen diferències significatives. Aquest percentatge de 78,3% dels pacients amb concentració de testosterona mesurada per LCMSMS per sota de 20 ng/dL reproduïen els resultats obtinguts al quart estudi en que es va obtenir un 75% dels pacients amb concentracions inferiors a 20 ng/dL<sup>168</sup>. Aquests resultats suggereixen que davant d'un pacient amb CaP en tractament amb agonistes de la LHRH amb una concentració de testosterona mesurada per IA inferior a 50 ng/dL, la mesura de la concentració de LH permetria discernir si l'efecte del tractament amb anàlegs de la LHRH està sent òptim (quan la concentració de LH és inferior 0,12 U/L) o no (quan la concentració de LH està entre 0,13 i 1,1 U/L).

La primera limitació d'aquest projecte és el número limitat de pacients als que s'ha pogut mesurar la concentració de testosterona mitjançant LCMSMS donat que pel processament de les mostres de la base de dades de validació es va finançar a través d'una aportació de Astellas Pharma S.A. i pel processament de les mostres de la segona base de dades es va comptar amb la donació de reactiu per part del fabricant. La segona limitació ha estat la dificultat de saber el moment exacte en què un pacient perd l'efecte de l'anàleg de la LHRH, pel que seria important realitzar estudis de validació dels nostres resultats. El comportament de la concentració de testosterona després de períodes llargs de tractament continu amb anàlegs de la LHRH no es coneix exactament<sup>185</sup>, motiu pel qual es va assegurar que els pacients seleccionats no estiguessin en activitat dels anàlegs de la LHRH. Es desconeix el comportament exacte de la concentració de LH després de la retirada dels anàlegs de LHRH perquè els IA actuals no s'utilitzaven en el passat, sinó que s'utilitzaven uns RIA amb uns límits de quantificació més elevats<sup>190</sup>. No obstant, per assegurar la retirada de l'anàleg vam deixar passar un mínim d'un mes des de la última dosi. La tercera limitació és la selecció arbitrària dels dos intervals de LH (<0,12 U/L i 0,13-1,1 U/L). La mida

d'aquestes dues cohorts es van adaptar als recursos limitats dels que disposàvem. Una altra limitació d'aquest projecte ha estat la mida de la cohort de validació utilitzada per validar la concentració de castració de LH, de 143 pacients dels quals 124 eren pacients "On anàlegs" i 19 "Off anàlegs" seleccionats per l'estudi 3 sense considerar la concentració de LH. Finalment, cal considerar que hem avaluat la bondat diagnòstica de la concentració de LH en base a pacients que reben tractament amb anàlegs de la LHRH i que presentaven concentracions de testosterona inferior a 50 ng/dL, pel que caldria reproduir aquest resultat amb un estudi prospectiu amb seguiment de la clínica dels pacients.

Donada la importància de mesurar les concentracions baixes de testosterona en aquests pacients així com en edat pediàtrica i en dones amb precisió i exactitud, s'hauria de valorar la implantació el procediment de mesura per LCMSMS a la rutina del laboratori clínic, sent convenient validar la concentració de castració amb el mètode de LCMSMS i estudiar l'impacte clínic de la mesura de la concentració de testosterona mitjançant aquest mètode en el seguiment dels pacients de CaP sotmesos a supressió androgènica. Es seguirà estudiant per trobar més evidència de la utilitat de la mesura de la concentració de LH com a marcador del funcionament del tractament. S'hauria de verificar que el comportament de la LH permet definir dos poblacions amb evolució clínica diferents i que, els pacients que presenten castració subòptima, definida per la concentració de LH, presenten una supervivència lliure de resistència a la castració més baixa. De complir-se aquesta situació, caldrà valorar les opcions terapèutiques a aplicar a aquests pacients.

## Conclusions

---

## 7 CONCLUSIONS

1. Existeixen diferents mètodes per a la mesura de la concentració de testosterona en pacients amb càncer de pròstata sotmesos a supressió androgènica. Els mètodes més utilitzats als laboratoris clínics són els que utilitzen la quimioluminescència com a principi de mesura. El mètode de referència per a la seva mesura ha de ser LC-MSMS, utilitzant un material de referència traçable i commutable per a la calibració.
2. Els mètodes quimioluminiscent automatzats utilitzats habitualment als laboratoris clínics són mètodes fiables però que presenten diferents característiques metrològiques per a la mesura de la concentració de testosterona: diferències de reproductibilitat, especificitat i sensibilitat. Aquestes diferències donen lloc a diferències en els resultats tant sobreestimant-la com subestimant-la, augmentant aquestes diferències a concentracions baixes. Tanmateix, els mètodes quimioluminescent no són adequats per presentar elevada variabilitat a concentracions inferiors a 50 ng/dL.
3. Hem verificat que el mètode de LC-MSMS presenta bones característiques metrològiques per a la mesura de la concentració sèrica de testosterona en pacients amb CaP sotmesos a castració mèdica. La concentració de castració de testosterona en pacients sotmesos a tractament amb agonistes de la LHRH depèn del procediment de mesura sent inferior al límit de decisió de 50 ng/dL, aproximadament de 40 ng/dL quan es mesura pel mètode de referència. Pels mètodes quimioluminescent la concentració de castració de testosterona és més alta, aproximadament de 76 ng/dL utilitzant l'analitzador Centaur® XP i de 40 ng/dL utilitzant el Cobas®.
4. La concentració sèrica de LH es correlaciona millor que la concentració sèrica de testosterona amb el tractament actiu amb agonistes de la LHRH. És millor marcador de castració mèdica permetent distingir els pacients en tractament actiu amb agonistes de la LHRH amb millor sensibilitat que la

concentració de testosterona. Proposem la concentració de LH de 1,1 U/L com a concentració de castració per avaluar el correcte funcionament del tractament dels pacients sotmesos a castració farmacològica. La concentració sèrica de LH en pacients amb CaP en tractament amb agonistes de la LHRH es correlaciona amb la concentració de testosterona mesurada per LC-MSMS, mentre que quan la concentració de testosterona és mesurada mitjançant mètodes quimioluminescents la correlació és pitjor.

5. La concentració de LH ens permetria establir la qualitat de la castració mèdica. Una concentració de LH de 0,12 U/L ens permet diferenciar la castració òptima de la subòptima. No obstant, caldria definir estudis prospectius per confirmar si els pacients en castració òptima presenten una millor supervivència lliure de resistència a la castració.

## Annexes

---

## 8. ANNEXES

### 8.1 INFORME CEIC



Fg. Vall d'Hebron, 119-129  
08035 Barcelona  
Tel. 93 489 38 91  
Fax 93 489 41 80  
ceic@vhir.org

ID:R7790

#### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y COMISIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

Doña Mireia Navarro, Secretaria del COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA CON MEDICAMENTOS del Hospital Universitari Vall d'Hebron,

#### CERTIFICA

Que el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, en el cual la Comisión de proyectos de investigación está integrada, se reunió en sesión ordinaria nº 241 el pasado 26 de febrero de 2016 y evaluó el proyecto de investigación PR(AG)42/2016 presentado con fecha 01/02/2016, titulado "*Assessment of the castrate level of serum testosterone based on liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC MSMS) method of determination.*" que tiene como investigador principal al Dr. Joan Morote Robles del Servicio de Urología de nuestro Centro.

Y que tras emitir un informe aprobado condicionado en dicha reunión y evaluar la documentación recibida posteriormente en respuesta a este informe

El resultado de la evaluación fue el siguiente:

#### DICTAMEN FAVORABLE

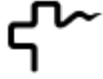
El Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 1090/2015, y su composición actual es la siguiente:

Presidenta: Gallego Meloón, Soledad. Médico  
Vicepresidente: Segarra Sarries, Joan. Abogado  
Secretaria: Navarro Sebastián, Mireia. Química



Hospital Universitari Vall d'Hebron  
Universitat Autònoma de Barcelona





Vocales: Armadans Gil, Lluís. Médico  
Azpiroz Vidaur, Fernando. Médico  
Balasso, Valentina. Médico  
Cucurull Folguera, Esther. Médico Farmacóloga  
Latorre Arteché, Francisco. Médico  
De Torres Ramírez, Inés M. Médico  
Fernández Liz, Eladio. Farmacéutico de Atención Primaria  
Ferreira González, Ignacio. Médico  
Fuentelsaz Gallego, Carmen. Diplomada Enfermería  
Fuentes Camps, Inmaculada. Médico Farmacóloga  
Guardia Massó, Jaume. Médico  
Joshi Jubert, Nayana. Médico  
Hortal Ibarra, Juan Carlos. Profesor de Universidad de Derecho  
Montoro Ronsano, J. Bruno. Farmacéutico Hospital  
Rodríguez Gallego, Alexis. Médico Farmacólogo  
Sánchez Raya, Judith. Médico  
Solé Orsola, Marta. Diplomada Enfermería  
Suñé Martín, Pilar. Farmacéutica Hospital  
Vargas Blasco, Víctor. Médico

En dicha reunión del Comité Ético de Investigación Clínica se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

En el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

Lo que firmo en Barcelona a 23 de mayo de 2016

MIREIA NAVARRO  
SEBASTIAN

Firmado digitalmente por MIREIA NAVARRO SEBASTIAN  
nombre de inscripción pape G45, 04-08/2016/1014047  
www.ccaib.cat/verificar.jsp, su agente público de  
certificación CP3545-0, 04-08/2016/1014047  
MIREIA NAVARRO SEBASTIAN, 04/08/2016 10:14:04, 04-08/2016/1014047  
MIREIA NAVARRO SEBASTIAN  
PDF: 2016.05.23 16:43:44 +0200

Sra. Mireia Navarro  
Secretaria CEIm

## 8.2 RESULTATS NO RECOLLITS EN ARTICLES

### 8.2.1 Resultats d'imprecisió dels diferents mètodes

Mostra	Centaur	Cobas	MS	TSTII
1	26,48	38,85	43,00	23,42
2	38,62	38,09	44,00	22,24
3	24,27	42,79	40,00	21,37
4	31,2	38,15	39,00	22,21
5	31,94	40,38	48,00	22,16
<b>Mitjana</b>	30,50	39,65	42,8	22,28
<b>SD</b>	5,56	1,98	3,56	0,73
<b>CV</b>	18,21	5,00	8,33	3,29

CV: coeficient de variació; SD: desviació estàndard

Mostra	Centaur	Cobas	MS	TSTII
6	192,8	154,1	202	220,2
7	178,86	161,7	212	225,11
8	166,07	160,2	195	224,04
9	148,04	158,3	157	219,11
10	169,74	156,2	176	221,23
<b>Mitjana</b>	171,10	158,10	188,40	221,94
<b>SD</b>	16,51	3,04	21,94	2,55
<b>CV</b>	9,65	1,92	11,64	1,15

CV: coeficient de variació; SD: desviació estàndard

CONTROL	Centaur	Cobas	MS	TSTII
11	106,4	176,2	168	198,82
12	98,74	175,9	166	210,48
13	94,57	174,5	171	204,34
14	95,16	180	173	211,44
15	90,63	181,4	151	210,73
<b>Mitjana</b>	97,10	177,60	165,80	207,16
<b>SD</b>	5,94	2,94	8,70	5,47
<b>CV</b>	6,12	1,66	5,25	2,64

CV: coeficient de variació; SD: desviació estàndard

## 8.2.2 Concentració de castració pels diferents mètodes

Advia Centaur® XP:

Percentil	Testosterona (ng/dL)	Interval de confiança 95%
2,5	12,17	-
5	13,27	11,25 - 14,39
10	14,28	13,45 - 18,04
25	19,73	18,26 - 25,18
75	44,61	40,57 - 50,59
90	62,07	52,37 - 75,82
95	76,27	61,36 - 83,81
97,5	82,65	-

Cobas®:

Percentil	Testosterona (ng/dL)	Interval de confiança 95%
2,5	2,50	-
5	2,50	2,5 - 2,5
10	2,50	2,5 - 2,5
25	3,70	2,5 - 6,04
75	21,01	15,68 - 24,62
90	28,41	24,95 - 35,66
95	36,48	28,24 - 43,57
97,5	41,42	-

## Bibliografia

---

## 9 BIBLIOGRAFIA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30. doi:10.3322/caac.21442
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
3. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/>. Accessed April 2, 2020.
4. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2020 Hombres. *Soc Española Oncol Médica.* 2020:36.
5. The Global Cancer Observatory G. Source: Globocan 2018. *World Heal Organ.* 2019;876:2018-2019. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>.
6. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2893-2917. doi:10.1002/ijc.25516
7. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262
8. Larrañaga N, Galceran J, Ardanaz E, et al. Prostate cancer incidence trends in Spain before and during the prostate-specific antigen era: Impact on mortality. *Ann Oncol.* 2010;21(SUPPL.3):83-89. doi:10.1093/annonc/mdq087
9. SEER Stat Fact Sheets : Breast Cancer How Many People Survive 5 Years Or More after Being Diagnosed with Breast. *Natl Cancer Inst.* <https://seer.cancer.gov>.
10. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol.* 2012;4(1):1-11. doi:10.2147/CLEP.S16747

11. Blanc-Lapierre A, Spence A, Karakiewicz PI, Aprikian A, Saad F, Parent MÉ. Metabolic syndrome and prostate cancer risk in a population-based case-control study in Montreal, Canada *Chronic Disease epidemiology. BMC Public Health.* 2015;15(1):1-11. doi:10.1186/s12889-015-2260-x
12. Esposito K, Chiodini P, Capuano A, et al. Effect of metabolic syndrome and its components on prostate cancer risk: Meta-analysis. *J Endocrinol Invest.* 2013;36(2):132-139. doi:10.1007/BF03346748
13. Margel D. Metformin to prevent prostate cancer: A call to unite. *Eur Urol.* 2014;66(6):1021-1023. doi:10.1016/j.eururo.2014.05.012
14. Freedland SJ, Hamilton RJ, Gerber L, et al. Statin use and risk of prostate cancer and high-grade prostate cancer: Results from the REDUCE study. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2013;16(3):254-259. doi:10.1038/pcan.2013.10
15. Davies NM, Gaunt TR, Lewis SJ, et al. The effects of height and BMI on prostate cancer incidence and mortality: a Mendelian randomization study in 20,848 cases and 20,214 controls from the PRACTICAL consortium. *Cancer Causes Control.* 2015;26(11):1603-1616. doi:10.1007/s10552-015-0654-9
16. Vidal AC, Howard LE, Moreira DM, Castro-Santamaria R, Andriole GL, Freedland SJ. Obesity Increases the Risk for High-Grade Prostate Cancer: Results from the REDUCE Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(12):2936-2942. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0795
17. Mottet N, Cornford P, R.C.N. van der B, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. *Present durant EAU Annu Congr Amsterdam 2020.* 2020. <http://uroweb.org/guidelines/compilations-of-all-guidelines/>.
18. Red Española de Registros de Cáncer, Galceran J, Amejide A, et al. Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. *Red Española Regist Cáncer.* 2014:59. doi:10.1002/ajmg.a.37352
19. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: Results of EURO CARE-5 - A population-based study. *Lancet Oncol.* 2014;15(1):23-34. doi:10.1016/S1470-2045(13)70546-1

20. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, et al. EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer*. 2009;45(6):931-991. doi:10.1016/j.ejca.2008.11.018
21. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumors, 8th Edition*. 8th ed.; 2017.
22. Cooperberg M, Pasta D, Elkin E, et al. The UCSF Cancer of the Prostate Risk Assessment (CAPRA) Score: a straightforward and reliable preoperative predictor of disease recurrence after radical prostatectomy. *J Urol*. 2005;173(6):1938-1942. doi:10.1097/01.ju.0000158155.33890.e7.The
23. Gleason DF, Mellinger GT, Ardring LJ. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*. 1974;111(1):58-64. doi:10.1016/S0022-5347(17)59889-4
24. Heidenreich a, Bolla M, Joniau S, et al. Guía clínica sobre el cáncer de próstata. *Eur Assoc Urol*. 2010:196.
25. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol*. 2017;71(4):618-629. doi:10.1016/j.eururo.2016.08.003
26. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(2):244-252. doi:10.1097/PAS.0000000000000530
27. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, et al. A contemporary prostate cancer grading system: a validated alternative to the Gleason Score. *Eur Urol*. 2016;69(3):428-435. doi:10.1016/j.eururo.2015.06.046.A
28. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. The European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer – Prostate Cancer Mortality at 13 Years of Follow-up. *Lancet*. 2014;384(9959):2027-2035. doi:10.1016/S0140-6736(14)60525-0
29. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, et al. Prostate cancer screening in the

- randomized prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial: Mortality results after 13 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(2):125-132. doi:10.1093/jnci/djr500
30. de Koning HJ, Gulati R, Moss SM, et al. The efficacy of prostate-specific antigen screening: Impact of key components in the ERSPC and PLCO trials. *Cancer.* 2018;124(6):1197-1206. doi:10.1002/cncr.31178
  31. Hugosson J, Roobol MJ, Månsson M, et al. A 16-yr Follow-up of the European Randomized study of Screening for Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2019;76(1):43-51. doi:10.1016/j.eururo.2019.02.009
  32. Fenton JJ, Weyrich MS, Durbin S, Liu Y, Bang H, Melnikow J. Prostate-specific antigen-based screening for prostate cancer evidence report and systematic review for the us preventive services task force. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2018;319(18):1914-1931. doi:10.1001/jama.2018.3712
  33. Eckersberger E, Finkelstein J. Screening for prostate cancer: a review of the ERSPC and PLCO trials. *Rev Urol.* 2009;11(3):127-133. doi:10.3909/riu0474
  34. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Elise Redwine BA. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med.* 1987;317(15):909-916. doi:10.1056/NEJM198710083171501
  35. Filella Pla X. Marcadors tumoral en el càncer de pròstata: del laboratori a la pràctica clínica. *Vitr Verit.* 2013;14:58-74.
  36. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: A prospective multicenter clinical trial. *J Am Med Assoc.* 1998;279(19):1542-1547. doi:10.1001/jama.279.19.1542
  37. Roobol MJ, Steyerberg EW, Kranse R, et al. A Risk-Based Strategy Improves Prostate-Specific Antigen-Driven Detection of Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2010;57(1):79-85. doi:10.1016/j.eururo.2009.08.025
  38. Stephan C, Klaas M, Müller C, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Interchangeability of measurements of total and free prostate-specific antigen in serum with 5 frequently used assay combinations: An update. *Clin Chem.*



2006;52(1):59-64. doi:10.1373/clinchem.2005.059170

39. Eastham J a, Riedel E, Scardino PT, et al. Variation of serum prostate-specific antigen levels: an evaluation of year-to-year fluctuations. 2003;289(20):2695-2700. doi:10.1001/jama.289.20.2695
40. Eichler K, Hempel S, Wilby J, Myers L, Bachmann LM, Kleijnen J. Diagnostic Value of Systematic Biopsy Methods in the Investigation of Prostate Cancer: A Systematic Review. *J Urol*. 2006;175(5):1605-1612. doi:10.1016/S0022-5347(05)00957-2
41. Shariat SF, Roehrborn CG. Using biopsy to detect prostate cancer. *Rev Urol*. 2008;10(4):262-280.
42. Jeffrey C. Weinreba, Jelle O. Barentszb, Peter L. Choykec, Francois Cornudd, Masoom A. Haidere, Katarzyna J. Macuraf, Daniel Margolisg, Mitchell D. Schnallh, Faina Shterni, Clare M. Tempanyj, Harriet C. Thoenyk, and Sadna VermaIJeffrey C. Weinreba,† and SV. PI-RADS Prostate Imaging – Reporting and Data System: 2015, Version 2. *Eur Urol*. 2016;69(1):16-40. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
43. Bolla M, Van Tienhoven G, Warde P, et al. External irradiation with or without long-term androgen suppression for prostate cancer with high metastatic risk: 10-year results of an EORTC randomised study. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1066-1073. doi:10.1016/S1470-2045(10)70223-0
44. Pilepich M V., Winter K, Lawton CA, et al. Androgen suppression adjuvant to definitive radiotherapy in prostate carcinoma - Long-term results of phase III RTOG 85-31. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;61(5):1285-1290. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.08.047
45. Roach M, Bae K, Speight J, et al. Short-term neoadjuvant androgen deprivation therapy and external-beam radiotherapy for locally advanced prostate cancer: Long-term results of RTOG 8610. *J Clin Oncol*. 2008;26(4):585-591. doi:10.1200/JCO.2007.13.9881
46. Denham JW, Steigler A, Lamb DS, et al. Short-term neoadjuvant androgen deprivation and radiotherapy for locally advanced prostate cancer: 10-year data from the TROG 96.01 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(5):451-459.

doi:10.1016/S1470-2045(11)70063-8

47. D'Amico A V., Chen MH, Renshaw AA, Loffredo M, Kantoff PW. Androgen suppression and radiation vs radiation alone for prostate cancer: A randomized trial. *J Am Med Assoc.* 2008;299(3):289-295. doi:10.1001/jama.299.3.289
48. Klotz L, McNeill I, Fleshner N. A phase 1-2 trial of diethylstilbestrol plus low dose warfarin in advanced prostate carcinoma. *J Urol.* 1999;161(1):169-172. doi:10.1016/S0022-5347(01)62089-5
49. Farrugia F, Ansell W, Singh M, Philp T, Chinegwundoh F, Oliver RTD. Stilboestrol plus adrenal suppression as salvage treatment for patients failing LHRH analogues/ orchidectomy. *BJU Int.* 2000;85(9):1069-1073.
50. Hedlund PO, Ala-Opas M, Brekkan E, et al. Parenteral estrogen versus combined androgen deprivation in the treatment of metastatic prostatic cancer: Scandinavian Prostatic Cancer Group (SPCG) Study No. 5. *Scand J Urol Nephrol.* 2002;36(6):405-413. doi:10.1080/003655902762467549
51. Dalesio O, Van Tinteren H, Clarke M, Peto R, Schroder FH. Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer: An overview of the randomised trials. *Lancet.* 2000;355:1491-1498. doi:10.1016/S0140-6736(00)02163-2
52. Akaza H, Hinotsu S, Usami M, et al. Combined androgen blockade with bicalutamide for advanced prostate cancer: Long-term follow-up of a phase 3, double-blind, randomized study for survival. *Cancer.* 2009;115(15):3437-3445. doi:10.1002/cncr.24395
53. Schmitt B, Bennett C, Seidenfeld J, Samson D, Wilt T. Maximal androgen blockade for advanced prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 1999;(2):1-52. doi:10.4103/0970-1591.60463
54. Sathianathen N, Philippou Y, Kuntz G, et al. Taxane-based chemohormonal therapy for metastatic hormone-sensitive prostate cancer (Review). 2018;(10). doi:10.1002/14651858.CD012816.pub2.www.cochranelibrary.com
55. Fizazi K, Tran NP, Fein L, et al. Abiraterone plus prednisone in metastatic, castration-sensitive prostate cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(4):352-360. doi:10.1056/NEJMoa1704174

56. Rydzewska LHM, Burdett S, Vale CL, et al. Adding abiraterone to androgen deprivation therapy in men with metastatic hormone-sensitive prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2017;84(2017):88-101. doi:10.1016/j.ejca.2017.07.003
57. Hoyle AP, Ali A, James ND, et al. Abiraterone in “High-” and “Low-risk” Metastatic Hormone-sensitive Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2019;76(6):719-728. doi:10.1016/j.eururo.2019.08.006
58. Chi KN, Agarwal N, Bjartell A, et al. Apalutamide for metastatic, castration-sensitive prostate cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(1):13-24. doi:10.1056/NEJMoa1903307
59. Davis ID, Martin AJ, Stockler MR, et al. Enzalutamide with standard first-line therapy in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(2):121-131. doi:10.1056/NEJMoa1903835
60. Armstrong AJ, Szmulewitz RZ, Petrylak DP, et al. Arches: A randomized, phase III study of androgen deprivation therapy with enzalutamide or placebo in men with metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37(32):2974-2986. doi:10.1200/JCO.19.00799
61. Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2017;71(4):630-642. doi:10.1016/j.eururo.2016.08.002
62. Testosterone | C19H28O2 - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Testosterone>. Accessed May 19, 2020.
63. Nishiyama T. Serum testosterone levels after medical or surgical androgen deprivation: A comprehensive review of the literature. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2014;32(1):38.e17-38.e28. doi:10.1016/j.urolonc.2013.03.007
64. Luis J, Índice A. Tema 1 Fisiología hormonal masculina. 2012. <http://www.aeu.es/userfiles/muestramaterialdocentecfsh.pdf>. Accessed May 9, 2020.

65. Schiffer L, Kempegowda P, Arlt W, Reilly MWO. The sexually dimorphic role of androgens in human metabolic disease. *Eur J Endocrinol*. 2017;177:R125-R143. doi:10.1530/EJE-17-0124
66. Toorians AWFT, Kelleher S, Gooren LJ, Jimenez M, Handelsman DJ. Estimating the Contribution of the Prostate to Blood Dihydrotestosterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5207-5211. doi:10.1210/jc.2003-030521
67. Arrondo L. Fisiología hormonal masculina. 2004:1-12.  
<http://www.aeu.es/userfiles/muestramaterialdocentecfsh.pdf>.
68. Goldman AL, Bhasin S, Wu FCW, Krishna M, Matsumoto AM, Jasuja R. A reappraisal of testosterone's binding in circulation: Physiological and clinical implications. *Endocr Rev*. 2017;38(4):302-324. doi:10.1210/ER.2017-00025
69. Manni A, Pardridge WM, Cefalu W, et al. Bioavailability of albumin-bound testosterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;61(4):705-710. doi:10.1210/jcem-61-4-705
70. Pardridge WM. 4 Serum bioavailability of sex steroid hormones. *Clin Endocrinol Metab*. 1986;15(2):259-278. doi:10.1016/S0300-595X(86)80024-X
71. Swerdloff RS, Dudley RE, Page ST, Wang C, Salameh WA. Dihydrotestosterone: Biochemistry, physiology, and clinical implications of elevated blood levels. *Endocr Rev*. 2017;38(3):220-254. doi:10.1210/er.2016-1067
72. Travison TG, Vesper HW, Orwoll E, et al. Harmonized reference ranges for circulating testosterone levels in men of four cohort studies in the United States and Europe. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(4):1161-1173. doi:10.1210/jc.2016-2935
73. Chada M, Průša R, Bronsky J, Pechová M, Kotaška K, Lisá L. Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol and their relationship to the regulation of follicle development in girls during childhood and puberty. *Physiol Res*. 2003;52(3):45-51.
74. Brinkmann AO. Molecular Mechanisms of Androgen Action – A Historical Perspective. *Methods Mol Biol*. 2011;776:3-24. doi:10.1007/978-1-61779-243-4

75. Tan ME, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(1):3-23. doi:10.1038/aps.2014.18
76. Zhu Y, Imperato-mcginley JL. 5  $\alpha$  -Reductase Isozymes and Androgen Actions in the Prostate. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1155:43-56. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04115.x
77. Foradori CD, Weiser M, Handa RJ. Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29(2):169-181. doi:10.1038/jid.2014.371
78. Lee DK, Chang C. Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;84(1):41-49. doi:10.1016/S0960-0760(03)00005-0
79. Rahman F, Christian HC. Non-classical actions of testosterone: an update. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(10):371-378. doi:10.1016/j.tem.2007.09.004
80. Castaño MA, Díaz J, Paredes F. *Bioquímica Clínica: De La Patología Al Laboratorio.* Ergon.; 2008.
81. Melmed S, Jameson JL. Hipófisis anterior: fisiología de las hormonas hipofisarias. *Harrison Principios Med Interna, 20e.* 2018:1-13. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1156359134>.
82. Basaria S. Male hypogonadism. *Lancet.* 2014;383(9924):1250-1263. doi:10.1016/S0140-6736(13)61126-5
83. M. Pombo, L. Audí, M. Bueno, R. Calzada, F. Cassorla, C. Diéguez, A. Ferrández, J. J. Heinrich, R. Lanes, M. Moya, R. Sandrini RT. *Tratado de Endocrinología Pediátrica, 4ª Edición.*; 2009.
84. Blanco AC, Longás AF, Dehesa EM, Aizpún JIL. Valores de referencia de FSH, LH, testosterona total, testosterona libre, 17-  $\beta$  -estradiol y SHBG en niños sanos zaragozanos. *An Españoles Pediatr.* 1999;51(2):159-166.
85. Huggins C, Hodges C V. Studies on Prostatic Cancer I. The effect of castration of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res.* 1941;1:293-297.

doi:10.1001/archsurg.1941.01210140043004

86. Schulman CC, Irani J, Morote J, et al. Testosterone Measurement in Patients with Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2010;58(1):65-74.  
doi:10.1016/j.eururo.2010.04.001
87. Van Der Sluis TM, Vis AN, Van Moorselaar RJA, et al. Intraprostatic testosterone and dihydrotestosterone. Part I: Concentrations and methods of determination in men with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *BJU Int*. 2011;109(2):176-182. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10651.x
88. Rove KO, Debruyne FM, Djavan B, et al. Role of testosterone in managing advanced prostate cancer. *Urology*. 2012;80(4):754-762.  
doi:10.1016/j.urology.2012.05.006
89. David Crawford E, Phillips JM. Six-month gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist depots provide efficacy, safety, convenience, and comfort. *Cancer Manag Res*. 2011;3(1):201-209. doi:10.2147/CMR.S12700
90. Tolis G, Ackman D, Stellos A, et al. Tumor growth inhibition in patients with prostatic carcinoma treated with luteinizing hormone-releasing hormone agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(5):1658-1662.  
doi:10.1073/pnas.79.5.1658
91. Van Loenen ACD, Huirne JAF, Schats R, Hompes PGA, Lambalk CB. GnRH agonist, antagonists, and assisted conception. *Semin Reprod Med*. 2002;20(4):349-364. doi:10.1055/s-2002-36713
92. Sharifi R, Browneller R. Serum testosterone suppression and potential for agonistic stimulation during chronic treatment with monthly and 3-month depot formulations of leuprolide acetate for advanced prostate cancer. *J Urol*. 2002;168(3):1001-1004. doi:10.1097/01.ju.0000024761.04966.07
93. Schlegel PN. Efficacy and safety of histrelin subdermal implant in patients with advanced prostate cancer. *J Urol*. 2006;175(4):1353-1358. doi:10.1016/S0022-5347(05)00649-X
94. Spitz a, Young JM, Larsen L, Mattia-Goldberg C, Donnelly J, Chwalisz K. Efficacy and safety of leuprolide acetate 6-month depot for suppression of

- testosterone in patients with prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2012;15(1):93-99. doi:10.1038/pcan.2011.50
95. Miyazawa Y, Kato H, Arai S, et al. Clinical endocrinological evaluation of the gonadal axis (testosterone, LH and FSH) in prostate cancer patients switched from a GnRH antagonist to a LHRH agonist. *Basic Clin Androl.* 2015;25(7):1-8. doi:10.1186/s12610-015-0023-2
  96. Eckstein N, Haas B. Clinical pharmacology and regulatory consequences of GnRH analogues in prostate cancer. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;70(7):791-798. doi:10.1007/s00228-014-1682-1
  97. Labrie F, Bélanger A, Luu-The V, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonists in the treatment of prostate cancer. *Endocr Rev.* 2005;26(3):361-379. doi:10.1210/er.2004-0017
  98. Rove KO, Crawford ED, Perachino M, et al. Maximal testosterone suppression in prostate cancer-free vs total testosterone. *Urology.* 2014;83(6):1217-1222. doi:10.1007/s00705-008-0155-1
  99. Leuprolide versus diethylstilbestrol for metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 1984;311(20):1281-1286.
  100. Oefelein MG, Feng A, Scolieri MJ, Ricchiutti D, Resnick MI. Reassessment of the definition of castrate levelsof Testosterone : Implications for Clinical Decision Making. *Urology.* 2000;56(6):1021-1024.
  101. Morote J, Orsola A, Planas J, et al. Redefining clinically significant castration levels in patients with prostate cancer receiving continuous androgen deprivation therapy. *J Urol.* 2007;178(4 Pt 1):1290-1295. doi:10.1016/j.juro.2007.05.129
  102. Perachino M, Cavalli V, Bravi F. Testosterone levels in patients with metastatic prostate cancer treated with luteinizing hormone-releasing hormone therapy: prognostic significance? *BJU Int.* 2010;105(5):648-651. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.08814.x
  103. Reis LO. Variations of serum testosterone levels in prostate cancer patients under LH-releasing hormone therapy: An open question. *Endocr Relat Cancer.* 2012;19(3):93-98. doi:10.1530/ERC-12-0040

104. Klotz L, Breau RH, Collins LL, et al. Maximal testosterone suppression in the management of recurrent and metastatic prostate cancer. *J Can Urol Assoc.* 2017;11(1-2):16-23. doi:10.5489/cuaj.4303
105. Dason S, Allard CB, Tong J, Shayegan B. Defining a new testosterone threshold for medical castration: Results from a prospective cohort series. *J Can Urol Assoc.* 2013;7(5-6):263-267. doi:10.5489/cuaj.471
106. Kawakami J, Morales A. Clinical significance of suboptimal hormonal levels in men with prostate cancer treated with LHRH agonists. *Can Urol Assoc J.* 2013;7(3-4):e226-30. doi:10.5489/cuaj.540
107. Klotz L, O'Callaghan C, Ding K, et al. Nadir testosterone within first year of androgen-deprivation therapy (ADT) predicts for time to castration-resistant progression: A secondary analysis of the PR-7 trial of intermittent versus continuous ADT. *J Clin Oncol.* 2015;33(10):1151-1156. doi:10.1200/JCO.2014.58.2973
108. Wang Y, Dai B, Ye DW. Serum testosterone level predicts the effective time of androgen deprivation therapy in metastatic prostate cancer patients. *Asian J Androl.* 2017;19(2):178-183. doi:10.4103/1008-682X.174856
109. Bertaglia V, Tucci M, Fiori C, et al. Effects of serum testosterone levels after 6 months of androgen deprivation therapy on the outcome of patients with prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2013;11(3):325-330.e1. doi:10.1016/j.clgc.2013.01.002
110. Klotz L, Shayegan B, Guillemette C, et al. Testosterone suppression in the treatment of recurrent or metastatic prostate cancer — A Canadian consensus statement. *J Can Urol Assoc.* 2018;12(2):30-37. doi:10.5489/cuaj.5116
111. Chu FM, Jayson M, Dineen MK, Perez R, Harkaway R, Tyler RC. A clinical study of 22.5 mg. La-2550: A new subcutaneous depot delivery system for leuprolide acetate for the treatment of prostate cancer. *J Urol.* 2002;168(3):1199-1203. doi:10.1097/01.ju.0000023895.95963.1b
112. Sartor O, Dineen MK, Perez-Marreno R, Chu FM, Carron GJ, Tyler RC. An eight-month clinical study of LA-2575 30.0 mg: A new 4-month, subcutaneous delivery system for leuprolide acetate in the treatment of prostate cancer.



*Urology*. 2003;62(2):319-323. doi:10.1016/S0090-4295(03)00330-3

113. St-Arnaud R, Lachance R, Kelly SJ, Belanger A, Dupont A LF. Loss of luteinizing hormone bioactivity in patients with prostatic cancer treated with an LHRH agonist and a pure antiandrogen. *Clin Endocrinol*. 1986;24(1):21-30. doi:10.1111/j.1365-2265.1986.tb03250.x
114. Klotz L, Boccon-Gibod L, Shore ND, et al. The efficacy and safety of degarelix: A 12-month, comparative, randomized, open-label, parallel-group phase III study in patients with prostate cancer. *BJU Int*. 2008;102(11):1531-1538. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08183.x
115. De La Rosette J, Davis R, Frankel D, Kold Olesen T. Efficacy and safety of androgen deprivation therapy after switching from monthly leuprolide to monthly degarelix in patients with prostate cancer. *Int J Clin Pract*. 2011;65(5):559-566. doi:10.1111/j.1742-1241.2011.02637.x
116. Papakonstantinou A, Foukakis T, Rodriguez-Wallberg KA, Bergh J. Is estradiol monitoring necessary in women receiving ovarian suppression for breast cancer? *J Clin Oncol*. 2016;34(14):1573-1579. doi:10.1200/JCO.2015.65.3493
117. Kendirci HNP, Ağladioğlu SY, Baş VN, Önder A, Çetinkaya S, Aycan Z. Evaluating the Efficacy of Treatment with a GnRH Analogue in Patients with Central Precocious Puberty. *Int J Endocrinol*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/247386
118. Bhatia S, Neely EK, Wilson DM. Serum luteinizing hormone rises within minutes after depot Leuprolide Injection : Implications for Monitoring Therapy. *Pediatrics*. 2002;109(2):1-6. doi:10.1542/peds.109.2.e30
119. Eugster EA. Treatment of Central Precocious Puberty. *J Endocr Soc*. 2019;3(5):965-972. doi:10.1210/js.2019-00036
120. Neely EK, Silverman LA, Geffner ME, Danoff TM, Gould E, Thornton PS. Random unstimulated pediatric luteinizing hormone levels are not reliable in the assessment of pubertal suppression during histrelin implant therapy. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2013;2013(1):20. doi:10.1186/1687-9856-2013-20
121. Nakagawa K, Mcniven NL, Forchielli E, Vermeulen A, Dorfman RI. Determination

- of testosterone by gas-liquid chromatography using an electron capture detector  
I. Responses of halo-alkyl derivate. *Steroids*. 1966;7(4):329-340.  
doi:10.1016/0039-128x(66)90104-8
122. Rivarola Marco. A, Migeon J C. Determination of testosterone and androst-4-ene-3,17-dione concentration in human plasma. *Steroids*. 1966;7(2):103-117.  
doi:10.1016/0039-128x(66)90019-5
123. 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;89(2):534-543. doi:10.1210/jc.2003-031287
124. Taieb J, Mathian B, Millot F, 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;49(8):1381-1395.  
doi:10.1373/49.8.1381
125. Matsumoto AM, Bremner WJ. Editorial: Serum Testosterone Assays - Accuracy Matters. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(2):520-524. doi:10.1210/jc.2003-032175
126. Carmen M, Gómez M, González MB. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. *Monogr la Real ....* 2010:113-168.
127. Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) - Technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007;115(9):559-570. doi:10.1055/s-2007-981458
128. Shimadzu Corporation. Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS). 2019:61.
129. Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: How to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(2):D1-D12. doi:10.1530/EJE-15-0338
130. Grebe SKG, Singh RJ. LC-MS/MS in the clinical laboratory - Where to from here? *Clin Biochem Rev*. 2011;32(1):5-31.

131. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, Bergquist J, Meikle AW. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. *Clin Biochem.* 2011;44(1):77-88.  
doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.07.008
132. Büttler RM, Martens F, Fanelli F, et al. Comparison of 7 published LC-MS/MS methods for the simultaneous measurement of testosterone, androstenedione, and dehydroepiandrosterone in serum. *Clin Chem.* 2015;61(12):1475-1483.  
doi:10.1373/clinchem.2015.242859
133. Vesper HW, Botelho JC, Wang Y. Challenges and improvements in testosterone and estradiol testing. *Asian J Androl.* 2014;16(2):178-184. doi:10.4103/1008-682X.122338
134. Stanczyk FZ, Lee JS, Santen RJ. Standardization of steroid hormone assays: Why, how, and when? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(9):1713-1719. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0765
135. Herati AS, Cengiz C, Lamb DJ. Assays of Serum Testosterone. *Urol Clin North Am.* 2016;43(2):177-184. doi:10.1016/j.ucl.2016.01.003
136. Thienpont LM, Van Uytendange K, Blincko S, et al. State-of-the-art of serum testosterone measurement by isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2008;54(8):1290-1297.  
doi:10.1373/clinchem.2008.105841
137. Owen LJ, MacDonald PR, Keevil BG. Is calibration the cause of variation in liquid chromatography tandem mass spectrometry testosterone measurement? *Ann Clin Biochem.* 2013;50(Pt 4):368-370. doi:10.1177/0004563212474563
138. 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(2):405-413. doi:10.1210/jc.2006-1864
139. Rosner W, Vesper H. Toward excellence in testosterone testing: A consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(10):4542-4548.  
doi:10.1210/jc.2010-1314

140. Vesper HW, Botelho JC, Shacklady C, Smith A, Myers GL. CDC project on standardizing steroid hormone measurements. *Steroids*. 2008;73(13):1286-1292. doi:10.1016/j.steroids.2008.09.008
141. 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;415:109-117. doi:10.1016/j.cca.2012.10.007
142. Botelho JC, Shacklady C, Cooper HC, et al. Isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry candidate reference method for total testosterone in human serum. *Clin Chem*. 2013;59(2):372-380. doi:10.1373/clinchem.2012.190934
143. McEnroe RJ. *Clinical and Laboratory Standards Institute Document EP05-A3: Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures, 3rd Edition.*; 2014.
144. Paduch DA, Brannigan RE, Fuchs EF, Kim ED, Marmar JL, Sandlow JL. The laboratory diagnosis of testosterone deficiency. *Urology*. 2014;83(5):980-988. doi:10.1016/j.urology.2013.12.024
145. Clinical and Laboratory Standards Institute. EP28-A3c: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. 2010;28(October):12. doi:56238-682-4
146. Herold DA, Fitzgerald RL. Immunoassays for testosterone in women: Better than a guess? *Clin Chem*. 2003;49(8):1250-1251. doi:10.1373/49.8.1250
147. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. Position statement: Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: An androgen excess society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(11):4237-4245. doi:10.1210/jc.2006-0178
148. Carruthers M, Trinick TR, Wheeler MJ. The validity of androgen assays. *CPD Bull Clin Biochem*. 2007;10(3):165-172. doi:10.1080/13685530701483738
149. Moal V, Mathieu E, Reynier P, Malthièry Y, Gallois Y. Low serum testosterone assayed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison with

- five immunoassay techniques. *Clin Chim Acta*. 2007;386(1-2):12-19.  
doi:10.1016/j.cca.2007.07.013
150. Kane J, Middle J, Cawood M. Measurement of serum testosterone in women; what should we do? *Ann Clin Biochem*. 2007;44:5-15.  
doi:10.1258/000456307779595896
151. Bell A, Meek CL, Viljoen A. Evidence of biochemical hyperandrogenism in women: The limitations of serum testosterone quantitation. *J Obstet Gynaecol*. 2012;32(4):367-371. doi:10.3109/01443615.2012.656741
152. Vesper HW, Bhasin S, Wang C, et al. Interlaboratory comparison study of serum total testosterone measurements performed by mass spectrometry methods. *Steroids*. 2009;74(6):498-503. doi:10.1016/j.steroids.2009.01.004
153. Büttler RM, Martens F, Ackermans MT, et al. Comparison of eight routine unpublished LC–MS/MS methods for the simultaneous measurement of testosterone and androstenedione in serum. *Clin Chim Acta*. 2016;454:112-118. doi:10.1016/j.cca.2016.01.002
154. Fanelli F, Gambineri A, Mezzullo M, et al. Revisiting hyper- and hypo-androgenism by tandem mass spectrometry. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(2):185-205. doi:10.1007/s11154-013-9243-y
155. Sacks SS. Are routine testosterone assays good enough? *Clin Biochem Rev*. 2005;26(1):43-45.
156. Morote J, Regis L, Planas ACJ. Determinación de la testosterona sérica durante la supresión androgénica en pacientes con cáncer de próstata : una revisión sistemática. *Actas Urológicas Españolas*. 2016;40(8):477-484.
157. Morote J, Comas I, Planas J, Celma A, Ferrer R, Regis L. Behavior of chemiluminescent assays to measure serum testosterone during androgen deprivation therapy. *Int J Urol*. 2016;23(11):957-963. doi:10.1111/iju.13180
158. Urrútia G, Bonfill X. Declaración PRISMA: una propuesta para mejorar la publicación de revisiones sistemáticas y metaanálisis. *Med Clin (Barc)*. 2010;135(11):507-511. doi:10.1016/j.medcli.2010.01.015

159. McShane LM, Dorgan JF, Greenhut S, Damato JJ. Reliability and validity of serum sex hormone measurements. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996;5(11):923-928.
160. Dorgan JF, Fears TR, McMahon RP, Aronson Friedman L, Patterson BH, Greenhut SF. Measurement of steroid sex hormones in serum: A comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. *Steroids*. 2002;67:151-158. doi:10.1016/S0039-128X(01)00147-7
161. Huhtaniemi IT, Tajar A, Lee DM, et al. Comparison of serum testosterone and estradiol measurements in 3174 European men using platform immunoassay and mass spectrometry; relevance for the diagnostics in aging men. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(6):983-991. doi:10.1530/EJE-11-1051
162. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*. 2014;65(2):467-479. doi:10.1016/j.eururo.2013.11.002
163. Morote J, Planas J, Salvador C, Raventós CX, Catalán R, Reventós J. Individual variations of serum testosterone in patients with prostate cancer receiving androgen deprivation therapy. *BJU Int*. 2009;103(3):332-335. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08062.x
164. R. Bruce Montgomery, Mostaghel EA, Vessella R, et al. Maintenance of Intratumoral Androgens in Metastatic Prostate Cancer: A Mechanism for Castration-Resistant Tumor Growth R. *Cancer Res*. 2008;68(11):4447-4454.
165. Rick FG, Block NL, Schally A V. Agonists of luteinizing hormone-releasing hormone in prostate cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14(16):2237-2247. doi:10.1517/14656566.2013.834328
166. Hashimoto K, Tabata H, Shindo T, et al. Serum testosterone level is a useful biomarker for determining the optimal treatment for castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2019;37(7):485-491. doi:10.1016/j.urolonc.2019.04.026
167. Morote J, Comas I, Planas J, et al. Serum Testosterone Levels in Prostate Cancer Patients Undergoing Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonist Therapy. *Clin Genitourin Cancer*. 2017:1-6. doi:10.1016/j.clgc.2017.10.025

168. Morote J, Comas I, Ferrer R, Planas J, Celma A, Regis L. Accuracy of serum luteinizing hormone and serum testosterone measurements to assess the efficacy of medical castration in prostate cancer patients. *J Biomed Sci.* 2017;24(81):1-6. doi:10.1186/s12929-017-0386-0
169. Morote J, Comas I, Planas J. Re: Nicolas Mottet, Joaquim Bellmunt, Erik Briers, et al. EAU-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology; 2017. <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer>. How to Assess the Efficacy of Medical Castration. *Eur Urol.* 2018;73(5):e134-e135. doi:10.1016/j.eururo.2018.01.039
170. 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(10):3971-3973. doi:10.1210/jc.2013-3375
171. Comas I, Ferrer R, Planas J, Celma A, Regis L, Morote J. A systematic review of methods for quantifying serum testosterone in patients with prostate cancer who underwent castration. *Actas Urológicas Españolas (English Ed.* 2018;42(2):86-93. doi:10.1016/j.acuroe.2017.12.003
172. Owen LJ, Keevil BG. Testosterone measurement by liquid chromatography tandem mass spectrometry: the importance of internal standard choice. *Ann Clin Biochem.* 2012;49(Pt 6):600-602. doi:10.1258/acb.2012.012037
173. Salameh WA, Redor-Goldman MM, Clarke NJ, Mathur R, Azziz R, Reitz RE. Specificity and predictive value of circulating testosterone assessed by tandem mass spectrometry for the diagnosis of polycystic ovary syndrome by the NIH 1990 criteria. *Fertil Steril.* 2014;101(4):1135-1141. doi:10.1126/scisignal.2001449.Engineering
174. Morote J, Comas I, Planas J, et al. Serum Testosterone Levels in Prostate Cancer Patients Undergoing Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonist Therapy. *Clin Genitourin Cancer.* 2017;16(2):e491-e496. doi:10.1016/j.clgc.2017.10.025
175. Tombal B, Berges R. Optimal Testosterone Control and Eligard®. *Eur Urol Suppl.* 2007;6(12):754-760. doi:10.1016/j.eursup.2007.04.001
176. Perez-Marreno R, Chu FM, Gleason D, Loizides E, Wachs B, Tyler RC. A six-

- month, open-label study assessing a new formulation of leuprolide 7.5 mg for suppression of testosterone in patients with prostate cancer. *Clin Ther.* 2002;24(11):1902-1914. doi:10.1016/S0149-2918(02)80087-X
177. Marberger M, Kaisary A V., Shore ND, et al. Effectiveness, pharmacokinetics, and safety of a new sustained-release leuprolide acetate 3.75-mg depot formulation for testosterone suppression in patients with prostate cancer: A phase III, open-label, international multicenter study. *Clin Ther.* 2010;32(4):744-757. doi:10.1016/j.clinthera.2010.04.013
178. Van Der Sluis TM, Bui HN, Meuleman EJH, et al. Lower testosterone levels with luteinizing hormone-releasing hormone agonist therapy than with surgical castration: New insights attained by mass spectrometry. *J Urol.* 2012;187(5):1601-1606. doi:10.1016/j.juro.2011.12.063
179. Pickles T, Hamm J, Morris WJ, Schreiber WE, Tyldesley S. Incomplete testosterone suppression with luteinizing hormone-releasing hormone agonists: Does it happen and does it matter? *BJU Int.* 2012;110(11 B):500-507. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11190.x
180. Yasuda Y, Fujii Y, Yuasa T, Yamamoto S, Yonese J, Fukui I. Do testosterone levels have prognostic significance in patients with metastatic prostate cancer treated with combined androgen blockade? *Int J Urol.* 2015;22(1):132-133. doi:10.1111/iju.12623
181. Kamada S, Sakamoto S, Ando K, et al. Nadir Testosterone after Long-Term Followup Predicts Prognosis in Patients with Prostate Cancer Treated with Combined Androgen Blockade. *J Urol.* 2015;194(5):1264-1270. doi:10.1016/j.juro.2015.03.120
182. Nishiyama T, Ishizaki F, Anraku T, Shimura H, Takahashi K. The influence of androgen deprivation therapy on metabolism in patients with prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;10:7121-7126. doi:10.1210/jc.2004-1611
183. Regis L, Planas J, Carles J, et al. Free Testosterone During Androgen Deprivation Therapy Predicts Castration-Resistant Progression Better Than Total Testosterone. *Prostate.* 2017;77:114-120. doi:10.1002/pros.23256
184. Egawa S, Okusa H, Matsumoto K, Suyama K, Baba S. Changes in prostate-



specific antigen and hormone levels following withdrawal of prolonged ablation for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2003;6(3):245-249.  
doi:10.1038/sj.pcan.4500675

185. Planas J, Celma A, Placer J, et al. Hormonal response recovery after long-term androgen deprivation therapy in patients with prostate cancer. *Scand J Urol.* 2016;50(6):425-428. doi:10.1080/21681805.2016.1227876
186. Shahidi M, Norman AR, Gadd J, Huddart RA, Horwich A, Dearnaley DP. Recovery of serum testosterone, LH and FSH levels following neoadjuvant-hormone cytoreduction and radical radiotherapy in localized prostate cancer. *Clin Oncol.* 2001;13(4):291-295. doi:10.1053/clon.2001.9272
187. Garnick MB, Mottet N. New treatment paradigm for prostate cancer: Abarelix initiation therapy for immediate testosterone suppression followed by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *BJU Int.* 2012;110(4):499-504. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10708.x
188. Morote J, Esquena S, Abascal JM, et al. Failure to maintain a suppressed level of serum testosterone during long-acting depot luteinizing hormone-releasing hormone agonist therapy in patients with advanced prostate cancer. *Urol Int.* 2006;77(2):135-138. doi:10.1159/000093907
189. Morote J, Comas I, Ferrer R, et al. Serum luteinizing hormone testing can identify optimal medical castration. 2020;19:24-26.
190. Huhtaniemi IT, Petri V, Gunther J, Sakari R. Response of circulating gonadotropin levels to GnRH agonist treatment in prostatic cancer. *J Androl.* 1991;12(1):46-53.