

## RACCOMANDAZIONI E LINEE GUIDA

# Ormoni steroidei surrenalici: androstenedione

## Adrenal steroid hormones: androstenedione

Matteo D'AGOSTINI <sup>1</sup> \*, Maria A. INCALZA <sup>2</sup><sup>1</sup>UOC Laboratorio Analisi Cliniche, Area Clinica di Medicina Diagnostica e di Laboratorio, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia; <sup>2</sup>UOC Patologia Clinica POC, ASL Taranto, Taranto, Italia\*Autore di contatto: Matteo D'Agostini, UOC Laboratorio Analisi Cliniche, Area Clinica di Medicina Diagnostica e di Laboratorio, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia. E-mail: [matteo.dagostini@opbg.net](mailto:matteo.dagostini@opbg.net)

### RIASSUNTO

L'androstenedione è un intermedio della biosintesi degli androgeni. Esso origina da altri precursori steroidei quali il deidroepiandrosterone e il 17-idrossiprogesterone ed è successivamente convertito in testosterone o in estrone. Il suo dosaggio trova impiego nel sospetto di iperandrogenismo, condizione riscontrata principalmente nei difetti della steroidogenesi surrenalica (iperplasia surrenalica congenita), nel deficit di aromatasi, in alcune neoplasie secernenti androgeni e nella sindrome dell'ovaio policistico, condizione in cui il dosaggio dell'androstenedione si è dimostrato molto più sensibile degli altri androgeni nell'identificare la malattia. I metodi di dosaggio attualmente utilizzati in laboratorio prevedono sia l'utilizzo di saggi immunometrici sia l'applicazione della spettrometria di massa accoppiata alla cromatografia liquida. Quest'ultima risulta molto più sensibile e più specifica analiticamente rispetto ai saggi immunometrici; tuttavia relativamente al dosaggio dell'androstenedione vi sono ancora pochi dati di letteratura e sono ancora da perfezionare la standardizzazione e l'armonizzazione.

(Per citare questo articolo: D'Agostini M, Incalza MA. Ormoni steroidei surrenalici: androstenedione. Riv Ital Med Lab 2024 Oct 03. DOI: 10.23736/S1825-859X.24.00258-5)

### ABSTRACT

Androstenedione is an intermediate in the biosynthesis of androgens. It originates from other steroid precursors such as dehydroepiandrosterone and 17-hydroxyprogesterone and is subsequently converted into testosterone or estrone. Androstenedione determination is used in suspected hyperandrogenism, a condition found mainly in defects of adrenal steroidogenesis (congenital adrenal hyperplasia), in aromatase deficiency, in some androgen-secreting neoplasms and in polycystic ovary syndrome, a condition in which the dosage of androstenedione has proven to be much more sensitive than other androgens in identifying the disease. The methods currently used in laboratory involve both the use of immunological assays and the application of mass spectrometry coupled to liquid chromatography. The latter is much more sensitive and more specific analytically than immunometric assays, which are characterized by numerous limitations; however, regarding androstenedione determination, there is still little data in the literature and standardization and harmonization still need to be achieved.

**Key words:** Androstenedione; Reference values; Congenital adrenal hyperplasia; Polycystic ovary syndrome.

### Introduzione

Il gruppo di Studio in Endocrinologia e Malattie del Metabolismo della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (GdS-EMM SIPMeL) ha inteso portare all'attenzione dei colleghi professionisti di

laboratorio le caratteristiche biologiche dell'androstenedione, nonché il suo uso nella pratica clinica. In questo contributo sono descritti il metabolismo, la funzione e il significato biologico, gli aspetti analitici e clinici e sono elencate le raccomandazioni sul corretto utilizzo di questo marcatore.

### Struttura e caratteristiche molecolari

L'androstenedione o androst-4-ene-3,17-dione o delta 4-androstenedione è un intermedio del *pathway* biosin-

tetico degli androgeni; esso partecipa sia alla genesi del testosterone tramite l'azione dell'enzima 17 beta-idrossisteroide deidrogenasi (17βHSD) sia dell'estrone attraverso l'azione del complesso dell'aromatasi.<sup>1,2</sup>

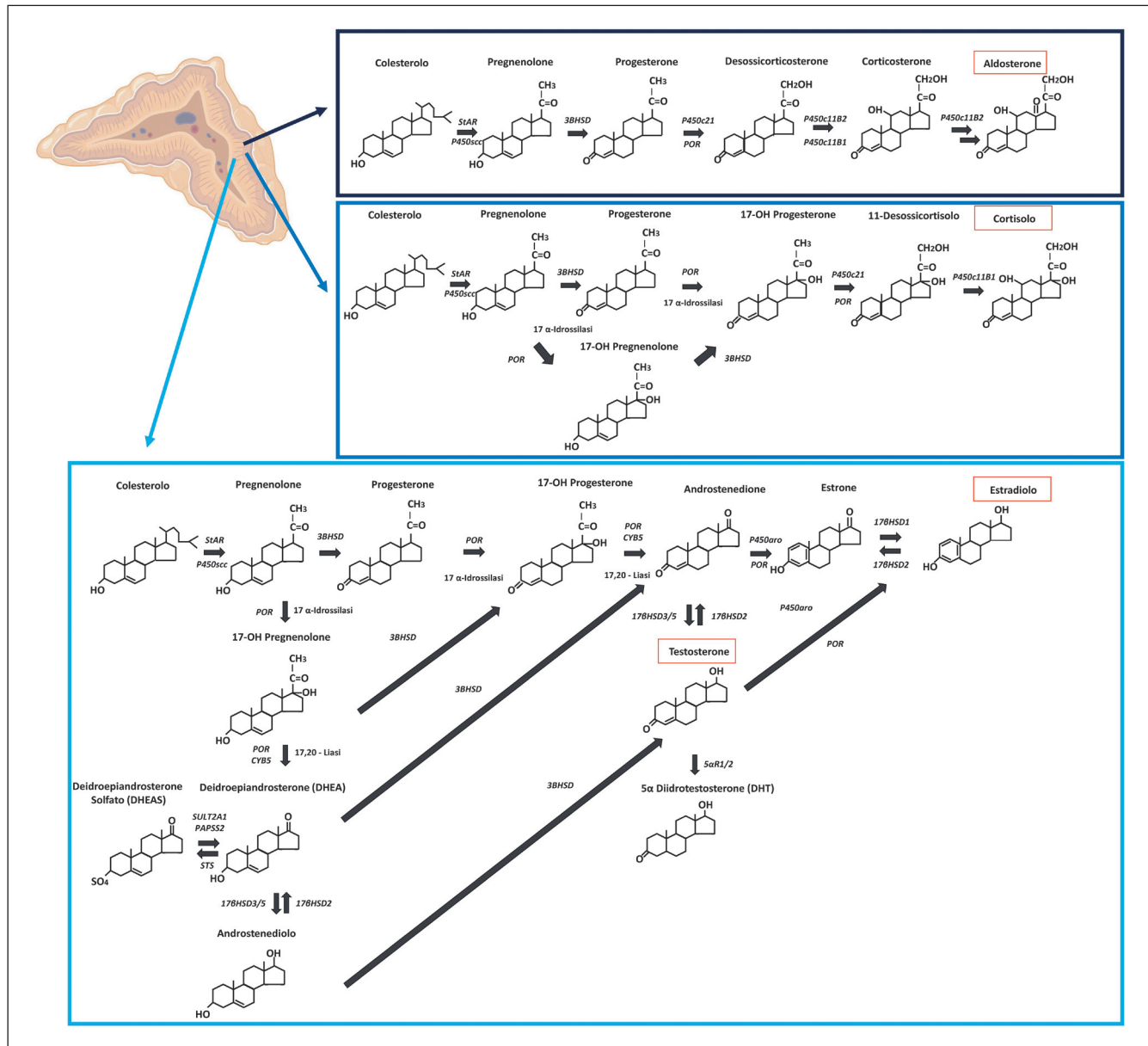


Figura 1.—Steroidogenesi surrenalica. La biosintesi steroidogenica surrenalica prende origine dalla molecola del colesterolo. Tramite l'StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) il colesterolo viene veicolato nei mitocondri dove è convertito in pregnenolone dalla P450scc (C 20-22 *side chain cleavage*). Dopo questo passaggio, la biosintesi può proseguire verso la produzione dei mineralcorticoidi, glucocorticoidi, androgeni ed estrogeni (figura parzialmente creata con Biorender.com).

StAR: *steroidogenic acute regulatory protein*; P450scc: C 20-22 *side chain cleavage*; 3βHSD: Δ5-3β-hydroxisteroide deidrogenasi; P450c21: 21-idrossilasi; P450c11β1: 11-beta-idrossilasi tipo 1; P450c11β2: 11-beta-idrossilasi tipo 2; 17α-idrossilasi: P450c17; 17-20 Liase: P450c17; POR: P450 ossidoreduttasi; CYB5: citocromo b 5; SULT2A1: sulfotransferasi 2A1; PAPSS: PAPS sintasi 2; STS: *steroid sulfatase*; 17βHSD: 17β-idrossisteroide deidrogenasi tipo 1-3-5; P450aro: aromatasi; 5αR1/2: 5 α reductasi 1 e 2; 11βHSD: 11β-idrossisteroide deidrogenasi tipo 1-2.

This document is protected by international copyright laws. No additional reproduction is authorized. It is permitted for personal use to download and save only one file and print only one copy of this Article. It is not permitted to make additional copies (either sporadically or systematically, either printed or electronic) of the Article for any purpose. It is not permitted to distribute the electronic copy of the article through online internet and/or intranet file sharing systems, electronic mailing or any other means which may allow access to the Article. The use of all or any part of the Article for any Commercial Use is not permitted. The creation of derivative works from the Article is not permitted. It is not permitted to remove, cover, overlay, obscure, block, or change any copyright notices or terms of use which the Publisher may post on the Article. It is not permitted to frame or use framing techniques to enclose any trademark, logo, or other proprietary information of the Publisher.

L'androstenedione può essere sintetizzato in vari modi:

- dal 17-idrossiprogesterone (17-OHP) ad opera dell'attività 17-20 Liasi dell'enzima 17βHSD;<sup>3</sup>
- dal DHEA tramite l'enzima 3βHSD2.

L'androstenedione è successivamente convertito in testosterone nei testicoli tramite l'azione dell'enzima 17βHSD tipo 3, e nei tessuti periferici e nelle ovaie dall'azione dell'enzima 17βHSD tipo 5;<sup>2</sup> in alternativa, può essere convertito in estrone tramite il complesso enzimatico dell'aromatasi<sup>1, 2</sup> (Figura 1).

### Funzione e significato biologico

L'androstenedione è prodotto in entrambe i sessi dalle gonadi e dalle ghiandole surrenali. Insieme al deidroepiandrosterone (DHEA) e deidroepiandrosterone solfato (DHEAS), è secreto dalla *zona reticularis* della corticale surrenale in seguito alla stimolazione dell'ACTH ipofisario e rientra nella categoria degli androgeni surrenali in quanto è successivamente convertito in testosterone. Si deve considerare che gli androgeni surrenali, avendo una limitata o assente capacità di legare e attivare i recettori per gli androgeni, sono considerati esclusivamente dei precursori.<sup>3</sup>

### Utilizzo clinico

Il dosaggio ematico dell'androstenedione trova impiego in alcune condizioni cliniche in cui si riscontra un eccesso di androgeni tra cui:

- difetti enzimatici della steroidogenesi surrenalica;
- deficit di aromatasi;
- sindrome dell'ovaio policistico (PCOS);
- neoplasie virilizzanti (tumori ovarici o surrenali);
- neoplasie ipofisarie o ectopiche secernenti ACTH.

I segni clinici dell'eccesso di steroidi androgenici sono rappresentati da irsutismo, alopecia, acne, disfunzioni ovariche e, in alcuni casi particolarmente severi, mascolinizzazione; meno frequentemente si riscontrano obesità e *acanthosis nigricans*.<sup>4</sup>

### Difetti enzimatici della steroidogenesi surrenalica e gonadica

Il dosaggio dell'androstenedione si richiede in caso di sospetta iperplasia surrenale congenita (CAH). Con questa definizione si intende un gruppo di disordini a carattere autosomico recessivo che riguardano uno dei cinque enzimi che catalizzano la conversione del colesterolo a cortisolo.<sup>5</sup> Oltre il 95% dei casi sono attribuibili al deficit della 21-idrossilasi.<sup>6, 7</sup>

In tali pazienti si riscontra un incremento del 17-OHP, il principale substrato utilizzato nel *pathway* biosintetico dei glucocorticoidi.<sup>8</sup> Il dosaggio del 17-OHP è utilizzato nell'iter diagnostico e, in associazione a esso, è comunque consigliato richiedere la determinazione contestuale dell'androstenedione, del testosterone e della renina; dovrebbero essere tutti dosati prima dell'inizio di qualsiasi trattamento terapeutico.<sup>6</sup> Infatti, la ridotta biosintesi di cortisolo causa un aumento dei livelli di ACTH e, quindi, una conseguente stimolazione sulla ghiandola surrenale (iperplasia) con aumento della biosintesi degli androgeni. Il 17OHP che si accumula è in parte convertito in androstenedione; parallelamente si accumula anche il 17-idrossipregnenolone che è convertito in DHEA e quindi in androstenedione e testosterone con evidenti effetti virilizzanti nei feti femmine.<sup>9</sup> Il monitoraggio laboratoristico dell'androstenedione è consigliato nel *follow up* terapeutico, in modo particolare nelle donne in età puberale dove, insieme all'LH, permette il monitoraggio dell'eventuale comparsa della PCOS.<sup>6</sup>

Il dosaggio dell'androstenedione trova impiego anche nel deficit della 17βHSD3, riscontrato in una condizione autosomica recessiva di ipomascolinizzazione causata dalla mancata conversione dell'androstenedione in testosterone nel testicolo;<sup>10, 11</sup> infatti, il malfunzionamento di tale enzima è responsabile dell'accumulo dell'androstenedione con conseguente comparsa di pseudoermafroditismo nei maschi.<sup>2, 11</sup> Questi pazienti, nella fase pre-puberale, risultano clinicamente non distinguibili da quelli affetti da sindrome da insensibilità agli androgeni (AIS). Nei neonati e nei bambini affetti dal deficit si dovrebbe evidenziare un rapporto testosterone/androstenedione (T/A) alterato, che però può manifestarsi solo in seguito alla stimolazione con gonadotropina corionica umana (hCG).<sup>10-12</sup> Un rapporto T/A ridotto può risultare altamente predittivo di un deficit di 17βHSD3, in quanto non si riscontrano sovrapposizioni diagnostiche con i pazienti AIS; tuttavia è stato osservato che sebbene rapporti T/A post stimolazione con hCG inferiori a 0,8 siano indicativi di questo difetto enzimatico, valori ridotti possono essere osservati anche in altre condizioni cliniche come in caso di anomalie testicolari.<sup>11</sup>

Livelli elevati di androstenedione sono rilevati anche nel deficit della 11β-idrossilasi (11βOHD). In tale condizione, il blocco enzimatico sulla via biosintetica degli androgeni determina anche un aumento del testosterone, comportando la comparsa dei segni clinici di iperandrogenismo.<sup>13</sup>

## Deficit di aromatasi

L'aromatasi è responsabile della conversione degli androgeni in estrogeni. Il deficit di tale enzima si evidenzia con differenti fenotipi clinici, dovuti all'eccesso di androgeni e alla carenza degli estrogeni. Il dosaggio dell'androstenedione, insieme a quello del testosterone, trova largo impiego nell'iter diagnostico, per confermare l'eccessivo livello di androgeni circolanti.

I segni clinici di questo difetto enzimatico sono differenti a seconda dell'età e del sesso. Nel neonato di sesso femminile si osserva tipicamente virilizzazione dei genitali esterni, senza una corrispettiva alterazione dei genitali interni; questi pazienti rientrano nel sospetto clinico di una disgenesia gonadica 46XX in cui deve essere parallelamente esclusa la CAH.<sup>14</sup>

Alla nascita si riscontrano elevati livelli di androgeni circolanti, sia testosterone che androstenedione, che poi tendono a diminuire. Non è raro lo sviluppo di cisti ovariche. Il sospetto clinico deve nascere in caso di segni di iperandrogenismo nelle gestanti.

Nelle ragazze in età puberale, non si riscontra l'inizio della pubertà e lo sviluppo del seno, si osserva amenorrea e eccessivi segni di virilizzazione. I livelli sierici di testosterone e androstenedione risultano elevati rispetto agli intervalli di riferimento per età e sesso, al contrario dei livelli di estradiolo che, invece, risultano molto ridotti. Anche in pazienti di questa età si riscontrano cisti ovariche multiple. Nel neonato di sesso maschile, nelle due settimane dopo la nascita, si evidenzia un incremento dei livelli di androgeni i quali tendono poi a normalizzarsi entro la fine del primo mese di vita.<sup>14</sup>

## Sindrome dell'ovaio policistico

Il dosaggio dell'androstenedione trova largo impiego nella diagnosi e *follow-up* della PCOS. Si tratta di una condizione che colpisce il sesso femminile caratterizzata da anovulazione, irsutismo e insulino-resistenza.<sup>15</sup> Nell'iter diagnostico della PCOS sono previsti sia esami di *imaging* quali l'ecografia ovarica, sia valutazioni biochimico-laboratoristiche. Nella pratica clinica, il dosaggio del testosterone totale costituisce il parametro più utilizzato nella valutazione dell'iperandrogenismo, presentando tuttavia alcune limitazioni dovute alla presenza in circolo del testosterone legato alla *sex hormone binding protein* (SHBG) e ad altre proteine come l'albumina;<sup>16, 17</sup> pertanto, il livello di testosterone valutato non rappresenta un indice affidabile della sua reale biodisponibilità in quanto solo la frazione libera risulta biologicamente attiva.<sup>17</sup> Inoltre, si deve considera-

re che il dosaggio del testosterone libero risulta altamente inaccurato,<sup>17</sup> e che gli immunodosaggi per il testosterone totale presentano un'estrema variabilità analitica.<sup>18</sup>

L'androstenedione non è uniformemente utilizzato nell'iter diagnostico della PCOS in quanto vi è molta incertezza sul suo potere diagnostico. Tuttavia alcuni lavori dimostrano che il 10% delle pazienti con PCOS sarebbero erroneamente classificate come normoandrogeniche se l'androstenedione non fosse misurato.<sup>19, 20</sup> L'aumento isolato di androstenedione è molto comune nelle donne con PCOS in età post-menopausale.<sup>21</sup>

L'androstenedione risulta essere più sensibile nel rilevare l'iperandrogenismo rispetto al dosaggio del testosterone in quanto non è influenzato dai livelli dell'SHBG. Infatti, nella PCOS, la condizione frequentemente osservata di iperinsulinismo comporta una riduzione dei livelli dell'SHBG e, quindi, del testosterone totale circolante.<sup>22</sup>

In uno studio condotto su 86 donne affette da PCOS, l'androstenedione è risultato elevato nella maggior parte dei soggetti (88%) rispetto al testosterone riscontrato alterato nel 65% dei casi. Nella popolazione sana di controllo, è stato osservato solo in un soggetto su 43 un aumento dei valori di androstenedione, mentre il testosterone risultava aumentato in cinque soggetti. I livelli di androstenedione sono risultati negli intervalli di riferimento (1,4-7,4 nmol/l) solo in 10 degli 86 soggetti con diagnosi di PCOS, il testosterone invece è risultato nella norma nel triplo dei casi (30 soggetti). È da sottolineare come in nessun paziente siano stati riscontrati elevati valori di testosterone senza un parallelo aumento di androstenedione, rendendo, in tal modo l'androstenedione un *marker* decisamente più sensibile rispetto al testosterone nell'identificazione dell'iperandrogenismo nella PCOS;<sup>19</sup> inoltre la simultanea determinazione di androstenedione, testosterone e DHEAS aumenta la possibilità di diagnosticare un eccesso di androgeni legato alla PCOS, in quanto solo il 49% di donne in età premenopausale e il 27% di quelle in post-menopausa hanno evidenziato un incremento isolato di testosterone.<sup>21</sup>

Infine si è osservato che i pazienti con un aumento dei livelli circolanti sia di androstenedione che di testosterone presentano indici di sensibilità insulinica (ISI) alterati rispetto a quelli con livelli normali o intermedi di androgeni a cui si accompagna anche un aumentato rischio di patologie cardiovascolari. Utilizzando la regressione lineare, si è osservata una forte relazione negativa tra androstenedione e sensibilità insulinica misurata dall'ISI; tale correlazione non si riscontrava con i livelli di testosterone;<sup>19</sup> infatti, l'insulina stimola la produzione di androstenedione nelle cellule della teca ovarica causando un pool circolante di



tipici dell'età puberale. I livelli diminuiscono poi rapidamente durante il primo anno di vita fino a raggiungere valori bassi in età prepuberale. Con l'inizio dell'adrenarca, i livelli di androstenedione aumentano gradualmente e il processo accelera con l'inizio della pubertà, raggiungendo i livelli dell'età adulta attorno ai 18 anni di età per poi declinare rapidamente dopo i trenta anni.<sup>31, 32</sup>

## Caratteristiche preanalitiche

### Matrice biologica

Il dosaggio dell'androstenedione è determinato generalmente su campioni di siero e/o plasma ma anche su urina, saliva e DBS (*dried blood spot*), ovvero gocce di sangue essiccato.

### Modalità di prelievo e di lavorazione del campione

Il prelievo è effettuato mediante procedura asettica di venipuntura. Pur non essendo necessarie particolari preparazioni del paziente, sono preferibili campioni di pazienti a digiuno. Prima di centrifugare, è opportuno consentire la completa coagulazione dei campioni prelevati in provette di siero onde evitare di ottenere risultati errati a causa della presenza di fibrina; inoltre, prima dell'esecuzione del test, è consigliabile chiarificare per centrifugazione i campioni che presentano tracce di materiale in sospensione (particolato), opalescenza, lipemia o residui eritrocitari. I campioni fortemente emolizzati o lipemici, così come i campioni che presentano evidente materiale in sospensione o evidente contaminazione microbica, devono essere scartati.

### Variabilità biologica preanalitica

L'androstenedione presenta una variazione diurna, con una massima concentrazione serica nelle prime ore del mattino, e una riduzione dei livelli nel pomeriggio-sera;<sup>33, 34</sup> pertanto bisogna tenerne conto quando si effettuano gli esami, preferendo l'esecuzione del prelievo nelle prime ore del mattino e, per lo stesso paziente, sempre allo stesso orario nel tempo.

Inoltre, variazioni dei livelli circolanti sono state osservate tra i sessi e nelle varie fasi della vita<sup>31</sup> così come durante il ciclo mestruale, con un picco intorno a metà ciclo,<sup>35-37</sup> e durante la gravidanza. Anche l'esercizio fisico può avere un impatto sui livelli circolanti di androstenedione<sup>38</sup> così come l'obesità. I livelli di androstenedione risultano più bassi nei maschi obesi<sup>39</sup> mentre nelle donne, soprattutto in quelle affette da obesità addominale, i livelli circolanti risultano incrementati.<sup>40, 41</sup>

TABELLA I.—Stabilità e conservazione del campione.

Ditta	Stabilità del campione
Diasorin (Saluggia, Italia)	48 ore a temperatura ambiente 14 giorni a 2-8 °C Tempi maggiori a -20 °C
Siemens Healthineers (Erlangen, Germania)	24 ore a 2-8 °C 2 mesi a -20 °C
Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germania)	5 giorni a temperatura ambiente 14 giorni a 2-8 °C 6 mesi a -20 °C

### Trasporto e conservazione del campione

Uno dei limiti dei dosaggi degli ormoni steroidei è la mancanza di standardizzazione delle metodiche, soprattutto per quanto riguarda i dosaggi immunometrici. Pertanto, anche le raccomandazioni relative alla conservazione del campione risentono del tipo di dosaggio utilizzato. A titolo esemplificativo, si riportano nella Tabella I le raccomandazioni di tre principali aziende produttrici di saggi in chemiluminescenza per la determinazione dell'androstenedione nel plasma e siero.

## Caratteristiche analitiche

### Evoluzione dei metodi di misura e metodiche in uso

I primi immunodosaggi (IA) prevedevano una purificazione del campione biologico e utilizzavano radio-isotopi (radio-IA, RIA) della molecola di interesse per determinazioni anticorpo-mediate.

Successivamente, gli immunodosaggi si sono evoluti verso determinazioni automatizzate a rivelazione non radioattiva e senza preparazione del campione, consentendo la produzione di un'enorme mole di dati di laboratorio a fini diagnostici e terapeutici che hanno favorito numerosi studi scientifici.

Ad oggi, la maggior parte dei laboratori si avvale di saggi immunometrici o di spettrometria di massa accoppiata alla cromatografia liquida (LC-MS/MS) per il dosaggio degli ormoni steroidei.

Grandi limiti dei saggi in chemiluminescenza, soprattutto per gli ormoni steroidei, sono la ridotta specificità e sensibilità analitiche dei test, soprattutto alle basse concentrazioni, principalmente a causa di:

- fenomeni di reattività crociata (l'anticorpo diretto verso la molecola di interesse, riconosce e lega anche molecole a struttura simile con conseguente sovrastima della concentrazione dell'analita in esame). Questo si osserva soprattutto alle basse concentrazioni di steroidi, condizione tipica di donne e bambini;<sup>42</sup>
- presenza di anticorpi eterofili (anticorpi circolanti nel

siero del paziente, senza valenza clinica ma in grado di interferire con i saggi immunometrici);

- incompleto rilascio dell'analita da parte delle proteine di legame.<sup>43</sup>

Spesso, gli IA, a causa della ridotta sensibilità analitica, non sono in grado di discriminare ed essere utili nella diagnosi di patologie dove i livelli degli ormoni steroidei risultano solo lievemente incrementati. Le conseguenze

TABELLA II.—Caratteristiche analitiche dei principali metodi commerciali in uso per la misura dell'androstenedione nel siero dei pazienti.

Ditta	Diasorin	Roche	Siemens Healthineers	Eureka	Chromsystems
Metodo	Competitivo diretto CLIA	Competitivo ECLIA	Competitivo CLIA	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Anticorpo primario	Monoclonale di pecora	Monoclonale di pecora	Policonale di coniglio		
Limite del bianco (LoB)	<0,17 ng/ml	0,075 ng/ml	0,3 ng/ml	0,005 ng/ml	-
Limite di rilevabilità (LoD)	0,24 ng/ml	0,15 ng/ml	0,3 ng/ml	-	
Limite di quantificazione (LoQ)	0,30 ng/ml	0,30 ng/ml	-	0,02	0,022
Precisione intra-saggio (CV)	1-2,3%	1,8-3%	5,1-9,1%	1,3-4,5%	1,5-1,8%
Precisione inter-saggio (CV)	2,4-9,7%	3,7-4,7%	-	4,1-6,9%	4,3-10,1%
Intervallo analitico di misura	0,24-10 ng/ml	0,15-10,0 ng/ml	0,3-10 ng/ml	0,02-8,00 ng/ml	0,022-27,0 ng/ml
%Cross-reattività alla concentrazione addizionata:					
100 ng/ml	Adrenosterone 0,003% DHEA 0,433% Testosterone 0,433% 4-Androsten-11β-ol-3,17-dione 0,063%		Testosterone 1,5%		
500 ng/ml	Androsterone 0,079%		Androsterone 0,42%		
1000 ng/ml	Desametasone 0,003% Colesterolo 0,005% Corticosterone 0,006% Estradiolo 0,005% Estrone 0,029% Noretindrone 0,005% Progesterone 0,014% Spironolattone 0,012% 5α-Diidrotosterone 0,003%	Testosterone 0,383%	Cortisone 0,06% Noretindrone 0,05% Progesterone 0,19% Spironolattone 0,05% Prednisone 0,05% DHEA 0,23%		
1600 ng/ml		DHEA 0,394%			
2000 ng/ml			Deossicorticosterone 0,08%		
2500 ng/ml		Diidrotosterone 0,275% Adrenosterone 0,221%			
6000 ng/ml	Cortisone 0,002%				
10.000 ng/ml	Deossicorticosterone 0,001% Estradiolo-17β 0,000% Aldosterone 0,001% 17α Idrossiprogesterone 0,006% Prednisone 0,001% Cortisolo 0,001% DHEA-S 0,002% Isoandrosterone 0,120%	16-Epiestriolo 0,001% Estrone 0,030% 17-OH-Progesterone 0,021% Progesterone 0,011% Spironolattone 0,013% Finasteride 0,001% Noretindrone 0,002% 11-Chetotestosterone 0,001% Cortisone 0,001% Progesterone 0,001% Canrenone 0,046%	Cortisolo 0,02% Estradiolo-17β 0,006%		
15.000 ng/ml	DHEA-S 0,002%				

di tali difetti analitici si sono spesso tradotte in diagnosi e approcci terapeutici impropri, in risultati scientifici inconclusivi o spesso in contraddizione, e nella mancanza di armonizzazione inter-laboratoristica.<sup>44</sup>

La metodica LC-MS/MS consente di superare questo limite. A differenza degli IA, in cui l'anticorpo riveste un ruolo essenziale, in MS hanno valenza, per l'identificazione e il dosaggio dell'analita in esame, esclusivamente il peso molecolare e le caratteristiche strutturali della molecola in studio.

Alcuni studi scientifici hanno dimostrato che la metodica LC-MS/MS è risultata più sensibile, rispetto alle metodiche immunometriche, nella rilevazione di livelli incrementati di androstenedione rispetto a soggetti di controllo, consentendo di effettuare diagnosi più accurate di PCOS.<sup>42, 45</sup> Inoltre, la metodica LC-MS/MS consente di analizzare simultaneamente un pannello di steroidi e diversi studi hanno evidenziato come l'analisi di profili multisteroidi possono risultare maggiormente efficaci nella diagnosi di iperandrogenismo nei pazienti con PCOS<sup>23, 46</sup> e di neoplasie surrenaliche.<sup>47</sup>

È importante sottolineare che i valori di concentrazione di androstenedione ottenuti mediante LC-MS/MS tendono ad essere più bassi rispetto a quelli ottenuti mediante dosaggio IA.<sup>42, 45, 48</sup>

Se da un lato risulta evidente il netto vantaggio nell'utilizzo della spettrometria di massa rispetto ai saggi immunometrici per il dosaggio degli ormoni steroidei, è d'obbligo porre alcune considerazioni. Innanzitutto si deve sottolineare la mancanza di una totale standardizzazione del dosaggio degli ormoni steroidei anche mediante LC-MS/MS,<sup>49</sup> sebbene una maggiore armonizzazione dei dati inter-laboratori si ottenga quando si utilizzano calibratori e standard della stessa azienda;<sup>31</sup> inoltre, le informazioni e le pubblicazioni scientifiche riguardanti i possibili vantaggi del dosaggio di androstenedione con metodica LC-MS/MS rispetto a dosaggio IA sono ancora esigue, e, pertanto, sono necessari ulteriori dati per confermare la netta superiorità di una metodica rispetto ad un'altra. In Tabella II sono evidenziate le caratteristiche analitiche dei principali metodi commerciali in uso per la misura dell'androstenedione.

### Caratteristiche postanalitiche

#### Refertazione

Unità di misura: ng/ml, nmol/l.

Fattore di conversione: 1 ng/ml = 3,49 nmol/l.

#### Intervalli di riferimento

I valori di riferimento andrebbero differenziati per sesso e per età e, nella donna, specificati in funzione dei

TABELLA III.—Intervalli di riferimento delle principali aziende produttrici.

Ditta	Popolazione	Mediana	Intervallo di riferimento (ng/ml)	
			5°-95° percentile	2,5°-97,5° percentile
Diasorin (CLIA)	Uomini	1,80		0,5-3,5
	Donne in premenopausa	1,60		0,4-3,4
	Donne in postmenopausa	0,70		0,1-2,1
	Donne 2-6 anni	0,10		0,00-0,34
	Donne 7-11 anni	0,35		0,12-2,41
	Donne 12-16 anni	1,62		0,42-3,41
	Donne 17-21 anni	2,01		0,70-4,31
	Uomini 2-6 anni	0,11		0,02-0,29
	Uomini 7-11 anni	0,23		0,07-0,74
	Uomini 12-16 anni	0,84		0,25-2,21
Uomini 17-21 anni	1,28		0,44-2,65	
Roche (ECLIA)	Uomini	2,24	1,71-4,58	0,979-5,32
	Donne in età fertile	2,89		
	Donne in postmenopausa	1,58		0,654-3,74
	Donne PCOS	2,26		
	Bambini	<0,525	<0,525-1,81	5,39-12,1
Siemens Healthineers (CLIA)	Uomini	1,8	0,7-3,6	
	Donne	1,9	0,3-3,5	
Eureka (LC-MS/MS)	Adulto		<2,0	
Chromsystems (LC-MS/MS)	Donne 1-<4 anni		0,06-0,45	
	Donne in età puberale		0,18-2,6	
	Donne adulte		0,5-2,5	
	Uomini 1-<4 anni		0,06-0,35	
	Uomini in età puberale		0,4-2,6	
Uomini adulti		0,5-2,5		



periodi (periodo fertile, premenopausa, postmenopausa), di alcune patologie (PCOS) e, nell'età fertile, anche in funzione del ciclo ovarico (fase follicolare, ovulatoria, luteale).

Si riportano in Tabella III, a titolo esemplificativo, gli intervalli di riferimento relativi al dosaggio di androstenedione di differenti case produttrici.

## Raccomandazioni del GdS-EMM

### Raccomandazione 1

Utilizzare il dosaggio dell'androstenedione nel *follow-up* terapeutico della CAH, in associazione al 17-OHP.

### Raccomandazione 2

Utilizzare il dosaggio dell'androstenedione nella diagnosi della PCOS essendosi dimostrato un marcatore più sensibile rispetto agli altri androgeni per la rilevazione dell'iperandrogenismo in questi pazienti.

### Raccomandazione 3

Nella fase di interpretazione clinica del dato, considerare i fattori preanalitici, in particolare l'orario in cui è stato eseguito il prelievo.

### Raccomandazione 4

Per una corretta diagnosi, considerare la metodica con cui è stato eseguito il dosaggio dell'androstenedione utilizzando, laddove possibile, una metodica più sensibile per i casi di dubbia interpretazione.

### Raccomandazione 5

Il referto di androstenedione deve riportare l'intervallo di riferimento specifico per genere, età, metodo e/o analizzatore usato per la determinazione.

### Raccomandazione 6

I laboratori che misurano e refertano l'androstenedione devono disporre di una competenza adeguata e devono essere in contatto con clinici di riferimento.

## Bibliografia

1. Badawy MT, Sobeh M, Xiao J, Farag MA. Androstenedione (a Natural Steroid and a Drug Supplement): A comprehensive review of its consumption, metabolism, health effects, and toxicity with sex differences. *Molecules* 2021;26:6210.
2. Luu-The V. Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;76:143-51.

3. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 2011;32:81-151.

4. Redmond GP, Bergfeld WF. Diagnostic approach to androgen disorders in women: acne, hirsutism, and alopecia. *Cleve Clin J Med* 1990;57:423-7.

5. Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod Update* 2004;10:469-85.

6. Heijboer AC, Hannema SE. Androgen excess and deficiency: analytical and diagnostic approaches. *Clin Chem* 2023;69:1361-73.

7. Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005;365:2125-36. [d]

8. Kamrath C, Hartmann MF, Wudy SA. Androgen synthesis in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Metab Res* 2013;45:86-91.

9. Naamneh Elzenaty R, du Toit T, Flück CE. Basics of androgen synthesis and action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2022;36:101665.

10. Arnhold IJ, Mendonça BB, Diaz JA, Nogueira C, Batista MC, Madureira G, et al. Prepubertal male pseudohermaphroditism due to 17-ketosteroid reductase deficiency: diagnostic value of a hCG test and lack of HLA association. *J Endocrinol Invest* 1988;11:319-22.

11. Iqbal A, Hughes IA, Faisal Ahmed S. The testosterone:androstenedione ratio in male undermasculinization. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;53:697-702.

12. Boehmer AL, Brinkmann AO, Sandkuijl LA, Halley DJ, Niermeijer MF, Andersson S, et al. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency: diagnosis, phenotypic variability, population genetics, and worldwide distribution of ancient and de novo mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4713-21.

13. Bulsari K, Falhammar H. 11β-Hydroxylase Deficiency. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Second Edition. Elsevier; 2019. p. 421-30.

14. Belgorosky A, Guercio G, Pepe C, Saraco N, Rivarola MA. Genetic and clinical spectrum of aromatase deficiency in infancy, childhood and adolescence. *Horm Res* 2009;72:321-30.

15. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995;333:853-61.

16. Partridge WM. Serum bioavailability of sex steroid hormones. *Clin Endocrinol Metab* 1986;15:259-78.

17. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3666-72.

18. Boots LR, Potter S, Potter D, Azziz R. Measurement of total serum testosterone levels using commercially available kits: high degree of between-kit variability. *Fertil Steril* 1998;69:286-92.

19. O'Reilly MW, Taylor AE, Crabtree NJ, Hughes BA, Capper F, Crowley RK, et al. Hyperandrogenemia predicts metabolic phenotype in polycystic ovary syndrome: the utility of serum androstenedione. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:1027-36.

20. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3078-82.

21. Elhassan YS, Idkowiak J, Smith K, Asia M, Gleeson H, Webster R, et al. Causes, patterns, and severity of androgen excess in 1205 consecutively recruited women. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:1214-23.

22. Cussen L, McDonnell T, Bennett G, Thompson CJ, Sherlock M, O'Reilly MW. Approach to androgen excess in women: clinical and biochemical insights. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2022;97:174-86.

23. Pasquali R, Zanotti L, Fanelli F, Mezzullo M, Fazzini A, Morselli Labate AM, et al. Defining hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome: a challenging perspective. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:2013-22.

24. Yance VR, Marcondes JA, Rocha MP, Barcellos CR, Dantas WS, Avila AF, et al. Discriminating between virilizing ovary tumors and ovary

hyperthecosis in postmenopausal women: clinical data, hormonal profiles and image studies. *Eur J Endocrinol* 2017;177:93–102.

25. Barbetta L, Dall'Asta C, Re T, Colombo P, Travaglini P, Ambrosi B. Androgen secretion in ectopic ACTH syndrome and in Cushing's disease: modifications before and after surgery. *Horm Metab Res* 2001;33:596–601.

26. Rosenfield RL. Normal and premature adrenarche. *Endocr Rev* 2021;42:783–814.

27. Rege J, Turcu AF, Kasa-Vubu JZ, Lerario AM, Auchus GC, Auchus RJ, *et al.* 11-ketotestosterone is the dominant circulating bioactive androgen during normal and premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:4589–98.

28. Lawson AJ, Walker EA, Lavery GG, Bujalska JJ, Hughes B, Arlt W, *et al.* Cortisone-reductase deficiency associated with heterozygous mutations in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:4111–6.

29. Bas S, Guran T, Atay Z, Haliloglu B, Abali S, Turan S, *et al.* Premature pubarche, hyperinsulinemia and hypothyroxinemia: novel manifestations of congenital portosystemic shunts (Abernethy malformation) in children. *Horm Res Paediatr* 2015;83:282–7.

30. Satoh M, Yokoya S, Hachiya Y, Hachiya M, Fujisawa T, Hoshino K, *et al.* Two hyperandrogenic adolescent girls with congenital portosystemic shunt. *Eur J Pediatr* 2001;160:307–11.

31. Bae YJ, Zeidler R, Baber R, Vogel M, Wirkner K, Loeffler M, *et al.* Reference intervals of nine steroid hormones over the life-span analyzed by LC-MS/MS: effect of age, gender, puberty, and oral contraceptives. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019;193:105409.

32. Obermayer-Pietsch B, de Ramon M, Reichmuth C, Bendig G, Hutzler S, Taibon J, *et al.* Multicenter evaluation of a new, fully automated androstenedione electrochemiluminescence immunoassay: precision analysis, method comparison, and determination of reference ranges. *J Appl Lab Med* 2022;7:503–14.

33. Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB. The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:907–13.

34. Parikh TP, Stolze B, Ozarda Y, Jonklaas J, Welsh K, Masika L, *et al.* Diurnal variation of steroid hormones and their reference intervals using mass spectrometric analysis. *Endocr Connect* 2018;7:1354–61.

35. Burger HG. Androgen production in women. *Fertil Steril* 2002;77(Suppl 4):S3–5.

36. Mezzullo M, Fazzini A, Gambineri A, Di Dalmazi G, Mazza R, Pelusi C, *et al.* Parallel diurnal fluctuation of testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone and 17OHprogesterone as assessed in serum and saliva: validation of a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for salivary steroid profiling. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1315–23.

37. Skiba MA, Bell RJ, Islam RM, Handelsman DJ, Desai R, Davis SR. Androgens During the Reproductive Years: What Is Normal for Women? *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104:5382–92.

38. Velardo A, Pantaleoni M, Valerio L, Barini A, Marrama P. Influence of exercise on dehydroepiandrosterone sulphate and delta 4-androstenedione plasma levels in man. *Exp Clin Endocrinol* 1991;97:99–101.

39. Tchernof A, Després JP, Bélanger A, Dupont A, Prud'homme D, Moorjani S, *et al.* Reduced testosterone and adrenal C19 steroid levels in obese men. *Metabolism* 1995;44:513–9.

40. Pasquali R. Obesity and androgens: facts and perspectives. *Fertil Steril* 2006;85:1319–40.

41. Oh H, Wild RA, Manson JE, Bea JW, Shadyab AH, Pfeiffer RM, *et al.* Obesity, height, and serum androgen metabolism among postmenopausal women in the Women's Health Initiative Observational Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2021;30:2018–29.

42. Yucel K, Abusoglu S, Unlu A. Comparison of immunoassay and liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods in the measurement of serum androstenedione levels. *Clin Lab* 2018;64:69–75.

43. Heijboer AC, Savelkoul E, Kruit A, Endert E, Blankenstein MA. Inaccurate First-Generation Testosterone Assays Are Influenced by Sex Hormone-Binding Globulin Concentrations. *J Appl Lab Med* 2016;1:194–201.

44. Fanelli F, Di Dalmazi G, Mezzullo M, Vicennati V, Pelusi C, Pasquali R, *et al.* Impatto clinico delle nuove tecnologie in spettrometria di massa per il dosaggio degli steroidi. *Endocrinology* 2019;20:84–8.

45. Grassi G, Polledri E, Fustinoni S, Chiodini I, Ceriotti F, D'Agostino S, *et al.* Hyperandrogenism by liquid chromatography tandem mass spectrometry in PCOS: focus on testosterone and androstenedione. *J Clin Med* 2020;10:119.

46. Kulle AE, Riepe FG, Melchior D, Hiort O, Holterhus PM. A novel ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone in pediatric blood samples: age- and sex-specific reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2399–409.

47. Rossi C, Cicalini I, Verrocchio S, Di Dalmazi G, Federici L, Bucci I. The potential of steroid profiling by mass spectrometry in the management of adrenocortical carcinoma. *Biomedicine* 2020;8:314.

48. Fanelli F, Belluomo I, Di Lallo VD, Cuomo G, De Iasio R, Baccini M, *et al.* Serum steroid profiling by isotopic dilution-liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with current immunoassays and reference intervals in healthy adults. *Steroids* 2011;76:244–53.

49. Büttler RM, Martens F, Ackermans MT, Davison AS, van Herwaarden AE, Kortz L, *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;454:112–8.

#### Conflitti di interesse

Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse con alcuna ditta legata al contenuto del manoscritto.

#### Studi condotti su esseri umani e animali

L'articolo non contiene alcuno studio eseguito su esseri umani e su animali da parte degli autori.

#### Consenso informato

Per questo tipo di studio non è richiesto il consenso informato.

#### Cronologia

Pubblicato online: 3 ottobre 2024. - Accettato: 2 settembre 2024. - Ricevuto: 15 giugno 2024.