



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**“DETERMINACIÓN DE CATECOLAMINAS
EN PLASMA Y ORINA”**

Autor: Esther Gómez de Lara

Fecha: Febrero 2020

Tutor: Cristina Coronel Gonzalo

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	- 2 -
RESUMEN	- 2 -
ABSTRACT.....	- 3 -
1. INTRODUCCIÓN	- 3 -
1.1 BIOSÍNTESIS	- 4 -
1.2 METABOLISMO	- 5 -
1.3 FUNCIÓN	- 6 -
1.4 ENFERMEDADES RELACIONADAS	- 7 -
1.5 DETERMINACIÓN EN EL LABORATORIO CLÍNICO	- 8 -
2. OBJETIVOS.....	- 9 -
3. MATERIALES Y MÉTODOS	- 9 -
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 9 -
4.1 TÉCNICA DE ELECCIÓN.....	- 9 -
4.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MUESTRA	- 11 -
4.3 DETERMINACIÓN EN EL LABORATORIO	- 13 -
a) DETERMINACIÓN DE CATECOLAMINAS EN PLASMA	- 13 -
b) DETERMINACIÓN DE CATECOLAMINAS EN ORINA	- 14 -
c) DETERMINACIÓN DE LOS METABOLITOS DE LAS CATECOLAMINAS	- 16 -
d) DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO-5-HIDROXI-INDOLACÉTICO	- 18 -
5. CONCLUSIONES	- 18 -
6. BIBLIOGRAFÍA.....	- 19 -

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
D	Dopamina
NA	Noradrenalina
A	Adrenalina
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
MAO	Monoamino-oxidasa
COMT	Catecol-ortometiltransferasa
NMN	Normetanefrinas
MN	Metanefrinas
VMA	Ácido vanilmandélico
HVA	Ácido homovanílico
5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
3-MT	3-metoxi-tiramina
ATC	Antidepresivos tricíclicos
IMAO	Inhibidores de la MAO
HCl	Ácido clorhídrico
PSE	Extracción en fase sólida

RESUMEN

Las catecolaminas son sintetizadas en la médula suprarrenal mediante una cascada enzimática que da lugar a la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina. Una vez que han llevado a cabo sus funciones, estas catecolaminas son metabolizadas mediante dos enzimas, la *COMT* y la *MAO*, dando lugar a sus metabolitos que son las metanefrinas, normetanefrinas y el ácido vanilmandélico, obtenidos a partir de la adrenalina y la noradrenalina, y a partir de la dopamina se va a obtener el ácido homovanílico. Se pueden encontrar libres o conjugados con sulfato, siendo estos últimos más solubles y por ello se eliminan por la orina. Esto permite que en el laboratorio clínico se puedan medir libres, es decir, únicamente la fracción no conjugada o como catecolaminas o sus metabolitos totales, que incluye las formas conjugadas y las formas no conjugadas.

La secreción de catecolaminas y sus metabolitos están relacionados con tumores endocrinos como el feocromocitoma o neuroblastoma y con el síndrome carcinoide, por ello su determinación va a ser importante para el diagnóstico y seguimiento de estas enfermedades.

Para la determinación de las catecolaminas y sus metabolitos es muy importante tener en cuenta los factores que influyen en su recogida y conservación hasta que llega al laboratorio, ya que cualquiera de ellos puede producir errores en la medición final de la muestra y dar lugar a falsos positivos o falsos negativos.

En el laboratorio clínico se va a utilizar como método de elección para estas determinaciones la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detectores electroquímicos, ya que es el método más específico, sensible, eficaz y asequible para los laboratorios.

Palabras clave: catecolaminas, feocromocitoma, neuroblastoma, síndrome carcinoide, orina, plasma, HPLC.

ABSTRACT

Catecholamines are synthesized in the adrenal marrow using an enzymatic cascade that results in dopamine, norepinephrine and epinephrine. Once they have performed their functions, these catecholamines are metabolized by two enzymes, *COMT* and *MAO*, giving rise to their metabolites which are metanephrines, normetanephrines and vanilmandelic acid, obtained from epinephrine and norepinephrine, and from dopamine is going to obtain homovanilic acid. They can be found free or conjugated with sulfate, being the latter more soluble and therefore are eliminated by urine. This allows free measures in the clinical laboratory, is to say, only the unconjugated fraction or as catecholamines or their total metabolites which includes conjugated shapes and unconjugated forms.

The secretion of catecholamines and their metabolites are related to endocrine tumors such as pheochromocytoma or neuroblastoma and carcinoid syndrome, that is why their determination is going to be important for the diagnosis and follow-up of these diseases.

For the determination of catecholamines and their metabolites it is very important to take into account the factors that influence their collection and conservation until it arrives at the laboratory, as any of them can cause errors in the final measurement of the sample and result in false-positives or false-negatives test results.

In the clinical laboratory, high-resolution liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detectors will be used as a method of choice for these determinations because it is the most specific, sensitive, effective and affordable method for laboratories.

Keywords: catecholamines, pheochromocytoma, neuroblastoma, carcinoid syndrome, urine, plasma, HPLC.

1. INTRODUCCIÓN

Las catecolaminas¹ son aminas orgánicas sintetizadas por el organismo en la médula suprarrenal donde hay un acúmulo de células secretoras de dichas hormonas.

La médula suprarrenal es una de las partes, junto con la cápsula y la corteza adrenal, que forma las glándulas suprarrenales, las cuales se encuentran situadas sobre los polos superiores de los riñones. Histológicamente, está formada por células cromafines procedentes de la cresta neural originada durante el desarrollo embrionario.

Este origen embriológico común de las células que componen la médula suprarrenal y de las células del sistema nervioso central, hace que se las considere un elemento altamente especializado en la secreción de catecolaminas.

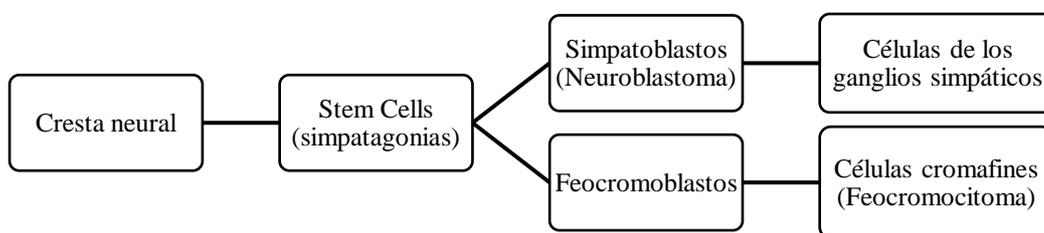


Figura 1. Proceso de diferenciación de las células de la cresta neural¹

Las principales catecolaminas son: la dopamina (D), la noradrenalina (NA) y la adrenalina (A)².



Figura 2. Estructura de las catecolaminas ¹

1.1 BIOSÍNTESIS

La biosíntesis de las catecolaminas comienza a partir del aminoácido tirosina, que puede proceder de la dieta o ser sintetizado a partir de la fenilalanina en el hígado, y continúa con una cascada enzimática en la que se diferencian varias etapas.

La primera etapa tiene lugar en las terminaciones de los nervios simpáticos postganglionares y en la médula suprarrenal. Está catalizada por la *tirosina hidroxilasa*. Es el paso limitante en la regulación de la síntesis de catecolaminas. El producto final de esta reacción es la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), que es convertida por la *DOPA descarboxilasa* en dopamina, la cual es transportada, con gasto energético, al interior de los gránulos secretores que contienen *dopamina-β-hidroxilasa*, enzima responsable de su transformación a noradrenalina.

En la médula suprarrenal, la noradrenalina liberada es transformada por la *feniletanolamina-N-metil transferasa* en adrenalina, que será recaptada y almacenada en los gránulos de secreción.

Este proceso está regulado por un proceso de retroalimentación negativo que producen la L-DOPA y la dopamina sobre la *tirosina hidroxilasa*, de modo que la síntesis de L-DOPA es proporcional a la liberación de noradrenalina.

La secreción está regulada directamente por el sistema nervioso simpático, por ello se producirá, sobre todo, en situaciones de estrés agudo tanto físico como psíquico.

Las catecolaminas sintetizadas son almacenadas en unas vesículas de almacenamiento que se encuentran en la médula suprarrenal y en las terminaciones nerviosas simpáticas postganglionares hasta que es requerida su liberación por exocitosis¹.

Son liberadas al torrente circulatorio y así, ayudan a transmitir impulsos nerviosos en el cerebro, aumentan la liberación de glucosa y ácidos grasos para proporcionar energía y dilatan las pupilas. Además, la Noradrenalina constriñe los vasos sanguíneos, aumentando la presión sanguínea y la Adrenalina, incrementa la frecuencia cardíaca y el metabolismo³.

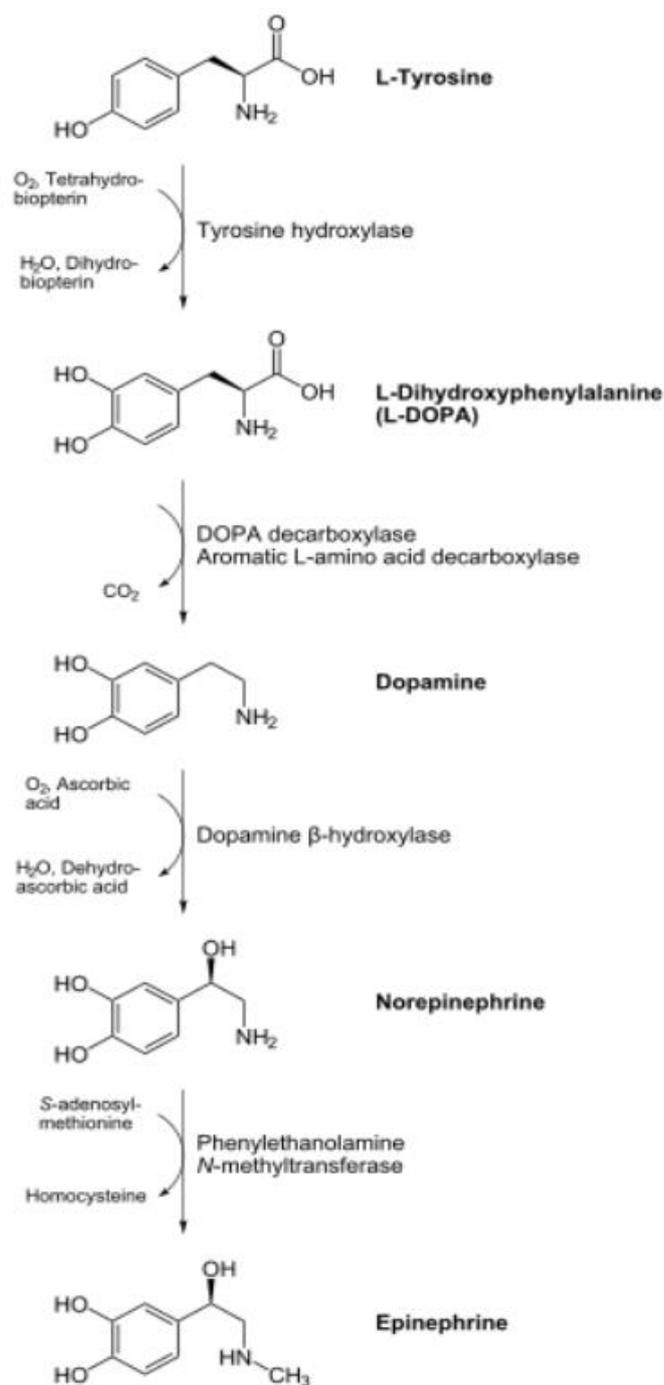


Figura 3. Ruta biosintética de las catecolaminas ¹

1.2 METABOLISMO

Se produce como consecuencia de la expresión diferencial de las enzimas encargadas de su metabolización, una vez que han llevado a cabo sus funciones fisiológicas. Estas enzimas son la *monoamino-oxidasa* (MAO) y la *catecol-ortometiltransferasa* (COMT).

Las catecolaminas son metoxiladas por la COMT en tejidos no neuronales, dando lugar a las metanefrinas. Así, la Noradrenalina da lugar a las Normetanefrinas (NMN) y la Adrenalina dará lugar a las Metanefrinas (MN) ².

- β -adrenérgicos: β_1 y β_2
 - Vasodilatación
 - Broncodilatación
 - Relajación músculo liso del aparato GI
 - Estimulación síntesis insulina, renina y de la lipólisis
 - Mediano aumento de la frecuencia y contractilidad

- b) Receptores dopaminérgicos: se encuentran en SNC, SNP y en diferentes tejidos.
- D_1 : median la vasodilatación
 - D_2 : inhiben la transmisión de los impulsos en los ganglios simpáticos y la liberación de Noradrenalina en las terminaciones nerviosas simpáticas, así como la liberación de prolactina.

1.4 ENFERMEDADES RELACIONADAS

La determinación de las catecolaminas y sus metabolitos tiene utilidad en el diagnóstico de tumores de la médula suprarrenal:

- a) FEOCROMOCITOMA: es un tumor, benigno o maligno que produce, almacena y secreta catecolaminas y sus metabolitos⁴. Su prevalencia es baja. En ciertos casos, puede ser asintomática¹.
- Manifestaciones clínicas: hipertensión arterial y en más del 50% de los casos, paroxismo o crisis epilépticas. Estas pueden ir acompañadas de ansiedad, temblor, palidez, dolor torácico y abdominal, visión borrosa, náuseas, vómitos, hiperglucemias, pérdidas de peso, poliuria, polidipsia...¹
 - Según su localización puede ser¹:
 - Intrasuprarrenal (médula adrenal): sintetiza y secreta adrenalina y noradrenalina
 - Extrasuprarrenal (ganglios simpáticos): secretan, exclusivamente, noradrenalina

La síntesis de dopamina y ácido homovanílico no suelen estar elevadas en los tumores benignos, a diferencia de los tumores malignos, que no van a presentar hipertensión debido al efecto vasodilatador de la dopamina⁵.

- Diagnóstico: Si no se diagnostica a tiempo, puede llegar a ser letal⁶. La determinación de metanefrinas libres en plasma y las metanefrinas fraccionadas urinarias, son las pruebas más sensibles y que ofrecen mayor rendimiento en el diagnóstico⁷. La determinación de AVM en orina de 24 horas, es la prueba con mayor especificidad¹. También es necesaria la localización del tumor mediante pruebas de imagen, en especial la resonancia magnética⁸.
- b) NEUROBLASTOMA: es un tumor derivado de las células de la cresta neural, que puede desarrollarse a lo largo de la cadena ganglionar simpática y en la médula adrenal. Es la tercera neoplasia más frecuente en niños. Tiene una prevalencia elevada. Va a presentar elevadas la secreción de dopamina y en el 90% de los casos, el ácido homovanílico y el ácido vanilmandélico^{1,9}.

- Manifestaciones clínicas: pueden presentar o no hipertensión. Son escasas y suelen estar relacionadas con el tumor primitivo o con la metástasis, que normalmente es a nivel osteomedular o hepático⁸.
 - Diagnóstico: La determinación urinaria del HVA junto con el AVM, presenta una sensibilidad diagnóstica cercana al 100%. Además, también es útil la determinación de dopamina¹.
- c) **SÍNDROME CARCINOIDE**: se produce por la producción excesiva de serotonina junto con otras aminas por parte del tumor carcinoide. No se conoce su causa con exactitud, pero sí que presenta ciertos factores de riesgo: edad >60 años, obesidad, tabaco, hipertensión, trabajadores expuestos a químicos, insuficiencia renal crónica en tratamiento renal sustitutivo, receptores de un trasplante de riñón...¹⁰
- Manifestaciones clínicas: se trata de síntomas consecutivos que pueden estar presentes durante varios años, coexistentes con el escaso crecimiento del tumor carcinoide primario. Pueden presentar trastornos vasomotores, gastrointestinales, cardiopulmonares y nutricionales¹¹.
 - Diagnóstico: consiste en la determinación urinaria del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), que va a presentar valores muy elevados en estos pacientes, de manera que una elevación de 15 mg en 24 horas es diagnóstica del síndrome¹¹.

1.5 DETERMINACIÓN EN EL LABORATORIO CLÍNICO

Estas determinaciones se llevan a cabo en laboratorios de análisis clínicos los cuales deben contar con infraestructuras adecuadas y personal cualificado y experimentado, capaces de llevar a cabo estos complejos y laboriosos procesos.

Para garantizar la validez y calidad de los resultados, los laboratorios deben tener en cuenta las siguientes fases¹:

1. Fase preanalítica: abarca desde el momento en el que el clínico realiza una petición hasta que la muestra convenientemente preparada es analizada por el laboratorio. Es la principal fuente de errores, por lo que se busca mejorar la calidad continuamente utilizando para ello acciones preventivas y correctivas, evitando aquellos factores que puedan modificar las concentraciones de las catecolaminas y evitando errores en la interpretación. En esta fase, hay que tener en cuenta las fuentes de variabilidad que pueden tener diferentes orígenes, biológica intraindividual e interindividual, variabilidad debida a factores fisiológicos del paciente (estrés, consumo de tabaco, alcohol y café, entre otros), variabilidad debido a la extracción de la muestra (ayuno, efecto postural...) y la variabilidad debida a características de la muestra, que pueden interferir en el procesamiento analítico.
2. Fase analítica: incluye el conjunto de operaciones relacionadas de forma directa con la realización de las mediciones analíticas, llevadas a cabo por el personal experimentado.
3. Fase post-analítica: comprende desde que se obtiene el resultado hasta que el informe es recibido e interpretado por el médico.

2. OBJETIVOS

Revisión de la metodología analítica para la:

- Determinación de las catecolaminas y sus metabolitos en los laboratorios de análisis clínicos.
- Técnica utilizada para llevar a cabo dicha determinación.
- Conocer la importancia de la determinación de catecolaminas en el diagnóstico de diferentes enfermedades que se caracterizan por secretar grandes cantidades de estas hormonas y sus metabolitos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de artículos científicos y libros, publicados *on-line* en diferentes plataformas y bases de datos, tanto en español como en inglés, de los últimos años.

Bases de datos utilizadas: Catálogo Cisne que se encuentra en la biblioteca virtual de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, Google Académico, PubMed, SEQC.

Las fechas de búsqueda datan de los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2019 y enero de 2020.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las catecolaminas y sus metabolitos se van a determinar principalmente en plasma y en orina de 24 horas.

4.1 TÉCNICA DE ELECCIÓN

La técnica de elección en los laboratorios de análisis clínicos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica¹² debido a su versatilidad, alta sensibilidad, fácil adaptabilidad y precisión.

Se trata de una técnica de separación basada en la mayor o menor retención que los componentes de la fase estacionaria ejercen sobre cada una de las especies moleculares presentes en la mezcla problema arrastrada por una fase móvil líquida gracias a la aplicación de presión por parte de una bomba¹³.

De manera que, los componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil y, por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

Este método tiene como ventaja frente a otros, la posibilidad de medir simultáneamente las diferentes formas en las que puede encontrarse un analito, es decir, permite la cuantificación individualizada de las catecolaminas libres fraccionadas^{14,15}.

Para aumentar la especificidad de la técnica, se pueden llevar a cabo una extracción previa de estas catecolaminas con albúmina activada y posteriormente, su elución con ácido clorhídrico¹.

- 4.1.1 Componentes de un equipo HPLC: todo equipo de cromatografía líquida de alta resolución debe disponer de al menos, las siguientes partes, aunque también pueden presentar módulos o accesorios complementarios¹⁶.

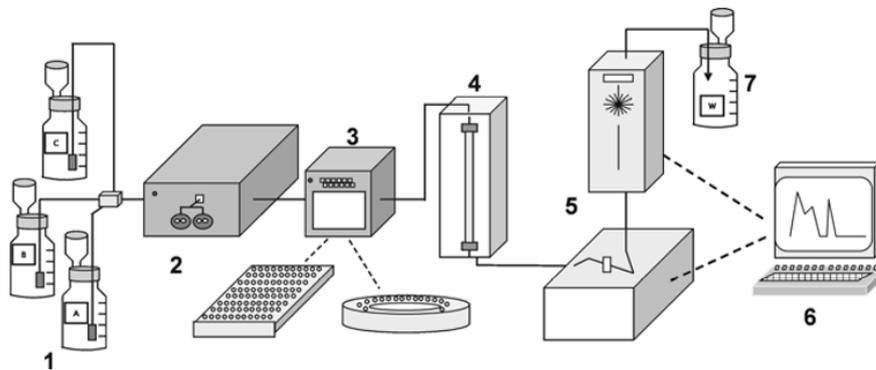


Figura 5. Componentes de un HPLC ¹⁶

1. Reservorio de la Fase Móvil: frasco con el disolvente o sistemas complejos. La boca debe ser lo más estrecha posible para evitar la evaporación del disolvente y debe estar tapado para evitar la entrada de polvo. El material más utilizado para su elaboración es el vidrio. Los sistemas de HPLC suelen incorporar de 2 a 4 reservorios.
La fase móvil debe conducir la electricidad, es decir, debe llevar un electrolito y va a discurrir a través del tubo del reservorio hasta el sistema de bombeo.
En cuanto al disolvente, es importante que presente una pureza, viscosidad y polaridad adecuada. También es importante su capacidad de miscibilidad con otros disolventes.
2. Sistema de bombeo: debe proporcionar una presión y un flujo constante lo más exacto y preciso posible. Los materiales que lo forman deben ser resistentes a la corrosión. Se caracterizan principalmente por el rango y la precisión del caudal, su capacidad de mezcla y la precisión de la mezcla.
Los principales problemas que pueden presentar son el ruido de flujo, que se conoce como rizado y pueden ser eventuales, constantes o ajenos a la bomba; y el error de flujo, que ocurre cuando el flujo real es distinto al estipulado.
3. Inyector: es un dispositivo hermético situado a la salida de la bomba que incorpora la muestra a la fase móvil antes de la columna, sin pérdidas de presión que alteren al flujo constante.
La mayoría de los equipos van a presentar “inyectores de válvulas o de bucle”, ya que permiten inyectar siempre el mismo volumen. Pueden ser manuales o automáticos, estos últimos presentan una mayor precisión y optimizan el rendimiento del equipo. Su funcionamiento consiste en cargar el bucle con la fase móvil, se gira la válvula 1/6 de vuelta, y esto permite la introducción de la muestra en la columna.
4. Columna analítica: es la parte más importante. Las variables más importantes para tener en cuenta son además de la naturaleza química de la fase estacionaria, su longitud, que debe ser suficiente para separar los compuestos inertes y no ser más larga de lo necesario, su diámetro y el diámetro, tamaño y homogeneidad de las partículas. Además, es importante controlar su temperatura, por ello suelen incorporar un horno que permite mantener la temperatura en el rango 20-100°C. La carcasa debe ser de acero inoxidable, resistente a altas presiones y con el interior liso. Se pueden colocar dos o más columnas en serie para mejorar la resolución. Suelen llevar filtros tanto a la entrada

como a la salida. A pesar de ello, hay ocasiones en las que es conveniente añadir una precolumna en el sistema, con una composición igual o lo más parecida posible a la columna cromatográfica para que aumente su vida. Esta precolumna tiene funciones tanto físicas, como químicas, cromatográficas y económicas.

En cuanto a la fase estacionaria, lo más importante es su estabilidad y resistencia a las altas presiones. Según su composición, puede ser de base de sílice, poliméricas o híbridas, formadas por una combinación de las dos anteriores.

5. Uno o varios detectores en serie: se pueden utilizar diferentes tipos, pero para estas determinaciones los más usados son los **detectores electroquímicos**¹⁷ que miden la señal eléctrica generada por el cambio electroquímico de un analito por la pérdida o absorción de electrones resultante de su oxidación o reducción en la superficie del electrodo. Se caracterizan principalmente por su selectividad y sensibilidad. Pueden ser de dos tipos:

- **Amperométricos**: la señal emitida es una medida de intensidad proporcional a la concentración de soluto cuando en la celda se aplica un potencial que ocasiona una reducción o una oxidación. Llevan un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata, que establece una diferencia de potencial con el electrodo de trabajo.
- **Coulométricos**: miden la cantidad de electricidad consumida al suceder una reacción electroquímica en la muestra. Utilizan un electrodo de hidrógeno-iones hidrógeno como electrodo de referencia. Se usa en menor medida.

6. Sistema de tratamiento de los resultados: ordenador con una base de datos donde se van almacenando todos los resultados para posteriormente ser tratados.

7. Botella para los residuos

- 4.1.2 Interferencias analíticas¹⁹: consiste en el efecto que ejerce una sustancia de la muestra, distinta a la que se quiere medir, en la determinación de la concentración o actividad del analito. Pueden ser:

- Endógenas: están directamente relacionadas con el paciente. Pueden ser producidas por condiciones patológicas, es decir, son interacciones con metabolitos del propio organismo.
- Exógenas: no están relacionadas con el paciente. Son producidas por las alteraciones que ocurran durante la extracción y manejo de las muestras.

4.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MUESTRA

Hay una serie de circunstancias preanalíticas inductoras de variabilidad y que van a influir en la validez de los resultados^{1,4,11,14,15,16}.

- Estado del paciente:
 - Postura corporal: se produce un efecto ortostático que provoca modificaciones en la secreción de catecolaminas y de sus metabolitos → se recomienda un reposo mínimo de 30 minutos en depósito supino.
 - Estrés: produce un aumento de la secreción y concentración de las catecolaminas y sus metabolitos → se recomiendan métodos de relajación, respiración profunda...

- Dieta: los alimentos ricos en catecolaminas van a aumentar de forma significativa la concentración de NMN y 3-metoxi-tiramina (3-MT) en orina. Los factores dietéticos no influyen en la concentración de metanefrinas y normetanefrinas libres en plasma ya que antes de llegar a la circulación sistémica se someten a una sulfoconjugación en el tracto gastrointestinal.² Sin embargo, si pueden aumentar la concentración de 3-MT libre plasmática → se recomienda ayuno de 8 a 12 horas previo a la extracción y restringir: caramelos, dulces, chocolate, mermelada, piña, cítricos, plátanos, helados y queso durante al menos los 5 días anteriores a la extracción.
- Cafeína: el ácido cafeico y su derivado estimulan la corteza y médula adrenal, incrementando la secreción de catecolaminas, aumentando así sus niveles en orina y plasma. Además, son sustratos de la COMT por lo que pueden afectar también a los niveles de concentración plasmática y urinaria de metanefrinas → se recomienda no tomar café ni bebidas con cafeína durante al menos los 5 días anteriores a la extracción.
- Tabaco: la nicotina estimula la corteza y médula adrenal, incrementando la secreción y concentración de catecolaminas en orina y plasma → se recomienda no fumar durante las 4 horas previas a la extracción.
- Fármacos: incrementan los niveles de las catecolaminas y sus metabolitos porque interfieren en su síntesis, almacenamiento, secreción o metabolismo → Interrumpir los tratamientos con los siguientes fármacos de 3 a 7 días antes de la extracción.

Tabla 1. Fármacos más frecuentes que causan falsos-positivos en la etapa preanalítica.²

FÁRMACO	EFEECTO
Antidepresivos tricíclicos (ATC)	↑NA y NMN en plasma y orina
Bloqueadores-α no selectivos	↑NA y NMN en plasma y orina
Bloqueadores α ₁ -selectivos	↑ Catecolaminas y metanefrinas en plasma
Bloqueadores de los canales de Ca ²⁺	↑NA en plasma y orina
β-bloqueantes	↑ Catecolaminas y metanefrinas en orina
Simpaticomiméticos	↑ Catecolaminas y metanefrinas en plasma y orina
IMAO	↑ Metanefrinas en plasma y orina
Antiparkinsonianos	↑ Catecolaminas en plasma y orina
L-DOPA	↑ 3-MT y dopamina

- Alcohol: aumenta la concentración de catecolaminas y metanefrinas en plasma → se recomienda no tomar bebidas alcohólicas durante las 4 horas previas a la extracción.

- Otras drogas (cocaína, anfetaminas, éxtasis...): Aumentan la concentración de catecolaminas y metanefrinas en plasma y orina → se recomienda no consumir durante al menos los 5 días anteriores.

Todo esto obliga a obtener la muestra bajo unas condiciones perfectamente estandarizadas, especialmente en cuanto a restricciones dietéticas y farmacológicas en la recolección de orina, y con respecto a la postura y condiciones del paciente durante la extracción sanguínea¹¹, ya que estos factores pueden producir resultados falsos-positivos o falsos-negativos, lo que plantea un dilema diagnóstico.

4.3 DETERMINACIÓN EN EL LABORATORIO

a) DETERMINACIÓN DE CATECOLAMINAS EN PLASMA:

Esta determinación es más útil en pacientes con hipertensión persistente o que está experimentando un episodio de hipertensión, ya que las hormonas no permanecen en la sangre, sino que son utilizadas por el organismo, metabolizadas y/o excretadas³.

i. Valores de referencia para las catecolaminas plasmáticas³:

Noradrenalina	300 pg/ml
Adrenalina	60 pg/ml
Dopamina	150 pg/ml

ii. Recogida de la muestra:

- El paciente debe cumplir las recomendaciones nombradas anteriormente para minimizar la variabilidad de los valores plasmáticos.
- Se lleva a cabo en tubos que llevan un anticoagulante (heparina o EDTA) en frío. Posteriormente, se centrifuga a 4°C y se separa lo antes posible para su almacenaje a -20°C⁴.

iii. Estabilidad de la muestra: es bastante inestable, pudiéndose degradar en cuestión de minutos¹. Sin embargo, una vez que el plasma se separa de las células sanguíneas, las catecolaminas son estables durante:

- Un día a 20°C
- Dos días a 4°C
- Un mes a -20°C
- Más de un año a -80°C

iv. Método de elección: HPLC con detector electroquímico por ser la técnica más específica para la determinación de la fracción libre de catecolaminas en plasma¹.

v. Resultados⁶:

- Catecolaminas totales (A+NA) > 2000 pg/ml → Feocromocitoma
- Catecolaminas totales entre 1000-2000 pg/ml → Sugestivas, pero no diagnósticas. En este caso, habría que llevar a cabo las pruebas farmacológicas de supresión de catecolaminas con Clonidina^{4,6}:
Consiste en administrar 0,3 mg de Clorhidrato de Clonidina por vía oral, en pacientes con tumores del tejido cromafín que no consiguen disminuir las concentraciones plasmáticas de metanefrinas, 12 horas después de suspender

la medicación hipotensora. Se determinan las concentraciones de normetanefrina en el plasma de las muestras de sangre tomadas inmediatamente antes y a los 180 minutos después de la administración del preparado. En el 96% de los pacientes con feocromocitoma se observa o una elevación de la concentración de normetanefrina a los 180 minutos o una disminución inferior al 40% sobre el valor basal. Esta prueba se utiliza porque no tiene efectos secundarios graves como los que pueden aparecer con las pruebas de estimulación⁴.

b) DETERMINACIÓN DE CATECOLAMINAS EN ORINA:

Se lleva a cabo una recogida de la orina de 24 horas, ya que así integra la secreción de metanefrinas durante todo el día, y las posibles variaciones tendrán menos efectos en los resultados y, además puede aportar mayor sensibilidad diagnóstica.

Presenta como ventaja frente a la determinación plasmática, que puede detectar un exceso de producción. Sin embargo, tiene inconvenientes debido a que es un método incómodo para el paciente que puede encontrar dificultades en la recolección, sobre todo en pacientes pediátricos, y esto puede dar lugar a falsos negativos o positivos¹¹.

Esta determinación se va a utilizar para el diagnóstico de feocromocitoma y para el diagnóstico y seguimiento de neuroblastomas. También va a ser útil para monitorizar la eficacia del tratamiento del feocromocitoma, una vez haya sido extirpado y para monitorizar la recurrencia de la enfermedad.

i. Valores de referencia para las catecolaminas urinarias³:

Hay que tener en cuenta que varían en función de la edad¹.

Noradrenalina	80 µg/24 horas
Adrenalina	100 µg/24 horas
Dopamina	400 µg/24 horas

ii. Recogida de la muestra:

Lo más importante es que el paciente cumpla con las recomendaciones nombradas anteriormente para minimizar la variabilidad de los valores urinarios, y que la recogida de la muestra sea la correcta, es decir, ni excesiva ni escasa. Para ello, es útil entregarles un protocolo de recogida⁴.

- Se lleva a cabo en un recipiente que contenga 10 ml de ácido clorhídrico (HCl) 6M como conservante¹¹.
- Durante la recolección la muestra deber mantenerse refrigerada¹ ya que así las catecolaminas son estables durante al menos dos semanas¹¹.
- Si las muestras presentan un pH entre 3-7 no requieren refrigeración durante la recolección y pueden almacenarse a 4°C hasta dos días antes de ser congelados, pero esto es complicado para los pacientes²¹.
- Una vez finalizada la recogida, se anota el volumen total (diuresis) y en el laboratorio, se homogeniza y se toman alícuotas, asegurando que el pH sea inferior a 3¹¹. Finalmente, es congelada a -20°C ó -30°C lo antes posible hasta su análisis ya que, a estas temperaturas pueden ser almacenadas hasta un mes sin sufrir variaciones²¹.
- Otra alternativa es utilizar recipientes con Na₂EDTA y disulfito de sodio (Na₂S₂O₅) en vez de HCl y posteriormente, en el laboratorio, acidificar hasta un pH 4 con HCl. Este método evita que se produzca una hidrólisis del

analito y no pone en peligro al paciente durante la primera fase de la recolección cuando el ácido está aún muy concentrado y, por el contrario, evita la degradación de catecolaminas por falta de ácido⁴.

- iii. Estabilidad de la muestra: para conservar la integridad de las catecolaminas hay que mantener la muestra en refrigeración y acidificarla a un pH 4 ya que, a pH alcalino, los dos grupos hidroxilo del grupo catecol son susceptibles a sufrir reacciones de oxidación^{11.20}. Para ello se utiliza como conservante HCl que va a disminuir la actividad enzimática, la tasa de descomposición y la velocidad de oxidación de las sustancias químicas²². Hay que tener en cuenta las posibles variantes que podrían modificar la concentración original de catecolaminas si las muestras se almacenan durante mucho tiempo (meses o años), o el congelamiento o descongelamiento de las muestras varias veces antes del análisis²¹.
- iv. Método de elección: HPLC con columna de fase inversa o columna de intercambio iónico, con detector electroquímico, por amperometría o coulombimetría¹⁸.
- Columna de fase inversa: la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil y la retención está basada en la interacción hidrofóbica entre la fase estacionaria y la región no polar del analito¹⁷.
 - Columna de intercambio iónico: los grupos cargados son incorporados en una resina. Estas moléculas cargadas de analito compiten con los iones de la fase móvil por los sitios de unión de la fase estacionaria. La separación se va a producir gracias a las fuerzas electrostáticas que van a permitir el intercambio reversible de iones¹⁷.
 - Intercambiador aniónico → atrae aniones
 - Intercambiador catiónico → atrae cationes

Independientemente del método que se utilice, hay que llevar a cabo una eliminación previa de sustancias interferentes mediante técnicas de extracción utilizando²¹:

- Óxido de aluminio (alúmina): el aislamiento es limitado, es un procedimiento lento y complicado.
 - Resinas de intercambio iónico
 - Solventes orgánicos de extracción
- v. Resultados: se van a expresar relacionados con la creatinina²¹, es decir, en microgramos de sustancia por gramo de creatinina. Esto permite obtener un dato corregido según la talla del individuo y el volumen urinario excretado, es decir, un dato más preciso y fácilmente comparable con otros individuos.

La creatinina se sintetiza en el hígado y el páncreas y se utiliza para evaluar la función renal y la filtración glomerular. Los niveles de creatinina en la orina diaria se utilizan como índice de referencia de los valores de las catecolaminas ya que la excreción de creatinina permanece relativamente constante para cada sujeto, mientras que el volumen de excreción urinario puede variar.

c) DETERMINACIÓN DE LOS METABOLITOS DE LAS CATECOLAMINAS:

Las catecolaminas presentan diferentes metabolitos que van a tener diferentes determinaciones.

1. METANEFRINAS LIBRES:

Se pueden determinar en:

- Plasma¹: son metabolitos estables que proceden de las catecolaminas que se metabolizan dentro de la propia glándula suprarrenal.
 - i. Niveles de referencia: en personas sanas son bajos, pero en pacientes con feocromocitoma van a estar significativamente elevadas. En adultos:

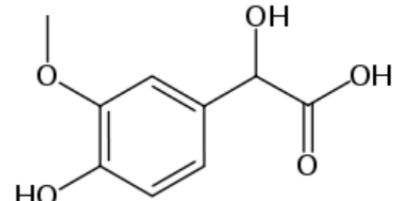
Metadrenalina libre	< 0.50nmol/L
Normetadrenalina libre	<0.90 nmol/L

- ii. Método de elección: Extracción en fase sólida (PSE) para su cuantificación y Cromatografía líquida-espectrometría masa/masa (LC-MS/MS) para su análisis.
 - iii. Ventajas: es la prueba más sensible ya que las metanefrinas libres poseen una mayor semivida plasmática que las catecolaminas y presentan menos interferencias medicamentosas y con el sistema nervioso simpático.
 - iv. Inconvenientes: Requiere de una extracción en fase sólida previa y la mayoría de los laboratorios clínicos convencionales no disponen de la técnica necesaria para su cuantificación.
- Orina: se van a medir los niveles de metanefrinas totales¹, es decir, las metanefrinas fraccionadas (metadrenalina y normetadrenalina totales). Hay que tener en cuenta que las metanefrinas conjugadas provienen de la sulfatación intestinal y por ello, se producen a partir de procesos metabólicos no relacionados directamente con el tumor, lo cual podría reducir la especificidad diagnóstica⁴.
 - i. Niveles de referencia: en personas sanas son bajas, sin embargo, en caso de feocromocitoma van a estar elevadas. Se expresan en µg/día o en µg/g de Creatinina y van a ser variables según la edad del paciente¹.
 - ii. Método de elección: Hidrólisis ácida de la fracción conjugada como paso inicial, seguida de un proceso de purificación, para la extracción de las metanefrinas, mediante extractante de intercambio iónico. Por último, se lleva a cabo su cuantificación por HPLC adaptado a un detector electroquímico.

La muestra se mantiene estable durante al menos una semana a temperatura ambiente, lo que es importante ya que simplifica la recogida de orina evitando riesgos para el paciente. Sin embargo, la acidificación de la muestra a pH 4 se tiene que hacer inmediatamente después de la recepción en el laboratorio para asegurar la correcta conservación. Aun así, como la acidificación de la muestra de orina no interfiere en la medición de metanefrinas, se pueden usar las mismas muestras que para la determinación de catecolaminas recogidas en un recipiente estéril con HCL 6M⁴.

- iii. Ventajas: es la prueba de elección para iniciar el *screening* del feocromocitoma ya que presenta una alta especificidad y sensibilidad. Además, no se ve significativamente afectada por la dieta¹.
- iv. Inconvenientes: aunque la determinación de metanefrinas totales en orina de 24 horas se está introduciendo poco a poco, la mayoría de los laboratorios clínicos utilizan la determinación de catecolaminas libres en orina de 24 horas por HPLC con detector electroquímico porque es una tecnología más sencilla.

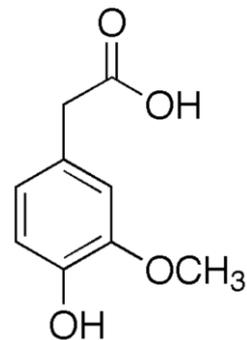
2. ÁCIDO VANILMANDÉLICO: es el metabolito mayoritario de las catecolaminas, representa aproximadamente el 60% del total de producto derivados de la adrenalina y noradrenalina¹.



- i. Determinación en: Orina de 24 horas.
- ii. Intervalos de referencia: están estratificados por edades y son expresados en mg VMA/día o en mg VMA/g de Creatinina¹.
- iii. Método de elección: HPLC con detección electroquímica, es un método menos sensible pero altamente específico¹. Se encuentra principalmente en forma libre, por ello no es necesaria una hidrólisis previa¹⁵.
La acidificación de la muestra no afecta en su medición, por ello se podría utilizar la misma muestra que se use para la determinación de las catecolaminas⁴.
- iv. Ventajas: es de gran utilidad en la identificación y seguimiento de pacientes con neuroblastoma, con una sensibilidad clínica cercana al 100%¹¹.
- v. Desventajas: en pacientes con sospecha de feocromocitoma tiene una sensibilidad diagnóstica limitada¹¹.

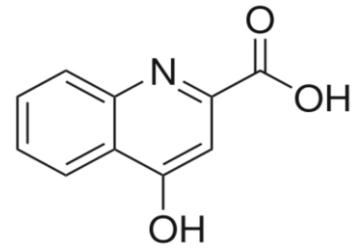
3. ÁCIDO HOMOVANÍLICO: es el principal metabolito de la dopamina y de la L-DOPA¹.

- i. Determinación en: Orina de 24 horas.
- ii. Intervalos de referencia: están estratificados por edades y son expresados en mg HVA/día o en mg HVA/g de Creatinina¹.
- iii. Método de elección: HPLC de fase inversa con detección electroquímica por amperometría tras una etapa inicial de purificación y aislamiento con extractante de intercambio iónico¹⁵.
- iv. Ventajas: se utiliza para el diagnóstico y seguimiento de neuroblastomas¹¹. Presenta buena sensibilidad sin apenas interferencias y permite la determinación simultánea de otros metabolitos¹⁵.
- v. Desventajas: los métodos espectrofotométricos dan lugar a un gran número de interferencias.



d) DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO-5-HIDROXI-INDOLACÉTICO: se trata de un metabolito de la serotonina.

- i. Determinación en: orina de 24 horas.
- ii. Niveles de referencia: de 3 a 15 mg/24 horas.¹¹
- iii. Método de elección: HPLC con detección amperométrica¹⁵
- iv. Ventajas: Permite medir de forma específica cantidades muy pequeñas de este ácido, siendo así de especial utilidad en el diagnóstico de tumores pequeños sin metástasis.
- v. Desventajas: no se recomienda el uso del método del ácido nitroso para llevar a cabo un cribado debido a su baja sensibilidad diagnóstica y la susceptibilidad a interferencias.¹¹



5. CONCLUSIONES

- La determinación de las catecolaminas y sus metabolitos va a ser fundamental para el diagnóstico de enfermedades o tumores endocrinos, como el feocromocitoma o el neuroblastoma, debido a que son sintetizadas en la médula suprarrenal y metabolizadas a partir de ella, y estos tumores van a producir cantidades excesivas de dichas hormonas.
- Para su determinación se van a recoger muestras de dos tipos, el plasma y la orina de 24 horas. Para ello, los pacientes deben cumplir una serie de recomendaciones y tener en cuenta los factores que puedan afectar a la recogida y conservación de las muestras hasta que lleguen al laboratorio con el fin de evitar variaciones en los resultados que den lugar a falsos-positivos o falsos-negativos.
- En el laboratorio clínico existen en total 6 determinaciones:
 - 2 en plasma (catecolaminas y metanefrinas).
 - 4 en orina (catecolaminas, metanefrinas, VMA y HVA).
- En función de la enfermedad que se tenga sospecha y se quiera diagnosticar se van a llevar a cabo diferentes mediciones. Así:
 - Para el diagnóstico del feocromocitoma se van a medir: las catecolaminas, metanefrinas y el VMA.
 - Para el diagnóstico del neuroblastoma se van a medir: el HVA y el VMA.
 - Estos tumores endocrinos, en algunas ocasiones están relacionados con tumores carcinoides. Por ello, también es de utilidad determinar el ácido 5-HIAA.
- El método de elección por la mayoría de laboratorios para estas determinaciones es el HPLC con detector electroquímico, debido a su especificidad, versatilidad, alta sensibilidad, fácil adaptabilidad y precisión. Además, la tecnología requerida es sencilla y asequible para estos laboratorios y multitud de estudios clínicos han avalado su utilidad.
- Los resultados de las muestras de orina de 24 horas se deben expresar tomando como referencia los niveles de Creatinina, es decir, se expresan en microgramos de analito por gramo de creatinina.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández C., Jiménez L., Ruiz M. El laboratorio clínico y la función hormonal. Servicio de análisis clínicos y bioquímica. Hospital Virgen de la Salud: Toledo; 2011.
2. Grouzmann E, Lamine F. Determination of catecholamines in plasma and urine. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;27(5):713-723.
3. García A. Determinación bioanalítica de compuestos de relevancia clínica mediante cromatografía líquida micelar.
4. Berlanga E, Álvarez-García E. Diagnóstico bioquímico del feocromocitoma. *Educación continuada en el laboratorio clínico*. SEQC. 2015-2016;22:103-117.
5. Kaplan N.M. *Clinical Hypertension*. 7th Edition. Williams & Wilkins, 1998.
6. Bernal C, Alcázar J. Feocromocitoma: presentación clínica. *Diagnóstico y tratamiento. Hipertensión y Riesgo Vascular*. 2006;23(6):173-183.
7. Martínez-Morillo E, Valdés Gallego N, Eguía Ángeles E, Fernández J, Prieto García B, Álvarez F. Rendimiento de las metanefrinas libres plasmáticas en el diagnóstico de los feocromocitomas y paragangliomas en la población asturiana. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*. 2019;66(5):312-319.
8. Petrina M, Calderón D, Menéndez E. Feocromocitoma y paraganglioma. *Sección de Endocrinología*. Hospital de Navarra. 1998;21(1): 31-46
9. Perna Rodríguez V, Arrobas Velilla T, González Martín C. Utilidad de la determinación de catecolaminas urinarias en el diagnóstico de un ganglioneuroblastoma. *Acta Pediátrica*. 71(2), 2013. Ediciones Mayo; 2000. p. 517.
10. Maroun J, Kocha W, Kvols L. Guidelines for the diagnosis and management of carcinoid tumours. Part 1: the gastrointestinal tract. A statement from a Canadian National Carcinoid Expert Group. *Curr Oncol*. 2006 Apr;13(2):67-76.
11. Pons A, Hernández G, Estes M. Marcadores tumorales en orina: ácido 5-hidroxiindolacético, catecolaminas y sus metabolitos. En: Pineda D, Cabezas A, Ruiz G. *Análisis de las muestras de orina*. El laboratorio clínico 3. 2011; 11: 239-258
12. García de Marina Bayo A, Yusá Marco D. *HPLC instrumental*. Valencia: Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia; 2016.
13. *Guía de prácticas Química Analítica II*. UCM. Sección departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia. 2015, práctica 4: 35.
14. Rosano T, Eisenhofer G, Whitley R. Catecholamines and Serotonin. In: Burtis CA, Ashwoos ER, Bruns DE, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 14Ed. St. Louis. Elsevier Saunders; 2006.
15. Rosano T, Whitley R. Catecholamines and Serotonin. In: Burtis CA, Ashwoos ER, Bruns DE, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2ª edition. Philadelphia. WC Saunders Co. Elsevier. 1994.1739-1776.
16. Comisión de Hormonas de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Recomendaciones para el diagnóstico bioquímico del feocromocitoma. *Química Clínica*. 1998.17(1):42-46
17. Plou F, Torres P. *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*. Técnica de análisis y caracterización de materiales. Instituto de Catálisis y petroquímica (CSIC). 19:1-41.
18. Henry J. *El laboratorio en el diagnóstico clínico*. Madrid: Marbán; 2007.
19. Interferencias Analíticas. studylib.es. 2020 [revisado el 12 de enero de 2020]. Disponible en : <https://studylib.es/doc/5036620/interferencias-analiticas>
20. Álvarez-Mejías D, Loaiza-Yee P. Efecto de las condiciones de conservación de la muestra de orina en el análisis de catecolaminas por HPLC. *Revisión Colegio de Microbiología Química Clínica de Costa Rica*. 2018;24(3):177-191.

21. Benavides S, Fornaguera J. Un método simple para la recolección, extracción y medición de catecolaminas en orina de adultos mayores. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2007;41(4):541-552.
22. Krstulovic A. Investigations of catecholamine metabolism using high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1982;229:1-34.