

**UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**DETERMINACION DE METANEFINAS URINARIAS TOTALES POR  
CROMATOGRAFIA EN COLUMNA EMPLEANDO AMBERLITA CG-50**

**TESIS PROFESIONAL**

**RUTH ESTHER / DELGADO ULLOA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**DETERMINACION DE METANEFRIAS URINARIAS TOTALES POR  
CROMATOGRAFIA EN COLUMNA EMPLEANDO AMBERLITA CG-50**

**RUTH ESTHER DELGADO ULLOA**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

## JURADO ASIGNADO OFICIALMENTE

**Presidente.** Q.F.B. Fernando Velez Orozco

**Vocal.** Q.F.B. Etelvina Medrano de Jaimes.

**Secretario.** Q.F.B. Gloria Nevarez Luna.

**Primer Suplente.** Q.F.B. Dea Coronado Perdomo.

**Segundo Suplente.** Q.F.B. Estela Yopez Izquierdo.

**Sitio en donde se -  
desarrolló la Tesis.** Instituto Nacional de la Nutrición.

**Sustentante.** Ruth Esther Delgado Ulloa.

**Director de Tesis.** Q.F.B. Etelvina Medrano de Jaimes.

**A la memoria de mi Padre y Abuelito.**

**A mi Madre y Abuelita.**

**Por sus sacrificios y esfuerzos.**

**A mis hermanas.**

**A mis tíos.**

**A la Srita. Q. F. B. Elda Sanguino A.  
Con cariño y gratitud por la ayuda --  
prestada durante la realización de es-  
ta Tesis.**

Mi agradecimiento al Instituto Nacional de la Nutrición así como al Dr. José Antonio García Reyes y a la Srita. Q.F.B. Celia G. Muñiz, por las facilidades brindadas durante la elaboración de esta Tesis.

Al Dr. Carlos Valverde R.  
Por su valiosa ayuda.

Mi agradecimiento a la Sra. Q.F.B. Estelvina Medrano de  
Jaines.  
Por su acertada dirección.



## CAPITULOS

- I.- INTRODUCCION
- II.- GENERALIDADES
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- RESULTADOS
- V.- COMENTARIOS Y CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFIA

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## INTRODUCCION

Existen en todo el reino animal incluyendo al hombre, un importante grupo de sustancias biologicamente activas- que presentan en su estructura uno o más grupos amino; generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos esencia- les, son denominadas genericamente "aminas biogénicas" y - comprenden entre otras a las siguientes: La Histamina, Se- rotonina, Acetilcolina, Adrenalina y Noradrenalina.

La búsqueda y desarrollo de técnicas específicas y -- sensibles para la cuantificación de aminas, en especial de la Adrenalina y Noradrenalina, o de sus principales metabo- litos en diferentes materiales biológicos, continúa siendo hasta la fecha la meta de diversos grupos de investigado-- res. Efectivamente, el cada vez mayor número de técnicas- o modificaciones publicadas, enfatiza la ausencia de un mé- todo que reúna los requisitos ideales para una técnica de- uso rutinario, en el estudio o investigación de los padeci- mientos que hasta el momento se conoce, que presentan alta raciones en el metabolismo de estas aminas.

La metodología empleada para la extracción de las ca

tecolaminas, término con el que se designa a la Adrenali--  
na y Noradrenalina; está basada en la adsorción de las mig  
mas por una resina de intercambio iónico, Este procedi---  
miento, utilizado en todas las técnicas publicadas hasta -  
el momento y sobre el cual se han señalado modificaciones--  
menores, es considerado como el más adecuado y específico--  
ya que con él se obtienen rendimientos que varían según --  
los diferentes autores del 85 al 95%. (1, 2, 3)

Es la cuantificación de las catecolaminas o sus meta-  
bolitos, un aspecto que representa grandes problemas meto-  
dológicos y técnicos. En términos generales, las técnicas  
descritas para su cuantificación pueden agruparse de la si-  
guiente manera:

a).- Técnicas de bioensayo.

b).- Técnicas colorimétricas.

c).- Técnicas fluorométricas.

a).- Las técnicas de bioensayo continúa: siendo hasta la  
fecha de utilidad, aunque las dificultades inheren--  
tes a su manejo hacen que su empleo se haya restrin-  
gido, particularmente en lo que al estudio farmaco--  
lógico de las catecolaminas se refiere.

b).- Respecto a las técnicas colorimétricas, su uso se ha

abandonado casi por completo, debido fundamentalmente a su escasa especificidad.

e).- La manipulación química con el consecuente rearrreglo molecular del núcleo "catecol", permite obtener estructuras que fluorescen a una longitud de onda determinada; por esta razón, los métodos basados en esta propiedad son considerados por el momento, como los más sensibles y precisos para la cuantificación de catecolaminas. No obstante estas ventajas, el empleo de las técnicas fluorométricas se ve limitado por las dificultades metodológicas y el elevado costo del aparato empleado.

Por las razones antes señaladas, se han buscado técnicas que aún no estando basadas en el principio de la fluorescencia, reúnan la suficiente sensibilidad y especificidad que permita su empleo rutinario en el estudio clínico de padecimientos endócrinos.

En una reciente revisión (4), sobre los métodos utilizados para la determinación de Adrenalina y Noradrenalina y sus principales metabolitos; la cuantificación de Metanefrinas totales por el método de Pisano (5) se juzgó como el más indicado, por reunir todos los requisitos an-

tes mencionados y que posee además menores dificultades -- técnicas y de manejo.

En base a estos antecedentes y considerando que la -- vía de inactivación que conduce a la formación de metane-- frinas es la más importante (6, 7), se juzgó conveniente -- montar y estandarizar, la técnica de Pisano; en el labora-- torio de investigación Neuroendocrina del Instituto Nacio-- nal de Enfermedades de la Nutrición.

**CAPITULO II**

**GENERALIDADES**

## GENERALIDADES

Actualmente se designa con el nombre de catecolaminas a tres sustancias biológicamente activas: la Adrenalina, la Noradrenalina y la Dopamina, cuya característica común es poseer un núcleo "catecol", es decir un núcleo dihidroribenceno y una cadena lateral aminada.

Estas sustancias, o mejor dicho hormonas, intervienen en multitud de funciones en el organismo y en consecuencia el estudio de su metabolismo es de gran importancia y a ello haremos mención en forma breve en este capítulo.

### SINTESIS.-

Los procesos químicos y la secuencia de pasos enzimáticos que llevan a la elaboración final de Adrenalina y Noradrenalina, fueron propuestos desde 1939 por Blaschko (8); actualmente no sólo se ha comprobado esta secuencia sintética, sino que además, se han aislado y caracterizado las enzimas que intervienen en dicha síntesis. En la figura No. 1 se encuentra representado en forma esquemática este proceso.



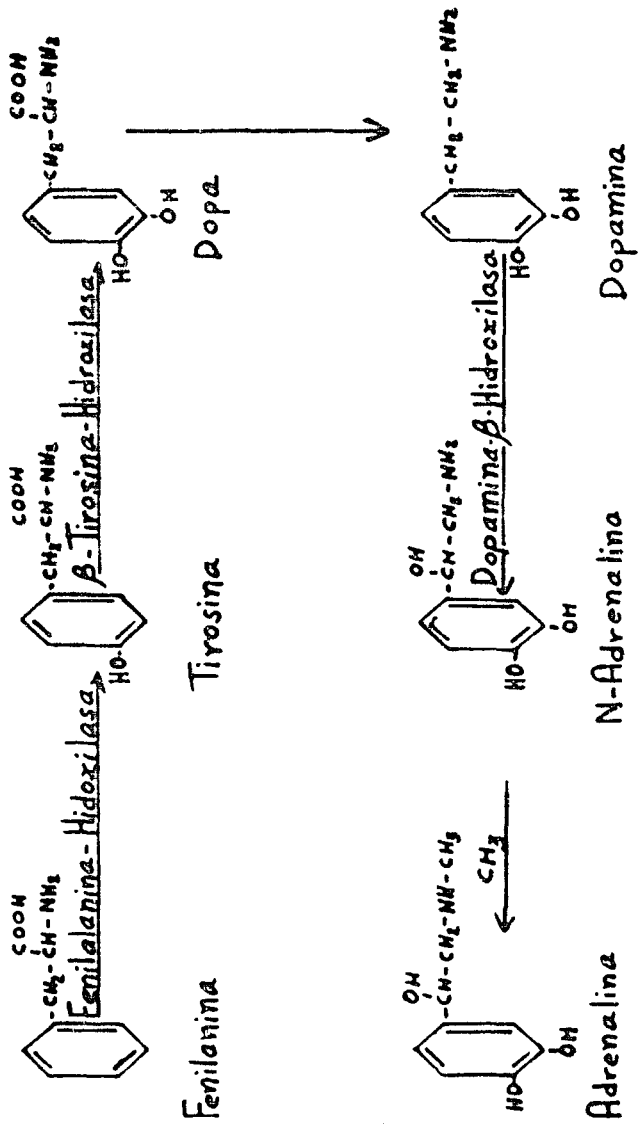


Figura N° 1

- 1.- Esta vía metabólica se inicia con la hidroxilación -- del aminoácido esencial fenilalanina en posición "para" formándose la tirosina o para-hidroxifenilalanina.
- 2.- Posteriormente la tirosina es nuevamente hidroxilada para formar la 3-4 dihidroxifenilalanina o Dopa, mediante la intervención de la beta-tirosina hidroxilasa, enzima que requiere como cofactores tetrayodo-tiridinas, NDPH, ión férrico y Oxígeno (9), esta enzima se ha considerado como el factor limitante de toda la vía metabólica. (10)
- 3.- En el siguiente paso la 3-4 dihidroxifenilalanina sufre una descarboxilación en su cadena lateral, para transformarse en 3-4 dihidroxifeniletilamina o Dopamina, mediante la acción de una enzima inespecífica denominada L-aminoácido aromático descarboxilasa, la cual requiere como cofactor al fosfato de piridoxal. (11)

Conviene señalar que la Dopamina constituye ya una catecolamina fisiológica y farmacológicamente activa, que parece intervenir en la fisiología normal y patológica de ciertas áreas del sistema nervioso central.

- 4.- La Dopamina sufre un proceso de oxidación para trans-

formarse en Noradrenalina, proceso en que intervienen la dopamina beta-hidroxilasa, enzima mediante la cual se adiciona un grupo  $\text{OH}^-$  en posición "alfa" del carbón<sub>1</sub> de la cadena lateral, este paso requiere la presencia de ascorbato, cobre y NADPH (12)

5.- Finalmente la Noradrenalina se convierte a Adrenalina, merced a la introducción de un grupo metilo, en el grupo amino de la cadena lateral, la reacción es mediada por la feniletanol-amina N-metil-transferasa y la S-adenosil-metionina como donadora del grupo metilo. (13)

Conviene señalar que este proceso biosintético no puede llevarse a cabo por todas las células del organismo, las únicas capaces de realizarlo en forma completa, son las células cromafines y particularmente las que constituyen la médula suprarrenal, -- pues la actividad de la fenil-etanol-amina N-metil-transferasa está condicionada por la presencia de -- concentraciones elevadas de glucocorticoides, requisito que sólo se cumple a nivel de cápsula suprarrenal. (14)

El resto de células cromafines del organismo, es --

decir aquellas que se encuentran a nivel de sistema nervioso periférico, detienen la secuencia sintética hasta Noradrenalina y son incapaces de sintetizar Adrenalina.

Así mismo existen otros tejidos como el hepático, cardíaco y renal que son capaces de oxidar a la fenilalanina y a la tirosina. (15)

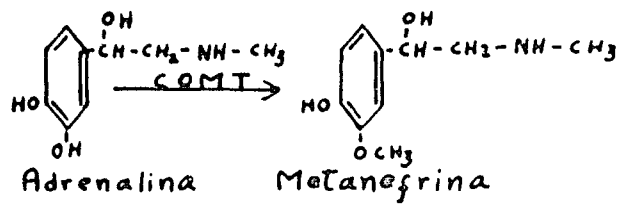
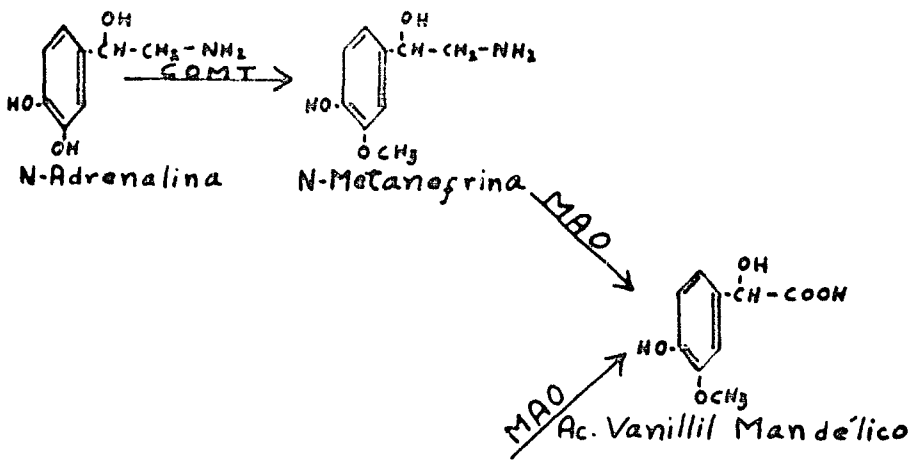
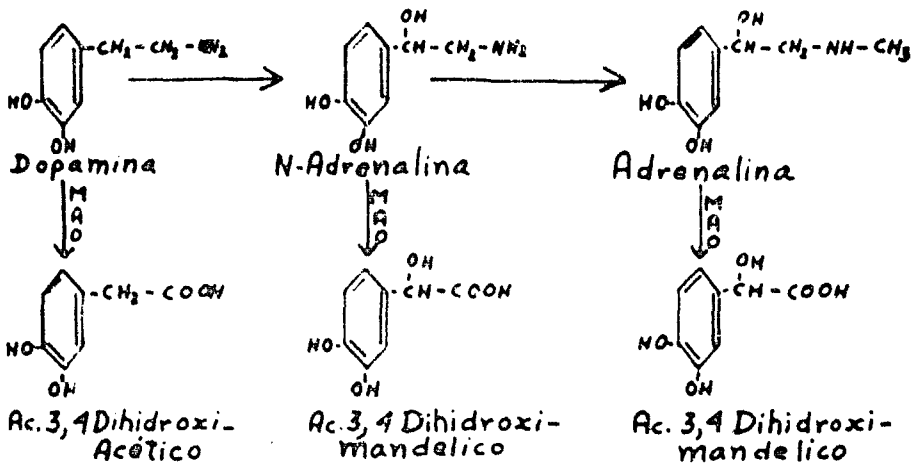
### Almacenamiento y Liberación.-

Las catecolaminas una vez sintetizadas pueden ser almacenadas en los "gránulos" cromafines de médula suprarrenal, de nervios simpáticos, corazón y cerebro.

Estos gránulos están constituidos por una proteína específica y requieren para captar a las aminas, de la presencia de Magnesio y ATP. (8) Se ha propuesto la existencia de dos tipos diferentes de gránulos, sugiriéndose cierta selectividad para captar una u otra amina. (9)

### Catabolismo o Inactivación.-

En relación al catabolismo de las catecolaminas en el sentido estricto de la palabra, o sea de su degradación enzimática, en la figura No. 2, se han representado en forma esquemática, las vías catabólicas más importantes.



Las enzimas encargadas de esta degradación son la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-orto-metil-transferasa (COMT). Con respecto a la localización de la primera, esta se encuentra en las mitocondrias, es decir su localización es intracitoplasmática y su acción condiciona la formación de los siguientes productos:

- 1.- Partiendo de la Dopamina produce el ácido 3,4 dihidroxifenilacético.
- 2.- Partiendo de la Noradrenalina o Adrenalina, da el ácido 3,4 dihidroxi-mandélico ó (ácido dihidroxi-mandélico).

Con relación a la COMT, se encuentra localizada en la fracción microsomal y constituye la principal vía de degradación de catecolaminas; esta enzima transfiere un grupo metilo de la S-adenosil-metionina al oxidriilo del Carbono<sub>3</sub> formando los respectivos metaderivados: Normetanefrina y Metanefrina. Esta enzima puede actuar a nivel del ácido 3,4 dihidroxi-mandélico ó (ácido vanillil mandélico).

Finalmente en la figura No. 2 puede apreciarse como la acción de la MAO, condiciona la formación de 3,4 dihidroxi-fenilacético ó bien de AVM según actúe en -

uno u otro tipo de los metoxi-derivados.

### Fisiología.-

Las catecolaminas constituyen en sí un grupo determinado de hormonas, sintetizadas por determinado tipo de tejido, son secretadas a el torrente sanguíneo para actuar a distancia sobre las funciones de determinadas células y tejidos orgánicos.

Sin pretender revisar en forma amplia las numerosas funciones en que intervienen estas hormonas, se mencionarán brevemente las principales.

En terminos generales, podemos considerar tres grandes grupos de efectos: a nivel cardiovascular, neurovascular y metabólico.

En relación al primer grupo de acciones es necesario recordar que se ha propuesto la existencia de receptores específicos en los órganos o estructuras "blancos" cuya activación media la acción de las catecolaminas.

Efectivamente se sabe que de la estimulación de los receptores "alfa" depende la contracción de la musculatura lisa de diferentes sitios, tales como: arteriolas cutáneas cápsula esplénica, útero, etc.

Por otra parte, la estimulación de los receptores "beta", ocasionan relajación de bronquios, útero, arteriolas, así como aumento en la frecuencia y fuerza de la contracción del miocardio.

En términos generales puede considerarse que la Noradrenalina actúa predominantemente sobre receptores "alfa" y poco sobre los receptores "beta", mientras que la Adrenalina actúa en forma más o menos semejante sobre ambos tipos de receptores.

Existen por otra parte receptores "gamma" y "delta" (16), los cuales median los efectos metabólicos de las catecolaminas, de los cuales sobresalen la acción glucogenolítica, lipolítica e insulinopónica; están mediados por la activación del sistema de la adenilciclasa, es decir, por el 3' 5' adenosin-monofosfato cíclico, que se considera como uno de los mensajeros que media la acción de las hormonas.



**CAPITULO III**

**PARTE EXPERIMENTAL**

### Fundamento del Método Empleando.-

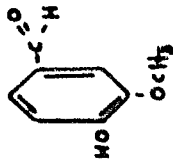
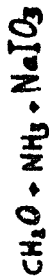
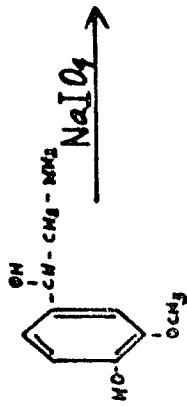
El método empleado para la determinación de metanefrinas urinarias totales, es el de Pisano cuyo fundamento es el siguiente:

Siendo los metaderivados productos terminales de las catecolaminas, su cuantificación refleja de manera directa la producción total de catecolaminas.

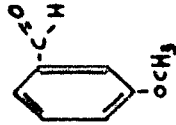
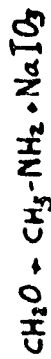
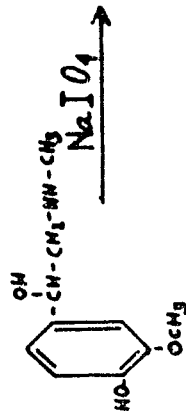
Se ha demostrado que la mayor proporción de metanefrinas urinarias, se encuentra en forma conjugada y por esta razón es indispensable realizar hidrólisis ácida de la muestra a estudiar. (5)

La presencia del grupo amino en la cadena lateral, -- permite la adsorción de las catecolaminas por determinados tipos de resinas de intercambio iónico, pudiendo ser eluidas mediante la adición de hidróxido de amonio.

La presencia en la cadena lateral del grupo amino y el grupo oxhidrilo, permite que el porydato oxide y rompa la unión C-C de dicha cadena, con lo cual se obtiene el núcleo vanillil, (figura 3) cuya absorbancia es específica y máxima a 360 mμ.



N-Meta-Adrenalina



Meta-Adrenalina

Figura N° 3

Este método es relativamente simple y permite determinar con precisión suficiente, la excreción urinaria de metanefrinas totales (metanefrina + normetanefrina).

### Descripción del Método.-

Implica fundamentalmente los siguientes pasos:

- a).- Hidrólisis ácida de la muestra urinaria.
- b).- Adsorción de los metaderivados por una resina de intercambio iónico.
- c).- Conversión de estos a vanilil, mediante la ruptura por oxidación de la cadena lateral.  
Tanto la metanefrina como la normetanefrina y el ácido vanilil mandélico desarrollan color ámbar al ser tratados con el periodato de sodio, según lo comprobamos separadamente.
- d).- Cuantificación espectrofotométrica del vanilil.

### Técnica.-

- 1.- Se toma una alícuota de 10 ml. de orina y se filtra - si es necesario.
- 2.- Se transfiere la alícuota a un tubo de ensaye con tapón y se coloca en baño de agua hirviendo durante 20 minutos.

- 3.- Se deja enfriar y se ajusta el pH a 6.0 - 6.5 con hidróxido de sodio 1Normal, posteriormente se lleva a un volumen de 20 ml. con agua destilada.
- 4.- A la columna que ha sido previamente tapada con lana de vidrio, se le añade la resina para formar un lecho de 1 x 5 cm.
- 5.- La columna es lavada con 15 ml. de agua y se hace pasar la muestra hidrolizada a través de la columna, aproximadamente a una velocidad de 0.5 ml./minuto.
- 6.- Se lava la columna con 15 ml. a 20 ml. de agua.
- 7.- Se eluyen las metanefrinas con 10 ml. de hidróxido de amonio 4 Normal.
- 8.- Del eluido se toman dos alícuotas de 4 ml. cada una (servirán una como blanco y otra como problema), al blanco se le añaden 0.1 ml. de agua, al problema se le añaden 0.1 ml. de peryodato de sodio al 2%, se mezclan dejando reposar durante siete y medio minutos, al cabo de los cuales se les añaden 0.1 ml. de bisulfito de sodio, para estabilizar la reacción; dejando reposar durante un minuto.

9.- Leer en un espectrofotómetro a 360 mμ. directamente -  
la Densidad Óptica.

La lectura del blanco, se resta a la de los problemas  
y esta lectura corregida se transporta a la curva pa-  
trón.

Material y Reactivos.-

Columnas Cromatográficas (Kontes Glass Co. Vineland). N. J  
(Número de Catálogo K-4200).

Potenciómetro Beckman.

Espectrofotómetro Beckman DU.

**Tubos:**

Tubos de centrifuga de 40 ml. con tapón esmerilado.

Tubos de ensayo de 18 x 150 mm.

Vasos de precipitado.

**Pipetas:**

Pipetas serológicas de: 10, 5, 2 y 1 ml.

Pipetas Pasteur.

Probeta graduada de 25 ml.



Reactivos.-

Se utilizan reactivos P.E.U.

- 1.- Peryodato de sodio al 2%
- 2.- Bisulfito de sodio al 10%
- 3.- Acido Clorhídrico        6 Normal
- 4.- Hidróxido de Amonio    4 Normal
- 5.- Hidróxido de sodio     10 Normal
- 6.- Solución patrón de Metanefrina y Normetanefrina que -  
contenga cada una 100 mg/litro.
- 7.- Amberlita CG-50 (activada)

Nota.-

Las soluciones 1, 2 y 6 son estables durante seis se-  
manas a una temperatura de 3°C.

### Activación de la Amberlita.-

La Amberlita CG-50, es una resina de intercambio iónico que viene en forma ácida y con una finura tal que pase por tamiz No. 200. Se ha demostrado que a un pH de 6.2 -- 6.5, esta resina permite obtener el mayor grado de recuperación, ya que a este pH se adsorbe una mínima cantidad de pigmentos.

Para su activación se llevan a cabo los siguientes -- pasos:

- a).- La amberlita es suspendida en 3 volúmenes de agua destilada y agitada durante 10 minutos.
- b).- Se deja reposar 30 minutos y posteriormente se descarga la solución sobrenadante.
- c).- El paso "b" se repite unas cinco veces o hasta que el líquido sobrenadante sea claro (después de 15 minutos de reposo).
- d).- Antes de usarse, la resina es convertida a su forma sódica mediante el siguiente procedimiento: a la resina suspendida en tres volúmenes de agua, se le añaden

dos volúmenes de hidróxido de sodio 10 Normal, en un lapso de 15 minutos y con agitación constante que se continúa por espacio de dos horas.

- e).- Se deja reposar 15 minutos y se decanta el líquido - sobrenadante.
- f).- La resina es lavada por decantación varias veces con agua.
- g).- La resina se purifica aun más, convirtiéndola a su forma ácida con cinco volúmenes de ácido Clorhídrico 6 Normal.
- h).- Se agita por 30 minutos y el exceso de ácido se quita decantando varias veces con agua.
- i).- La resina es nuevamente convertida a su forma sódica según los pasos d, e, f.
- j).- La resina lavada y convertida a su forma sódica es suspendida en un volumen igual de agua y bajo agitación continua, se le agrega ácido acético glacial - para alcanzar un pH de 6.0 - 6.5.

La resina está lista para usarse, si el pH se mantiene constante durante 30 minutos de agitación continua.

### Material Estudiado.-

Las determinaciones se llevaron a cabo en recolecciones urinarias de 24 horas, obtenidas de sujetos sanos con edades que oscilaron entre 18 y 65 años. En el cuadro -- No. 1 se encuentran consignados los datos más importantes del grupo estudiado.

Esta recolección se realizó tomando en cuenta las siguientes condiciones dietéticas y ambientales:

Se prohibió la ingestión, cuando menos tres días antes de la recolección, de los siguientes alimentos: café, té, vainilla, chocolate, plátano, jitomate y nuez; así mismo se tuvo cuidado de que los sujetos que participaran en el estudio, no estuvieran bajo tratamiento médico de ninguna especie y que no hubieran recibido ningún tipo de medicamento, cuando menos una semana antes de la recolección de la orina.

Finalmente se tuvo en cuenta que no hubiese situaciones "estresantes" y conflictivas durante el período de recolección.

Todos los frascos en los cuales se recolectó la muestra eran de vidrio, empleándose como preservativo 20 mililitros de ácido Clorhídrico 6 Normal.

**CUADRO I**

**DISTRIBUCION DE LOS SUJETOS ESTUDIADOS**

**POS SEXOS Y DECADAS DE EDAD**

<b>Sexo</b>	<b>11 - 20</b>	<b>21 - 30</b>	<b>31 - 40</b>	<b>41 - 50</b>	<b>51- 60</b>	<b>61 ó mas</b>
<b>M</b>	4	20	3	2	2	0
<b>F</b>	4	10	5	5	7	2
<b>Totales</b>	8	30	8	7	9	2

### Preparación de la Curva Patrón.-

Se preparan soluciones tipo de Normetanefrina y Metanefrina de tal manera que 1 ml. sea igual a 100 gammas por ml. o sean 100 mgs./litro.

Puesto que se trata de determinar metanefrinas to tales la solución tipo empleada por nosotros se preparó mezclando partes iguales de estas soluciones, y como ya se citó antes, el ácido vanilil mandélico también da la coloración.

De la solución tipo se toman 2 ml. y se añaden 3 ml de agua destilada, quedando de esta manera una solución que contiene 40 gammas por cada ml.

De la solución que contiene 40 gammas por ml. se -- hacen unas nuevas diluciones de la manera siguientes:

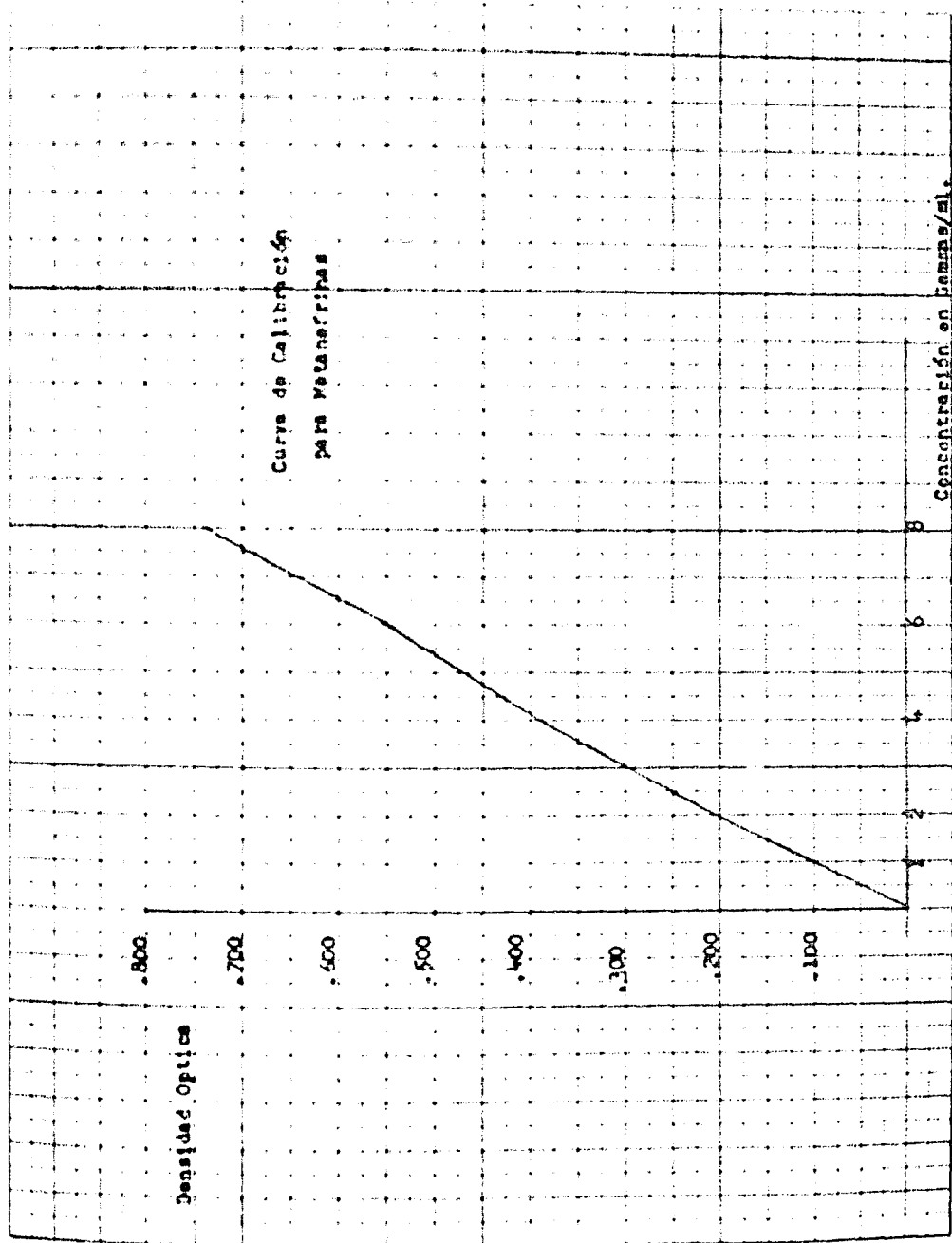
Solución diluída 40 gammas/ml.	Hidróxido de Amonio 4 Normal	Concentración en- gammas de meta- nefrinas por ml.
-----------------------------------	---------------------------------	--

0.0	4.0	0
0.1	3.9	1
0.2	3.8	2
0.4	3.6	4
0.6	3.4	6
0.8	3.2	8

A cada una de estas diluciones, se le añadió 0.1 -- ml. de peryodato de sodio, se mezclan se dejan reposar - siete y medio minutos, al cabo de los cuales se les añaden 0.1 ml. de bisulfito de sodio, dejar reposar durante 1 minuto.

Se leen a 360 mu. en Densidad Optica, obteniéndose- las lecturas anotadas en la gráfica siguiente.





### Recuperaciones.-

Se agregaron diversas concentraciones de patrón a -- 15 diferentes muestras de orina, a estas orinas se les había determinado previamente la cantidad de metanefrinas - presente en cada una de ellas, estas orinas fueron trabajadas de manera similar a los problemas y las recuperaciones obtenidas fueron en promedio de 95.4 % con cifras que oscilaron entre el 89.8 y el 100 %.

Originalmente las muestras eran recogidas con 20 ml. de ácido acético concentrado; posteriormente lo hicimos - con muestras tomadas en 20 ml. de ácido clorhídrico 6 N. y encontramos valores más elevados en un promedio de 100 gammas, por lo cual decidimos seguir usando este último que nos parece conserva mejor las metanefrinas.

En un principio las muestras de orina eran pasadas - directamente por la columna de adsorción, pero entonces - se retenían sustancias que estorbaban la elusión, en tanto que cuando diluímos la orina al doble con agua, se logró mejor y más pura elusión.

El tiempo de acción del peryodato de sodio influye en el desarrollo de la coloración; por lo cual es importante regularizar este factor. Nosotros establecimos como tiempo estándar 7.5 minutos, el cual es suficiente para un correcto desarrollo de color y en cambio evita sobrecoloraciones.

También comprobamos que el bisulfito de sodio requiere menos de un minuto para neutralizar completamente el exceso de yodato y por lo mismo estabilizar el color, por lo tanto la lectura fotocolorimétrica deberá hacerse al minuto de haber agregado el bisulfito.

La intensidad del color permanece estable, según comprobamos, por lo menos durante 15 minutos.

Los datos obtenidos en cada una de las muestras fueron los siguientes:

Muestra	Gamas añadidas	Gamas recuperadas	Recuperación %
1	30	27.6	92.2
2	30	28.5	95.0
3	30	27.9	93.0
4	40	39.4	98.7
5	40	38.8	97.2
6	40	39.9	99.9
7	40	37.1	92.7
8	60	59.2	98.6
9	60	54.6	91.6
10	60	60.0	100.0
11	80	73.4	91.7
12	80	71.8	89.8
13	80	80.0	100.0
14	80	77.1	96.4
15	80	76.2	95.3

**CAPITULO IV**  
**RESULTADOS**

## RESULTADOS

En la excreción urinaria de metanefrinas totales en el grupo de 33 mujeres sanas oscilaron los resultados entre 259 y 926 gammas en 24 horas.

El promedio fué de 451 gammas con una desviación estandar de  $\pm$  157.6 gammas. No se observó diferencia significativa con respecto a la edad.

En el grupo de 31 hombres sanos, la excreción osciló entre 245 y 795 gammas en 24 horas, siendo el promedio de 440 gammas con una desviación estandar de 152.3 gammas.

Haciendo una comparación con cada uno de los grupos y los resultados obtenidos entre ellos; puede verse que no existe diferencia significativa entre uno y otro sexo.

El promedio global de los 64 sujetos estudiados es de 446 gammas, con una desviación estandar de 153.8 gammas.

Como puede verse con una desviación estandar se abarca el 68 % de la población estudiada, en cambio con dos desviaciones estandar se abarca el 95 % de la población.

CUADRO II

RESULTADOS OBTENIDOS EN 31 SUJETOS DEL SEXO FEMENINO

No. de Caso	Nombre	Edad	Volumen	D.O. Corregida	Concentracion de metanefrinas totales en Gammas/vol.
1	M.CH.	72	470	.055	259
2	B.G.	43	1210	.024	288
3	E.O.S.	42	600	.048	290
4	C.C.D.	46	1215	.025	302
5	A.U.	17	470	.065	305
6	A.M.D.	35	1220	.025	305
7	G.B.	32	1050	.030	315
8	T.D.	31	900	.033	327
9	A.CH.	68	670	.050	335
10	D.U.	20	890	.038	338

CUADRO II

No. de Caso	Nombre	Edad	Volumen	D.O. Corregida	Concentración de metanefrinas totales en Gammes/vol.
11	C.B.	50	560	.062	347
12	O.R.	59	770	.045	347
13	B.A.	57	1430	.025	358
14	M.E.	30	1680	.022	369
15	T.U.	16	790	.047	371
16	C.D.	26	900	.048	432
17	S.R.	58	720	.062	446
18	T.D.	54	910	.050	455
19	E.H.	32	590	.080	472
20	C.R.	55	970	.049	475
21	E.V.	30	850	.056	476
22	E.S.	28	1400	.034	476



CUADRO II

No. de Caso	Nombre	Edad	Volumen	D.O. Corregida	Concentración de metanefrinas totales en Gammas/vol.
23	N.D.	18	975	.040	478
24	L.V.	24	640	.075	480
25	S.C.	26	445	.105	490
26	A.G.	27	1220	.044	537
27	G.Q.	43	1230	.045	553
28	G.G.	32	840	.066	571
29	R.D.	25	930	.062	576
30	M.L	24	735	.090	661
31	O.G.	25	1180	.060	708
32	D.D.	51	758	.107	824
33	C.S.	52	735	.126	926

Promedio = 451 gammas  
 ~ = 157.6  
 Mínima = 259  
 Máxima = 926  
 • = 25.71

CUADRO III

RESULTADOS OBTENIDOS EN 31 SUJETOS DEL SEXO MASCULINO

No. de Caso	Nombre	Edad	Volumen	D.O. Corregida	Concentración de metanefrinas totales en Gammas/vol.
34	J.S.	27	500	.049	245
35	L.U.	46	1020	.024	245
36	M.S.	20	825	.032	264
37	R.Q.	30	870	.032	278
38	L.S.	28	730	.040	291
39	J.I.	52	1170	.025	293
40	J.G.	24	1200	.025	300
41	M.A.	28	720	.042	302
42	J.S.	25	680	.049	333
43	M.G.	28	1010	.033	333

CUADRO III

No. de Caso	Nombre	Edad	Volumen	D.O. Corregida	Concentración de metanefrinas totales en Gammas/vol.
44	L.U.	19	970	.036	339
45	R.A.	26	1185	.030	355
46	E.Y.	28	520	.070	364
47	R.V.	26	650	.058	377
48	R.A.	25	660	.060	396
49	C.V.	26	1000	.040	400
50	M.R.	35	1230	.034	418
51	U.F.	34	1540	.028	431
52	M.O.	48	770	.060	462
53	R.B.	28	930	.052	483
54	R.M.	29	790	.063	497

CUADRO III

No. de Caso	Nombre	Edad	Volumen	D.O. Corregida	Concentración de metanefrinas totales en Gammas/vol.
55	M.G.	27	920	.058	533
56	R.G.	32	475	.114	542
57	E.L.	20	750	.075	552
58	C.Q.	29	1020	.055	561
59	V.U.	27	1170	.049	563
60	L.D.	53	730	.093	678
61	J.G.	27	1180	.060	708
62	M.L.	26	1120	.062	730
63	F.S.	18	810	.070	567
64	H.M.	26	1230	.078	795

Promedio = 440  
 ~ = 152.3  
 Mínima = 245  
 Máxima = 795  
 e = 26.86

## EXCRECIÓN URINARIA DE METANEFRINAS EN FEOCROMOCITOMAS

Durante la elaboración de esta tesis, se tuvo la oportunidad de cuantificar la excreción de metanefrinas totales en tres pacientes del sexo femenino, dos de ellas del Instituto Nacional de la Nutrición y la otra del Hospital Español. La existencia de feocromocitoma en estas personas fue comprobada quirúrgicamente.

En cada uno de estos casos hubo necesidad de hacer dilución de las muestras.

Los valores de metanefrinas totales obtenidas en cada una de ellas fueron los siguientes:

### 1.- M.A.Z.

Volumen urinario.- 750 ml.

D.O. Problema 0.625

D.O. Blanco 0.213

D.O. Corregida  $0.412 = 4.3 \times 2 = 8.6$  gammas/ml.

Concentración en Gammas/vol. = 16,450

2.- A.R.

Volumen urinario.- 1225 ml.

D.O. Problema 0.800

D.O. Blanco 0.179

D.O. Corregida 0.622

$0.622 \times 6.75 \times 2 = 13.5$  gammas/ml.

Concentración en Gammas/vol. = 16,942

3.- A.E.D.

Volumen urinario.- 820 ml.

D.O. Problema 0.700

D.O. Blanco 0.217

D.O. Corregida 0.482 = 5.15

$5.15 \times 2 = 10.3$  gammas/ml.

Concentración en Gammas/vol. = 8,446

A estos tres pacientes se les hizo también la determinación de Acido vanílico mandílico y Catecolaminas totales, cuyos métodos se describen a continuación.

Acido vanílico mandílico.-

Método de Stanley Gitlow modificado.

Normales:  $7 \pm 3$  mgs./vol de 24 horas.

Este método descrito de manera breve, consta de los siguientes pasos.

### 1.- Extracción.

Se hace con acetato de etilo, el extracto se acidifica a pH 3 y se evapora con corriente de aire en baño de agua a  $56^{\circ}\text{C}$ . Se usa corriente de aire para evitar reducciones.

### 2.- Coloración.

Se solubiliza el extracto en agua y se trata con reactivos que originan un colorante diazoado con p-nitroanilina y nitrito sódico.

### 3.- Lectura.

La coloración obtenida con los reactivos ya mencionados se lee en Fotocolorímetro a una longitud de onda de 600  $\mu$ , en  $\%$  de transmitancia.

## Catecolaminas totales.-

Método de Von Euler Modificado.

Normales: 20 a 80 gammas en 24 horas.

Este método consta de los siguientes pasos.

### 1.- Extracción.

Consiste en la purificación de la orina seguida de la precipitación de metales alcalinos y alcalinoterreos con B.D.T.A. La orina se decolora con ácido ascórbico. Centrifugando después.

### 2.- Adsorción en la Columna de Alúmina.

El sobrenadante de la centrifugación se pasa por la columna.

Se eluyen las catecolaminas totales con ácido acético.

### 3.- Desarrollo de color.

Se toma una alícuota del eluado y se le añade sulfato de zinc y ácido nítrico a reacción ácida, se calienta a ebullición y se le añade solución amortiguadora de acetato



de sodio, agregar agua oxigenada y el reactivo de color -- que es ferricianuro de Potasio. Dejar reposar tres minutos y leer en filtro 480 mμ.

Los resultados obtenidos para cada uno de ellos, fueron los siguientes:

1.- A.D.

Acido vanillil mandélico.- 17.75 mgs./vol.  
Catecolaminas totales.- 106.50 ~~Gamma~~s/vol.

2.- A.R.

Acido vanillil mandélico.- 24.85 mgs./vol.  
Catecolaminas totales.- 151.34 ~~Gamma~~s/vol.

3.- E.A.D.

Acido vanillil mandélico.- 17.71 mgs./vol.  
Catecolaminas totales.- 106.26 ~~Gamma~~s/vol.

## CALCULOS

Para el cálculo estadístico se emplearon las siguientes fórmulas:

### Media

$$M = \frac{\sum Y}{n}$$

$$M = \frac{28529}{64}$$

$$M = 446$$

$\sum Y$  = Suma de los valores obtenidos en cada muestra.

$n$  = Número de determinaciones.

### Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n - 1}}$$

$$s = \sqrt{\frac{1.491966}{63}}$$

$$s = \sqrt{23680}$$

$$s = 153.88$$

$d^2$  = Suma del cuadrado de las diferencias con respecto a la media.

Error estándar:

$$e = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$e = \frac{153.8}{8}$$

$$e = 19.23$$

**CAPITULO V**

**COMENTARIOS Y CONCLUSIONES**

## COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

### Comentarios.-

El promedio de excreción urinaria de metanefrinas totales en los casos clínicamente normales estudiados fué de  $446 \pm 309$  ~~gamm~~  $\mu$ , siendo diferente al informado por los autores en la técnica original, ya que el promedio reportado por ellos es de  $600 \pm 300$  ~~gamm~~  $\mu$ .

Esta diferencia se puede deber al tipo de alimentación de la población estudiada por ellos con respecto a la nuestra o bien a otros factores no dilucidados hasta el presente.

Un ejemplo importante de señalar y el cual pudo observarse durante la realización de este trabajo, fue la influencia de la eliminación de cierto tipo de alimentos de la dieta normal de los cuales se hizo mención al describir las condiciones de los sujetos estudiados, esto se debe a que dan reacciones falsas positivas por aumentar la coloración de la orina o intensificarse esta con la adición del peryodato de sodio.

Esto tuvimos oportunidad de comprobarlo con una persona normal que se le determinaron las metanefrinas totales - con las restricciones de dieta marcadas por nosotros y posteriormente se hizo la prueba después de ingestión de cinco plátanos y aproximadamente 100 gramos de cacahustes.

Con dieta se obtuvo un resultado de 282 gammas y con la ingestión de la comida de prueba citada se obtuvo un resultado de 1369 gammas.

Esto nos indica la importancia fundamental de la dieta previa a la prueba que estudiamos.

El pH ideal al que se debe de trabajar es de 6.0 - 6.5 pues si se trabaja a pH ya sea menor o mayor, la recuperación de metanefrinas es considerablemente más baja.

En las orinas oscuras se encuentran pigmentos que no se eliminan en los blancos comunes y saldrían elevados si se compararan con blancos de agua, fué por esto que en cada determinación hubo la necesidad de hacer blancos con orina.

Los mismos pigmentos coloridos presentes en algunas orinas dan absorción leyendo a una longitud de onda de 333 mu, por lo que se prefirió leer a una longitud de onda de 360 mu, para evitar la absorción de sustancias interferentes.

## Conclusiones.-

- 1.- Consideramos que la técnica de Pisano, cuya estandarización fue el objetivo principal del presente trabajo, reúne características que la hacen de gran utilidad -- para su uso rutinario. Efectivamente la reproductibilidad y escasas pérdidas inherentes al método encontradas por nosotros, nos permite esperar la obtención de resultados confiables.
- 2.- Las cifras normales encontradas por nosotros, fueron -- de 259 a 926, con promedio de 446 gammas.
- 3.- Creemos que la determinación de metanefrinas es una -- prueba definitiva para el diagnóstico clínico del feocromocitoma, pues en los casos estudiados encontramos -- que sufren una elevación considerable, hasta de varios miles de gammas.

Encontramos las siguientes cantidades:

Caso 1.- 16,450 gammas

Caso 2.- 16,942 gammas

Caso 3.- 8,446 gammas

Esto concuerda con el estudio quirúrgico de las personas cuyos resultados de metanefrinas fueron elevados.

- 4.- No encontramos diferencia significativa con respecto al sexo, ni a la edad de los sujetos estudiados; esto puede apreciarse al observar los cuadros en los que están anotados los datos correspondientes a cada uno de los sujetos estudiados.
- 5.- Se mencionó un ejemplo en el cual se vió el efecto de la ingestión de cacahuates y plátano, insistiendo por lo mismo en la importancia de la dieta previa.
- 6.- Se usó como preservativo el ácido clorhídrico 6 normal por obtenerse mejores recuperaciones de metanefrinas que usando ácidos más diluidos, esto se comprobó haciendo la misma determinación en orinas recolectadas en ácido clorhídrico y orinas recolectadas en otro tipo de ácido.
- 7.- 10 mililitros de las orinas en las cuales se van a determinar las metanefrinas son llevadas a un volumen de 20 mililitros con agua, antes de ser pasadas por la columna para evitar pérdidas, pues se observó que pasando la muestra directamente, la recuperación era menor y haciendo diluciones mayores la recuperación era la misma, por lo tanto la dilución ideal es de 20 ml.



8.- El tiempo durante el cual se deja reaccionar el periodato de sodio, es algo muy importante pues si se deja un tiempo menor se obtienen resultados bajos -- para las metanefrinas y tiempos mayores dan resultados más altos fue por esto que se decidió como tiempo ideal el de siete y medio minutos.

La estabilización de la reacción se logra mediante la adición del bisulfito de sodio y es completa en un minuto y estable por lo menos durante quince minutos.

**CAPITULO VI**  
**BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Häggendal.  
Newer developments in catecholamines assay.  
Pharmacol. Rev. 18: 325, 1966.
- 2.- Anton, A. H, Sayre, D.F.  
A study of the factors affecting the aluminum oxide trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines.  
J. Pharmacol. Exp. Therap. 138: 360, 1962.
- 3.- Funk C.  
Synthesis of dl-3-4 dihydroxyphenylalanine.  
J. Chem. Soc. 99: 544, 1911.
- 4.- Crout, J. R.  
Sampling and analysis of catecholamines and metabolites.  
Anesthesiology 29: 661, 1968.
- 5.- Pisano, J. J.  
A simple analysis for normetanephrine and metanephrine in urine.  
Clin. Chem. Acta 5: 406, 1960.
- 6.- Axelrod, J.  
The Metabolism, Storage, and Release of Catecholamines. Recent Prog. Hormone Res.  
21: 597, 1965.
- 7.- Kopin, I. J.  
Biosynthesis and metabolism of catecholamines.  
Anesthesiology 29: 654, 1968.
- 8.- Blaschko, H.  
The Development of Current Concepts of Catecholamine Formation.  
Pharmacol. Rev. 11: 307, 1959.
- 9.- Kaufman, S.  
Coenzymes and Hydroxylases; Ascorbate y Dopamine-beta-hydroxylase; Tetrahydropteridines and Phenylalanine and Hydroxylases.  
Pharmacol. Rev. 18: 61, 1966.

- 10.- Levitt, M. Spector, Sjoerdsma, A, Udenfriend, S.  
Elucidation of the Rate-Limiting Step in Norepinephrine in the Perfused Guinea-Pig. Heart.  
J. Pharmacol. Exp. Therap. 148: 1, 1965.
- 11.- Wurtman, R. J.  
Catecholamines. Medical Progress Series. New ---  
Engl.  
J. Med. Vol. 1: 67, 1966.
- 12.- Kirshner, N.  
Biosynthesis of Adrenaline and Noradrenaline.  
Pharmacol. Rev. 11: 350, 1959.
- 13.- Axelrod, J.; Inscoc, J. P. y Daly, J.  
Enzymatic Formation of O-methylated Dihydroxy --  
Derivatives from Phenolic Amines and Indoles.  
J. Pharmacol. Exp. Therap. 149: 16, 1965.
- 14.- Axelrod, J.  
The Formation, Metabolism, Uptake and Release of  
Noradrenaline. Eds Varley, H. y Gowenlock. A.H.  
The Clinical Chemistry of Monamines.  
Amsterdam, Elsevier Publish. Co; 5. 1963.
- 15.- Axelrod, J.  
The Enzymatic N-methylation of Phenylethanolami-  
ne Derivatives.  
Fed. Proc. 20: 236, 1961.
- 16.- Iverson, LL.  
Role of Noradrenaline uptake in a drenergic neu-  
rotransmission.  
Ciba Foundation.