

R. 10806



LOS METABOLITOS DE LAS CATECOLAMINAS EN LA FISILOGIA
Y DIAGNOSTICO DE LOS TUMORES DE LA CRESTA NEURAL



Trabajo presentado por D. Fernando
Vaquero Ruiz para optar al titulo
de Doctor

Director y padrino del trabajo

PROFESOR D. JOSE CRUZ AÑON

Catedratico de Patologia General de la
Facultad de Medicina de Sevilla

A large, stylized handwritten signature in black ink, consisting of several loops and curves.

En el año 1964 mi querido y admirado maestro el Profesor D. José Cruz Auñón vino como tantas veces a sentarse junto a nosotros y apoyando sus brazos en la mesa del Laboratorio nos habló de un enfermo que estaba hospitalizado en la Sala de S. Isidoro. Presentaba este enfermo síntomas de poseer un feocromocitoma, crisis hipertensivas, hiperglucemia en las crisis etc. Desde aquel día el estudio de las catecolaminas, su metabolismo y su degradación y sobre todo el interés clínico de estas sustancias fué desarrollado y expuesto ante nuestros ojos por él con una ciencia y maestría de sabio y con una paciencia y cariño de padre. Estas charlas al igual que otras que durante muchos años, todas las tardes, sin perder ni un solo día, nos hacia saborear sentados junto a las mesas de trabajo del laboratorio suscitaron en mi un enorme interés por la bioquímica y en este caso concreto por las catecolaminas.

Fuó D. José el que finalizados ya nuestros estudios de medicina nos mando a Gayoso y a mi a trabajar con el Dr. Kässer en el Tifenan Spital de Berna donde aprendimos las técnicas necesarias para la dosificación de las catecolaminas.

Por esto y por otras muchas, muchisimas cosas que hizo por nosotros, por enseñarnos a amar al enfermo con el corazón del Laboratorio, por abrir nuestros ojos al inmenso mundo de la bioquímica y por enseñarnos el porqué

del laboratorio y sobre todo el paraqué del laborato--
rio quiero expresarle mi mas profundo agradecimiento -
ya que sin su apoyo este trabajo de tesis no hubiera -
sido posible.

Mi agradecimiento tambien al Dr. Serrera Contreras gran
concedor de la bioquímica hormonal por su inestimable
ayuda en la realización de esta tesis. Tambien al Pro--
fesor Suarez Perdiguero que tan amablemente me ha sumi
nistrado la mayoria de los casos sobre los que se ha -
realizado esta tesis. En el mismo sentido agradezco --
tambien su colaboración a los profesores Sanchez de la
Cuesta, Aznar, Zarapico, Garcia Diaz, Gonzalez Meneses,
y Conde Hernandez.

LOS METABOLITOS DE LAS CATECOLAMINAS EN LA FISIOLOGIA
Y DIAGNOSTICO DE LOS TUMORES DE LA CRESTA NEURAL.

I N D I C E

	Pag. nº
JUSTIFICACION DEL PROBLEMA	1
<u>CAPITULO PRIMERO</u>	
BIOQUIMICA DE LAS CATECOLAMINAS	
Biosíntesis de las catecolaminas	
Embriología e histoquímica de la medula suprarrenal	3
Síntesis de las catecolaminas	5
Degradación de las catecolaminas	12
Almacenamiento de las catecolaminas	17
Interrelaciones bioquímicas	21
<u>CAPITULO SEGUNDO</u>	
Tumores derivados de la cresta neural	27
Clasificación	29
<u>CAPITULO TERCERO</u>	
MÉTODOS DE VALORACION DE LAS CATECOLAMINAS Y SUS DERIVADOS	30
Recogida de muestra	
Orina	30
Otros líquidos biológicos	32
Métodos de valoración	
Biológicos	33
Químicos	34

	Pag. nº
Colorimétricos	34
Con ultravioleta	36
Fluorimétricos	36
Método de valoración de la DOPA	37
Método de valoración de adrenalina y nora drenalina	39
Método de valoración de las metanefrinas	41
Métodos cromatográficos	45
Métodos electroforéticos	48
Métodos de valoración del ácido homovanilli nico (Fluorimétrico)	49
Métodos de valoración del ácido vanil man- dólico (Fluorimétrico)	51
<u>CAPITULO CUARTO</u>	
MÉTODOS EMPLEADOS	55
Condiciones de recogida de orina	55
Extracción	55
Cromatografía monodimensional en papel	56
Cromatografía bidimensional	61
Cromatografía en placa fina	62
Dosificación cuantitativa	65
<u>CAPITULO QUINTO</u>	
Material	69
<u>CAPITULO SEXTO</u>	
COMENTARIO Y DISCUSIÓN	72

CAPITULO SEPTIMO

CONCLUSIONES

LOS METABOLITOS DE LAS CATECOLAMINAS EN LA FISIOPATOLOGIA Y DIAGNOSTICO DE LOS TUMORES DE LA CRESTA NEURAL

JUSTIFICACION DEL PROBLEMA.-

El diagnóstico y la explicación de la fisiopatología de los tumores que pueden derivar de la cresta neural ha sido durante mucho tiempo difícil de realizar y de explicar.

Esta dificultad estriba primeramente en la gran variabilidad de signos clínicos que estos tumores producen, segundo en la gran cantidad de tumores de características diferentes que tienen el mismo origen, es decir la cresta neural, tercero el no muy completo conocimiento que se ha tenido de los diferentes pasos metabólicos de las catecolaminas desde su formación hasta su eliminación. El conocimiento de estos pasos, así como la aparición de métodos que permiten valorar cuantitativamente las catecolaminas y sus metabolitos, ha supuesto por tanto una gran ayuda en el difícil diagnóstico de estos tumores. Es más, podríamos decir que gracias a estos conocimientos y a estos métodos de valoración, podríamos hacer una "biopsia bioquímica de estos tumores y llegar así, casi con una completa seguridad, a su diagnóstico.

De aquí nuestro interés al presentar:

- A) En primer lugar un estudio detallado del metabolismo de estas sustancias dedicando especial atención a sus catobolitos.
- B) En segundo lugar, la descripción de los métodos con los que podemos valorar cuali y cuantitativamente estas sustancias dedicando un especial interés a las técnicas cromatográficas.
- C) En tercer lugar, nuestra experiencia en el empleo de estas técnicas que han sido utilizadas no solo para el diagnóstico de los tumores derivados de la cresta neural, sino también en el de otros procesos en los que existe alteración de estas sustancias.

CAPITULO I

BIOQUIMICA DE LAS CATECOLAMINAS

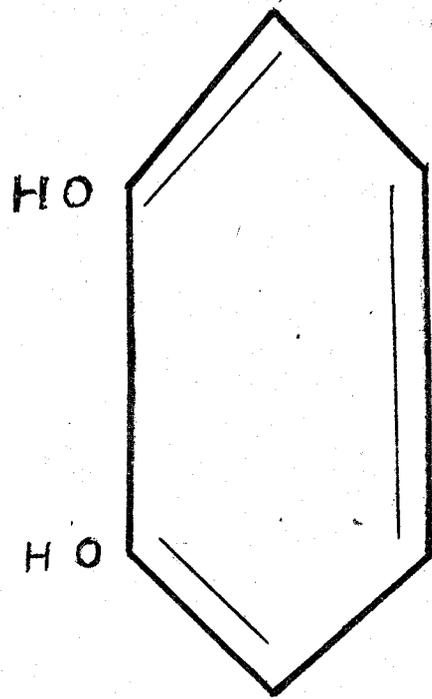
Se designa por catecolaminas a aquellas moléculas que poseen un núcleo central llamado catecol formado por un grupo fenólico con dos grupos OH en posición orto y que tienen además una cadena lateral con una función amina (Ver esquema).

BIOSINTESIS DE LAS CATECOLAMINAS.-

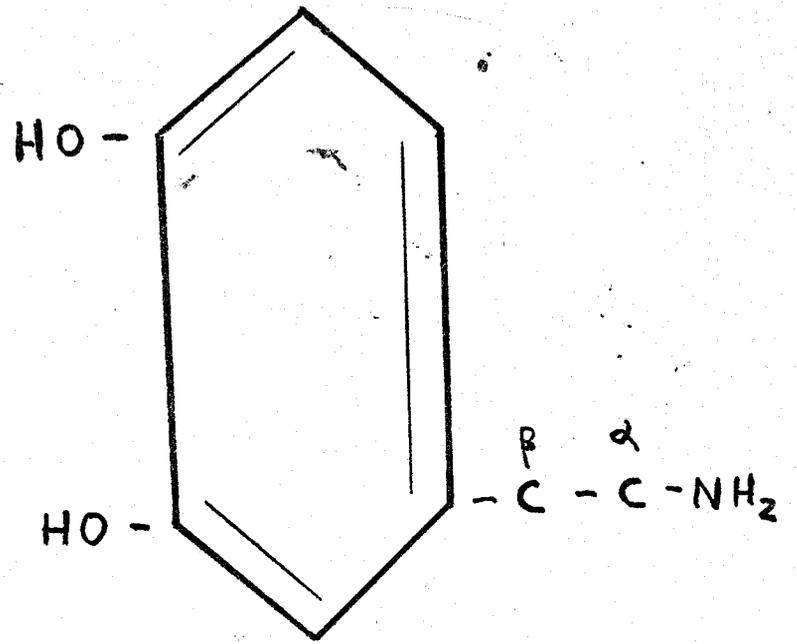
Para realizar el estudio de la biosíntesis de las catecolaminas es necesario en primer lugar tratar aunque sea muy someramente de la embriología y la histoquímica de la médula suprarrenal.

En 1.930 los estudios realizados por Von-Camperhout demostraron que el origen de la médula adrenal se encuentra a nivel de las crestas neurales unido a todo el sistema simpático. De las células paraganglionares que proliferan en cada metámera, solo subsisten las relacionadas con la formación del epitelio celómico, esbozo de la médula suprarrenal. La diferenciación de estas células se marcan por una propiedad tintorial que es la de ennegrecerse por las sales de cromo, de aquí el nombre de células cromafines dada por Kohn.

Blaschko, utilizando esta propiedad tintorial y la centrifugación diferencial, demostró que las catecolaminas, ennegrecidas por las sales de cromo se desplazaban hacia



CATECOL



CATECOLAMINA

la periferia de las mitocondrias donde existia muy poca actividad de la enzima caracteristica de las mitocondrias, la deshidrogenasa succínica. Al emplear la centrifugación con gradiente de sacarosa se aisló los gránulos que contenian las catecolaminas y se pudo comprobar su estructura. Estos gránulos tienen un tamaño de 500 a 6000 Å presentando en su centro unas particulas de 175 a 200 Å cuyo significado de acción aún se desconoce. Los gránulos tienen una membrana de 30 a 100 Å de espesor siendo permeable a los iones metálicos, a los glúcidos y a las catecolaminas y no siendolo a las proteinas. Dado que estos gránulos juegan un papel fundamental en la producción, secreción y almacenamiento de las aminos presoras, Hillarp demostró su estructura química que es como sigue:

Catecolaminas	6,7 %
Agua	68,5 %
Protsinas	11,5 %
Lipidos	7 %
Nucleótidos de la adenina	4,5 %

El 75% de estos nucleótidos estan formados por ATP el cual tiene una gran importancia para el almacenamiento de las catecolaminas.

La relación existente entre las moleculas de las catecolaminas y el ATP fué estudiada por Garret el cual expu-

-so de la siguiente manera: 1º las cargas negativas de los grupos fosfatos del ATP neutralizan los grupos básicos de las catecolaminas formandose un complejo ATP-catecolaminas. 2º Este complejo se estabiliza, bien por las lipoproteinas o bien por las proteinas hidrosolubles que están presentes en los gránulos. Esta estabilización, se produce al parecer por medio de dos puntos, por los grupos amínicos y por los grupos hidroxilos según prueban los estudios realizados con espectros de resonancia magnética nucleares.

El complejo ATP-catecolaminas es soluble en agua y difusible a través de la membrana de los gránulos, pero cuando se une a las proteinas ya no es difusible. Ahora bien, este modo de almacenamiento no es único, como demostró Hillarp en 1960 ya que al existir un exceso de aminas en relación con las moléculas de ATP como la lisis osmótica es incapaz para extraer mas del 80% de los gránulos medulares se admite que una fracción de las catecolaminas insolubles en el agua serian fijadas por los lípidos y lipoproteinas. Por lo tanto existen por lo menos dos tipos de almacenamiento, el mas importante formado por un complejo ATP catecolaminas-proteinas y el menos importante el que no contiene ATP.

SINTESIS DE LAS CATECOLAMINAS.-

El interes por estos problemas es antiguo y así en 1906

Holle intentó buscar el punto de partida de esta síntesis incubando la suprarrenal con tirosina pero se encontraba con impresión de métodos que fueran capaces de medir pequeñas cantidades de adrenalina y noradrenalina. Fué en 1938 cuando Blaschko a partir de los trabajos -- de Holtz formuló el esquema que aún sigue vigente y es el considerado, con muy escasas modificaciones, como -- el más probable, según se ha demostrado con métodos radiactivos usando moléculas marcadas con C_{14} . Este esquema es el siguiente:

Las catecolaminas proceden de la tirosina, la cual a -- su vez procede de la Fenil alanina. El paso de la Fenil alanina a tirosina necesita para su desarrollo la presencia de un oxígeno molecular, con lo que se lleva a -- cabo la llamada hidroxilación de la Fenil alanina. Esta hidroxilación puede efectuarse en posición orto, en posición meta, o en posición para, según representamos en la figura de la página siguiente.

De las tres posiciones la que representa un verdadero interés fisiológico es la posición para que da lugar a la p-tirosina. El enzima que cataliza esta hidroxilación es la fenil alanin-4-hidroxilasa, que aunque es específica de la fenil alanina, puede oxidar el triptofano en 5-OH-triptofano.

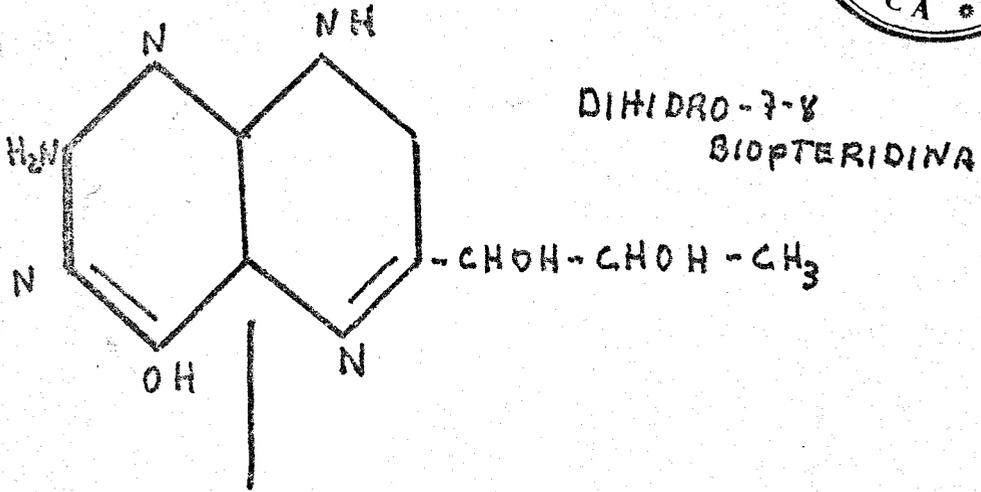
Hoy día se cree que esta reacción enzimática no es debi-

-da a una sola reacción sino que por lo menos son dos en-
zimas los que actúan, y así se sabe, por experiencias --
realizadas en hígado aislado de rata, que existe una hi-
droxilasa la cual en presencia de dos átomos de oxígeno
fija uno de ellos en la fenil alanina, mientras que el -
otro oxígeno forma agua gracias a un donador de hidrógeno
conocido como una pteridinatetrahidrogenada formándose --
así una pteridina dihidrogenada. Esta última pteridina,
en una segunda intervención enzimática, realizada por -
la dihidropteridínreductasa en presencia de NADPH, H, vol-
vería a su primitiva forma de pteridinatetrahidrogenada
según se indica en el esquema de la página siguiente:
De la Tirosina así formada se derivan productos de inne-
gable importancia tales como:

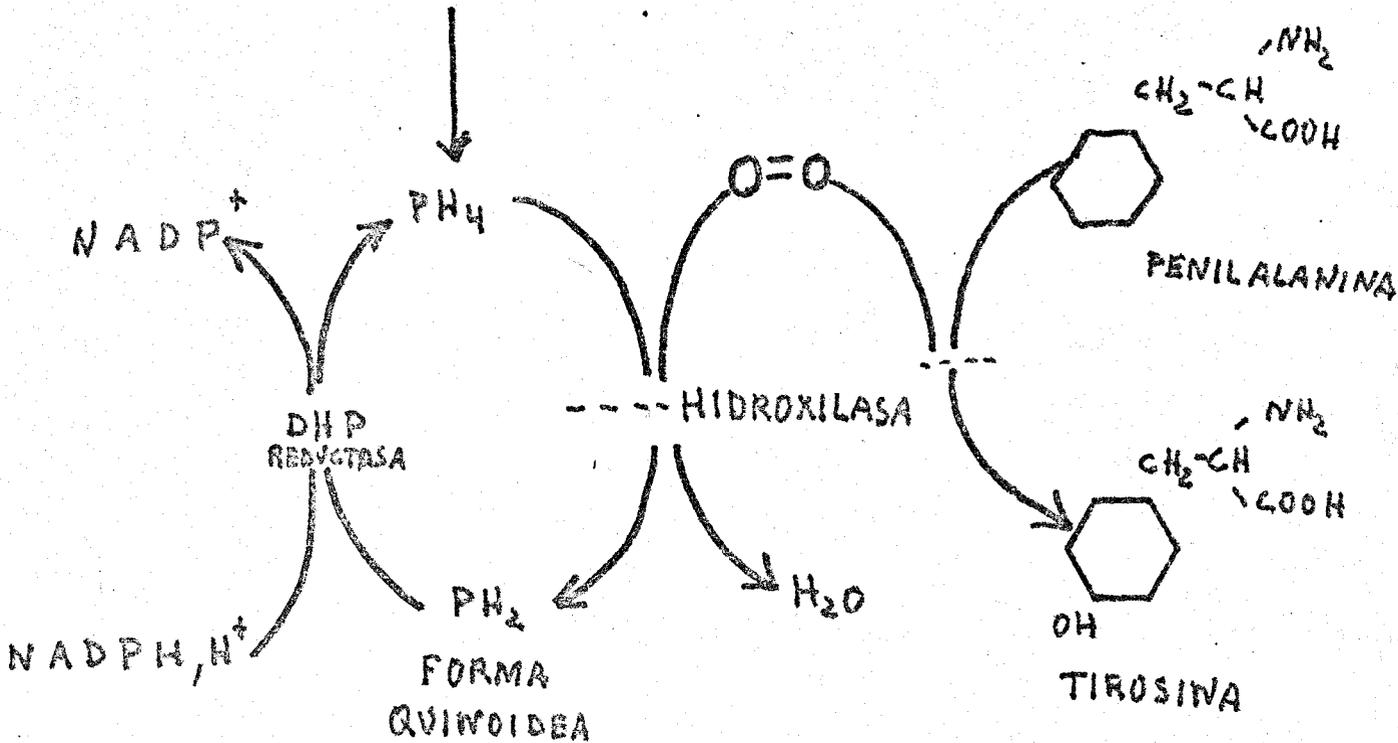
- A.- Las hormonas tiroideas
- B.- Las catecolaminas
- C.- Los pigmentos melánicos

Solo nos preocuparemos aquí en un primer lugar, de los -
pasos metabólicos que dan lugar, a partir de la tirosina
a la formación de las catecolaminas. Mas tarde tratare--
mos algo de los pigmentos melánicos y de la patología --
que puede existir por la alteración de esta formación.

X Una vez formada la tirosina a partir de la fenil alani-
na, esta sufre una oxidación, formándose así una dihidro-
xi-3-4-fenil alanina o DOPA. La reacción esta catalizada
por la tirosinhidroxilasa, enzima descubierta en el año



DHF- REDUCTASA



OXIDACION ENZIMATICA DE LA PENILALANINA EN TIROSINA

1960 por Nagatsu y Levitt. Necesita para su acción de la presencia de un factor de naturaleza pteridinica a semejanza de lo que ocurra en la oxidación de la fenilalanina. El lugar o lugares de esta reacción son los siguientes: médula suprarrenal, tejidos de inervación simpática y en el cerebro. La localización del enzima en la célula se cree que es intragranular aunque esto es todavía discutido.

El siguiente paso se trata de una descarboxilación producida en la cadena lateral bajo la acción de una descarboxilasa, la dopadescarboxilasa, produciendose así la dihidroxifeniletilamina o dopamina. Este enzima descubierto por Hóltz en 1939 necesita como cofermento el fosfato de piridoxal, y su localización es extragranular.

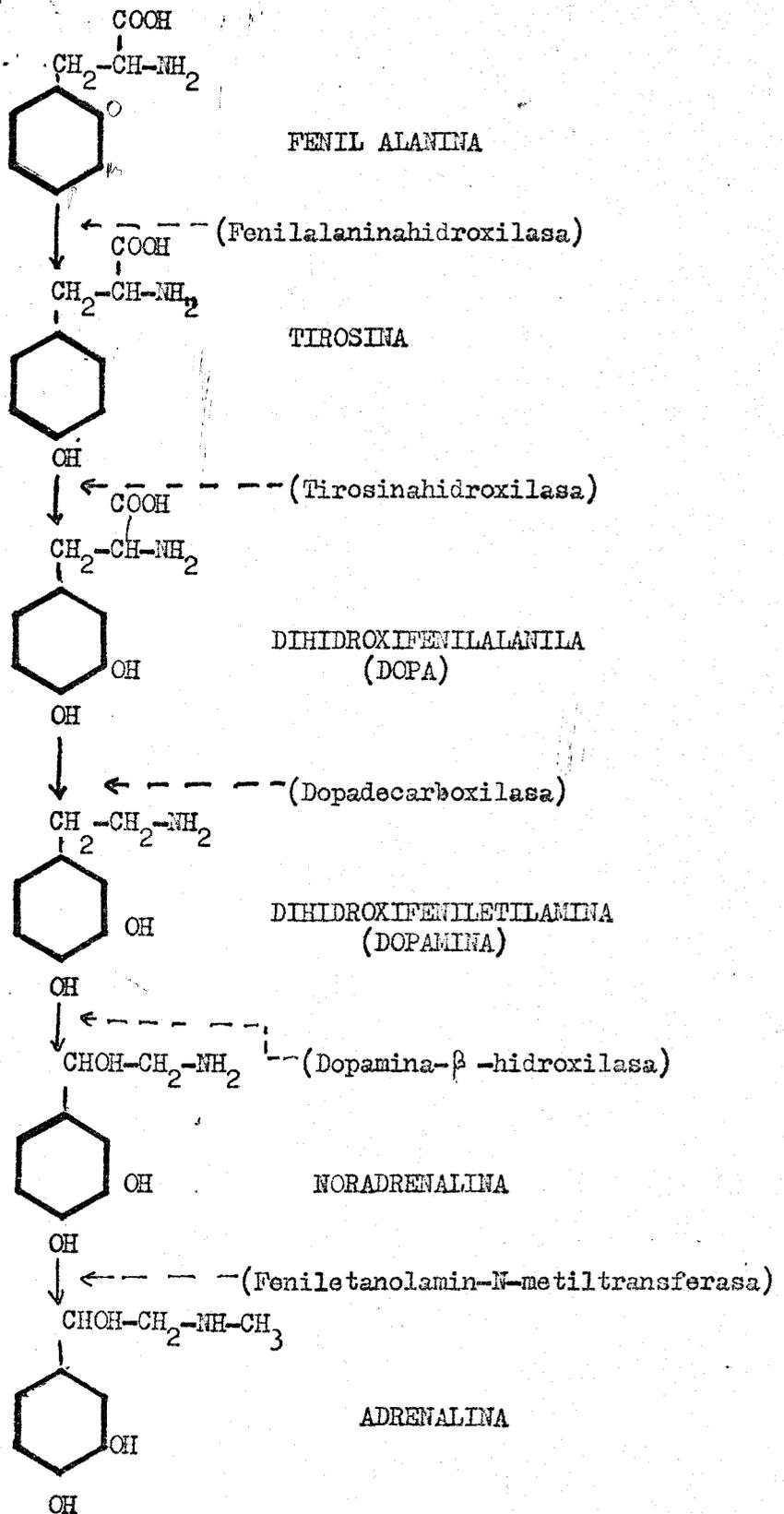
La dopamina así producida sufre una oxidación en el carbono beta de su cadena lateral produciendose la dihidroxifeniletanol amina o Noradrenalina. El enzima que actua en este caso es la Dopamin-beta-oxidasa la cual se encuentra en gran cantidad, tanto es así, que solo en 15" es capaz de formar toda la adrenalina de la glándula. Para esto necesita de vitamina C, de O_2 , de ácido fumarico y de ATP. Su actividad se encuentra disminuida en la enfermedad conocida como disautonomía familiar.

Por último bajo los efectos catalíticos de la fenil-etanolamin-n-metiltransferasa y siempre actuando sobre la -

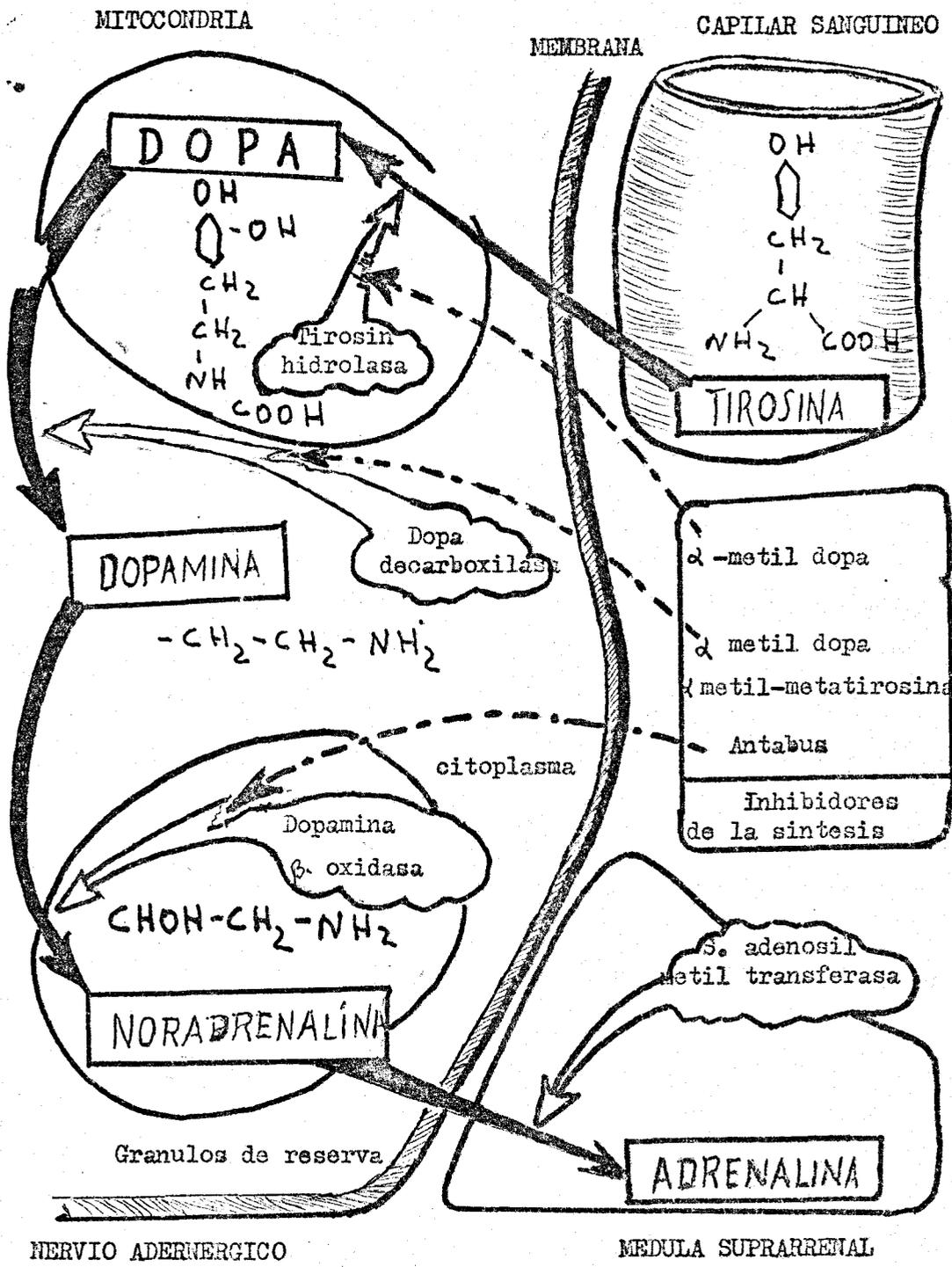
cadena lateral se produce una metilación actuando de donador la s-adenosil metionina, produciéndose así la --- adrenalina . Este enzima fué aislado por Kischner y colaboradores en 1957 y estudiada mas tarde por Axelrod. Es practicamente específica de la médula suprarrenal puesto que solo se ha encontrado ligerisimas cantidades en el - corazón y en el cerebro.

Este enzima puede actuar tambien sobre un importante grupo de aminas secundarias y así se ha podido descubrir la presencia de una catecolamina llamada la n-metil-adrenalina. Es curioso observar que la actividad de este enzima puede ser inhibida por su propio producto de reacción, es decir, por la adrenalina y por su propio sustrato, es decir, la noradrenalina, lo que prueba que tanto el sustrato como el producto poseen una capacidad reguladora. La presencia de este enzima en territorios distintos de la médula, como lo prueba la formación de adrenalina en ratas suprarrenectomizadas explica la existencia de - feocromocitomas fuera de la glándula suprarrenal.

De todas estas sustancias antes nombradas, son tres a - las que se le reserva el nombre de catecolaminas; la adrenalina, producida en sus cuatro quintas partes en la mé - dula suprarrenal, la dopamina y la noradrenalina, tam - bien sintetizadas en la médula y ademas en el cerebro y - en las terminaciones simpaticas donde se produce tambien adrenalina.



BIOSINTESIS DE LAS CATECOLAMINAS



BIOSINTESIS DE LAS CATECOLAMINAS

.DEGRADACION DE LAS CATECOLAMINAS.-

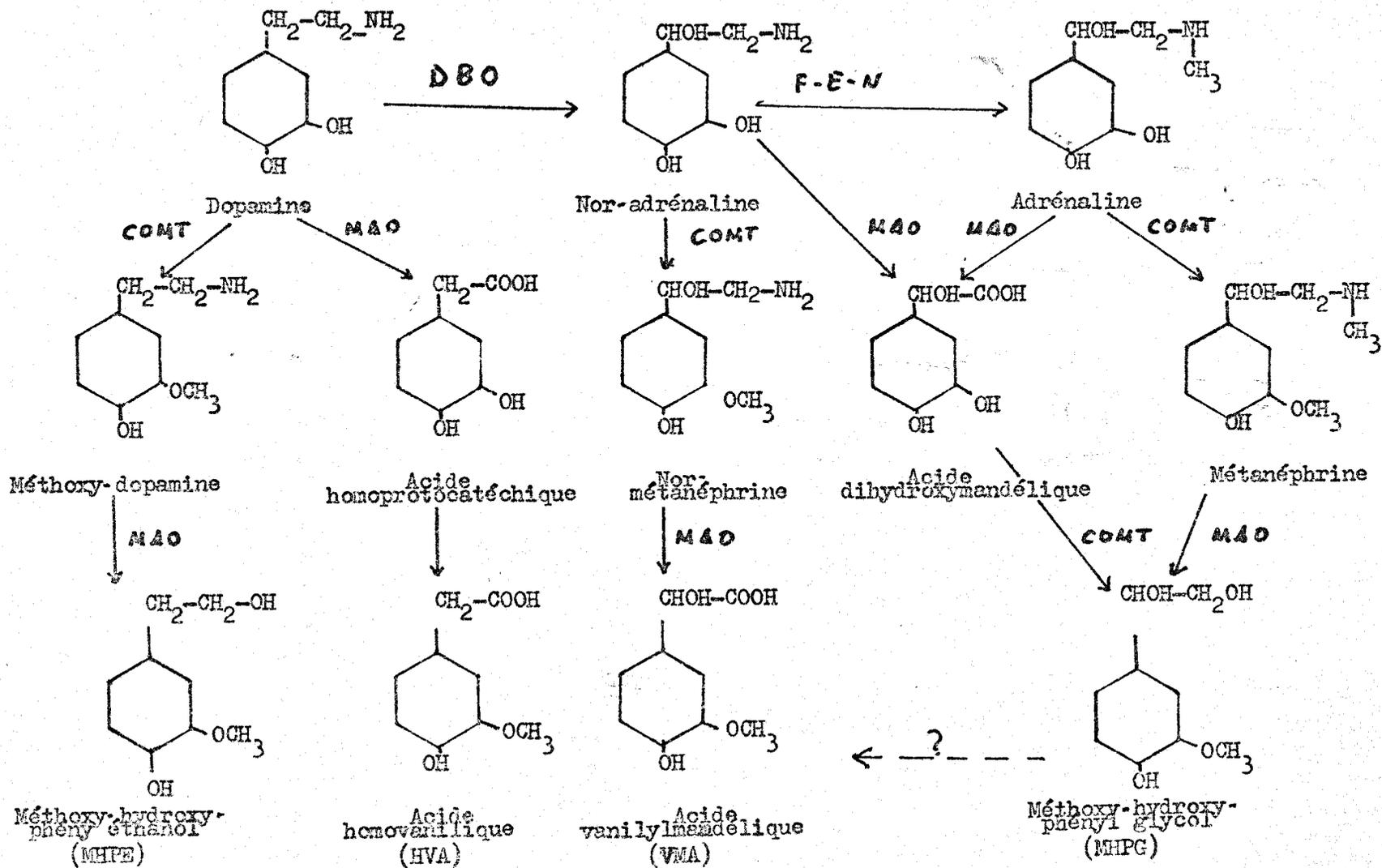
Los principales estudios realizados sobre la degradación de estas sustancias son debidas a Armstrong y MacMillan de cuyos estudios formuló Axelrod el esquema de las principales vias del catabolismo de las catecolaminas, según esquema que reproducimos en la pagina siguiente.

La dopamina puede sufrir dos acciones enzimaticas, una a cargo de la COMT que efectua una 3-Oxi metilación, transformando la dopamina en metoxidopamina y otra a cargo de la MAO que provoca una desaminación oxidativa en la cadena lateral dando lugar al ácido homoprotocatequico.

La metoxidopamina es ahora atacada por la MAO y sufre una desaminación oxidativa transformandose en 3-metoxi-4OH-fenil etanol. Por su parte el ácido homoprotocatequico sufre la acción de la COMT dando lugar al ácido homovanillínico por una oxi-metilación en el carbonò 3. De estas dos enzimas la que tiene una actividad más potente sobre la dopamina es la MAO que encuentra aquí su mejor sustrato.

Sobre la Noradrenalina y adrenalina actuan tambien alternativamente las dos enzimas antes reseñadas. La COMT y la MAO.

La noradrenalina ademas de su transformación en adrenalina debido a la acción de la enzima antes reseñada, la



DEGRADACION DE LAS CATECOLAMINAS

fenil-etanolamin-N-metil transferasa es atacada por la MAO y por la COMT, se cree que la MAO puede actuar primero transformando la noradrenalina y la adrenalina en el ácido dihidroximandelico. Sobre este ácido actua la COMT y por la 3-OXI-metilación la transforma en 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol, que se excreta por la orina en pequeña cantidad. Por su parte la COMT tambien actua sobre la noradrenalina oximetilandola y transformandola en nor-metanefrina sobre la cual actua la MAO dando lugar al ácido vanil-mandelico (3-metoxi-4hidroxi-fenil acético) que se excreta por la orina.

Ya hemos mencionado la actuación de la MAO sobre la adrenalina, sobre ella tambien actua la COMT transformandola en metanefrina sobre la que actua la MAO dando lugar al MHFG el cual por una posible actuación de un O_2 (los pasos metabólicos no son aún bien conocidos) da lugar tambien al AVM.

Otra importante sustancia que aparece en la orina es el ácido vanillactico que procede directamente de la dopa sobre la que actuan tambien las dos enzimas la COMT y la MAO.

Por acción de la MAO la Dopa se transforma en el ácido 3-4 dihidroxifenilactico y este por la acción de la COMT en ácido vanillactico. Por acción de la COMT la dopa se transforma en 3metoxi-4 hidroxi-fenil alanina, sobre la que actua la MAO produciendo el ácido vanilpirúvico, el

.cual por una hidrogenación en la cadena lateral da lugar también al ácido vanilláctico según el esquema que reproducimos en las páginas siguientes.

La falta de especificidad ya reseñada anteriormente, de muchas de las enzimas que actúan en el metabolismo de las catecolaminas, hace posible que existan también otras vías secundarias, que dan lugar también a los mismos productos dopamina, adrenalina y noradrenalina. No obstante se cree que solo en el caso de que la vía principal esté alterada, la vía secundaria tomaría importancia.

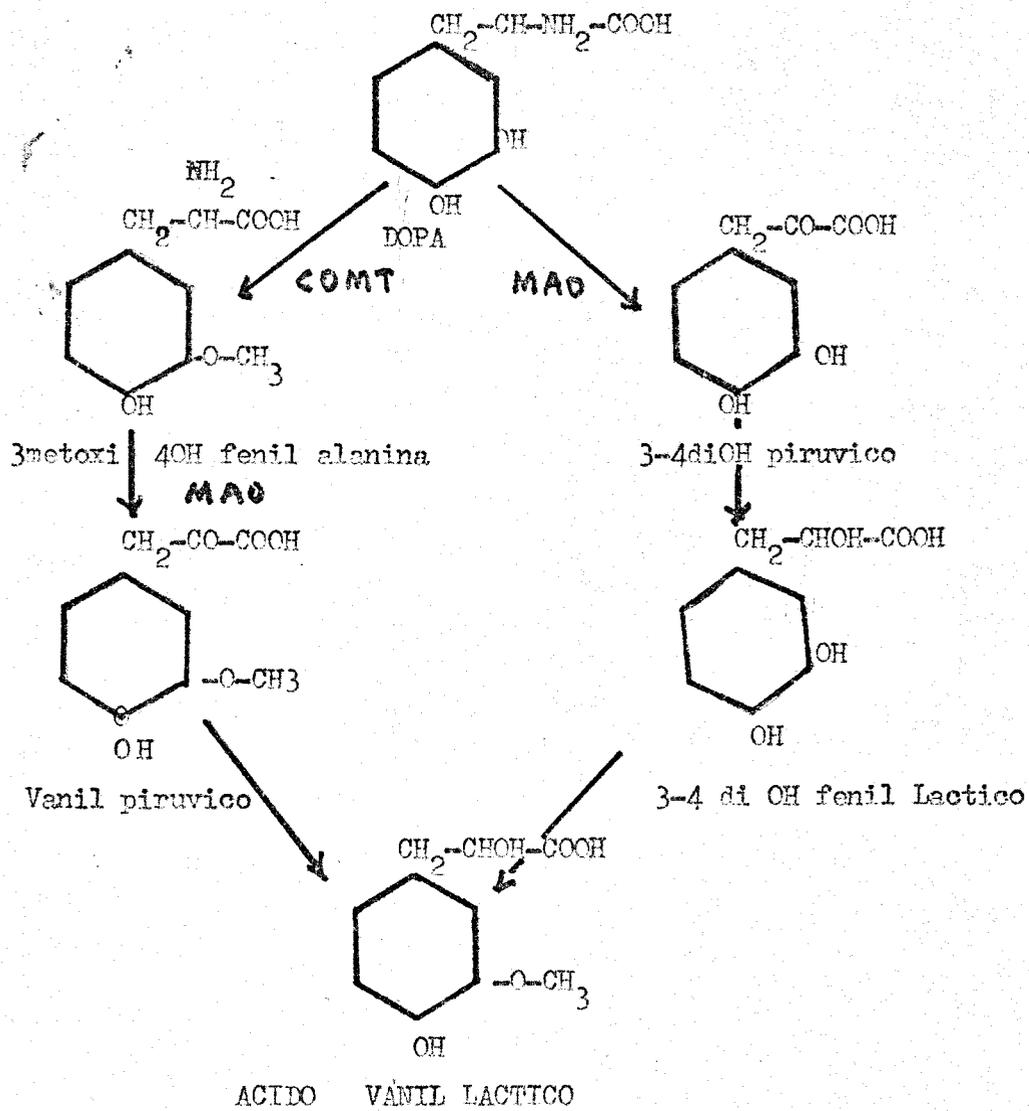
Estas vías secundarias serían las siguientes (Esquema en páginas siguientes).

Como ya sabemos la p-tirosina por acción de una descarboxilasa se transformaría en p-tiramina. Ahora bien, esta sustancia puede sufrir: a) La acción de la MAO dando lugar al ácido p-OH fenil acético que se excreta por la orina. b) Una oxidación, llevada a cabo bajo la acción de una betahidroxilasa, del carbono beta de la cadena lateral dando lugar a la octopamina que puede ser metilada sobre el carbono alfa y dar lugar así a la sinefrina.

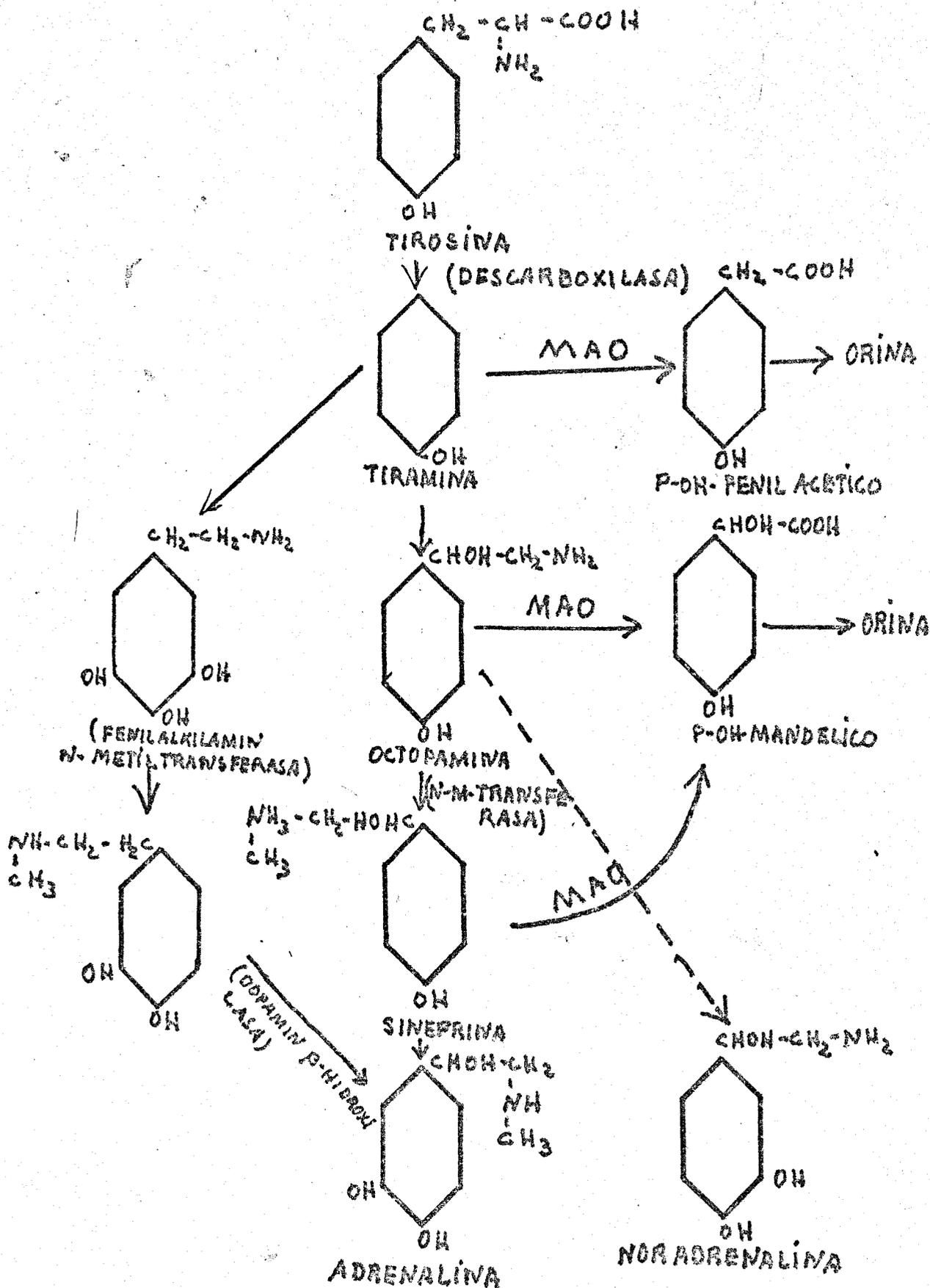
Tanto la octopamina como la sinefrina por la acción de la MAO dan lugar al ácido p-OH-mandélico que se excreta por la orina.

La tiramina puede a su vez ser atacada por la tiramin-hidrolasa y dar lugar a dopamina. La dopamina sufre la acción de la fenilalkilamin-N-metil-transferasa y dar lugar a la

FORMACION DEL ACIDO VANILLACTICO



VIAS SECUNDARIAS DE SINTESIS DE LAS CATECOLAMINAS



epinina que por la acción de la Dopamin-beta-hidrolasa se transforma en adrenalina.

La noradrenalina también puede ser obtenida por esta vía secundaria y así a partir de la actopamina y por la acción sobre esta de una hidroxilasa se obtiene la noradrenalina.

ALMACENAMIENTO DE LAS CATECOLAMINAS.-

El capítulo que ha despertado quizás más interés ha sido el almacenamiento de las catecolaminas.

Las catecolaminas que han sido secretadas siguen tres destinos antes de ser metabolizadas.

- 1) Una parte es metabolizada por órganos de nuestra economía como, bazo, riñones, y sobre todo el hígado, órgano muy rico en COMT. Esta distribución depende de dos factores: primero, el porcentaje de perfusión sanguínea que recibe el órgano, así por ejemplo se sabe que el corazón de rata recibe el 2,38 por ciento del débito cardiaco fijando el 1,75 por ciento de una descarga de catecolaminas; en
- 2) segundo lugar de la riqueza del órgano en terminaciones simpáticas. Solo hay dos excepciones y son el cerebro, que aunque está muy irrigado, debido a la protección de la barrera hematomeningea fija en escasa proporción las catecolaminas, la otra excepción es el útero que aunque es muy pobre en terminaciones simpáticas fija una gran cantidad de catecolaminas.

- 3) Otra parte, la más importante, es captada por las ter---

-minaciones nerviosas del sistema nervioso simpatico.

Otra parte, muy pequeña es eliminada directamente por la orina.

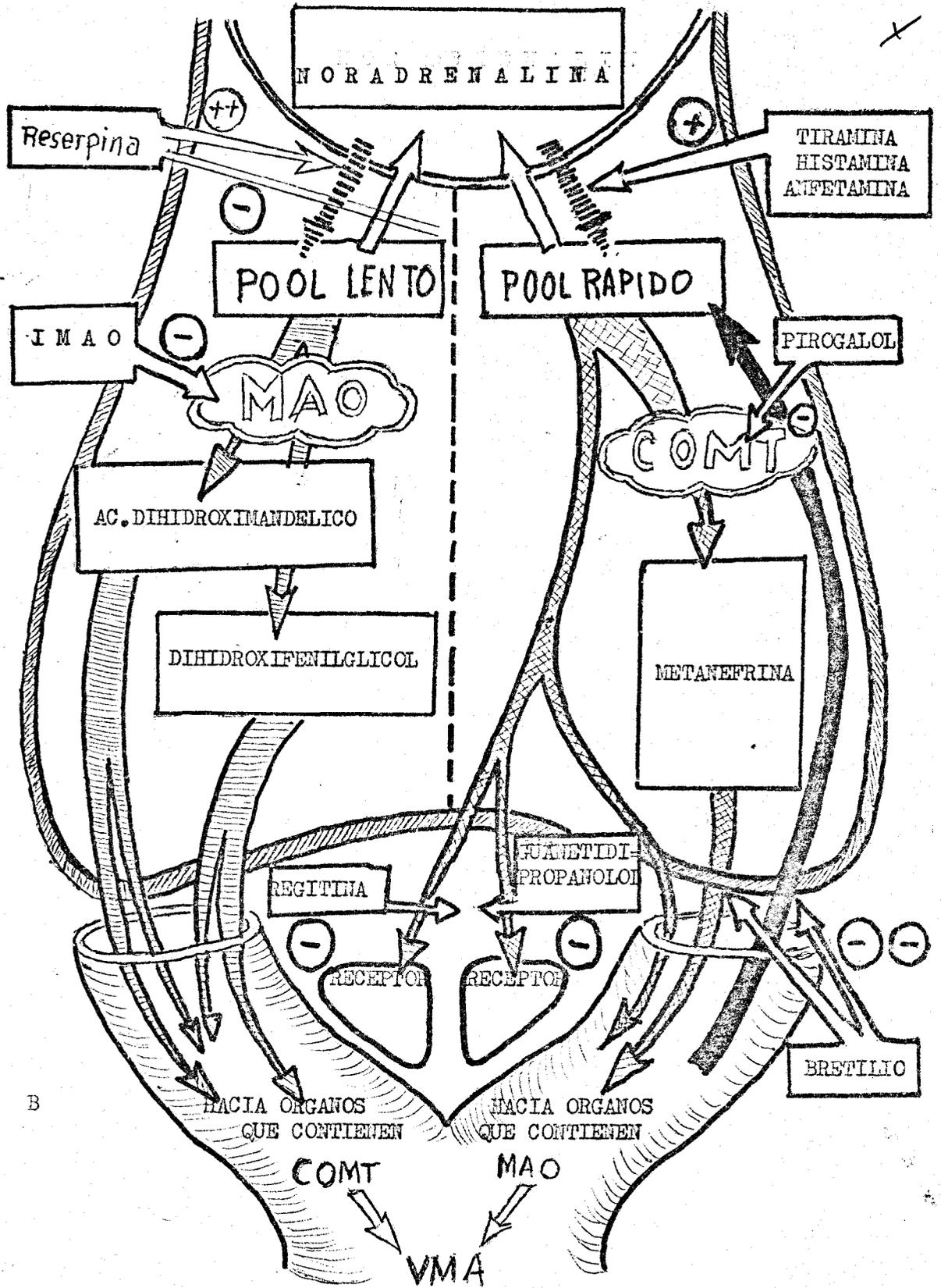
• Dentro de los tejidos las catecolaminas siguen dos direcciones: una dirección de liberación y otra de almacenamiento.

La dirección de liberación va desde los gránulos de almacenaje al citoplasma, desde allí pasando por la membrana sinaptica del nervio llegan al espacio intersinaptico y desde allí al receptor. (Figura página siguiente)

La dirección de almacenaje es la inversa de la de excreción.

El almacenamiento puede ser de dos tipos:

a) Un "pool" rapido, con una vida media de 2 horas, que puede ser movilizado rapidamente por alguna influencia extraña como estímulos simpáticos, administración de histamina, anfetaminas, tiramina etc. (Este es el fundamento del test de la histamina para el diagnóstico de los feocrocitomas) Cuando se inicia esta liberación desde los gránulos de almacenaje, en el citoplasma es metabolizada por la COMT en sus productos de degradación, metanefrina y normetanefrina, que pasan al hígado donde por la acción de la MAO se convierten en AVM. Una parte de este ácido es conjugada por el hígado y otra se elimina por el riñon. Otra parte de metanefrina pasa la membrana sinaptica. para la que nece-



CATECOLAMINAS HISTICAS

-sitan ATP y C y acetilcolina. Este paso puede ser blo-
queado por la reserpina, el bretilio y la guanetidina.

Una vez en el receptor ejercen su acción sobre los re-
ceptores alfa o beta. Estos receptores pueden ser blo-
queados por simpaticolíticos como, la regitina en los ca-
sos de los receptores alfa y como el propanolol en el ca-
so de los beta.

b) Un pool lento el cual no es movilizable por las ami-
nas antes reseñadas y que al tomar el camino de la li-
beración desde los gránulos de almacenaje pasan al ci-
toplasma donde la mayoría por acción de la MAO pasan
a DHMA y DHFG estos son mas tardes transformados por-
la COMT en ácido vanil mandélico AVM. Una pequeña par-
te de DHMA y DHFG pasan a la sangre. Los inhibidores -
de la MAO por tanto provocan una acumulación de cateco-
laminas en los tejidos, acúmulo que si se elimina brus-
camente puede causar graves accidentes hipertensivos.
La fenilamina que inhibe el almacenamiento y la reser-
pina que destruye los gránulos de almacenaje provocan-
do una deplección de las catecolaminas son potentes hi-
potensores.

Si bien todas las sustancias que hemos visto en el es-
tudio del catabolismo de las catecolaminas pueden ser
demostradas en la orina, solo algunas son eliminadas en
cantidad suficiente para una posible dosificación cuan-
titativa. Nos referimos a las siguientes: Acido Vanil

Mandelico (AVM), Acido Homovenillínico (AHV), Acido Vanil
láctico (AVL), Metanefrina, 3metoxi-4hidroxi-fenil gli-
col (MHFG), parahidroxifenilacetico (PHFA), Orto Hidroxi
fenilacetico (OHFA) etc.

INTERRELACIONES BIOQUIMICAS.-

Antes de introducirnos en el capítulo de los tumores de-
rivados de la cresta neural, no queremos dejar de decir
algo de las interrelaciones bioquímicas de los procesos
de anomalías en el metabolismo de la Tirosina, ya que --
con los metodos que hemos empleados para la dosificación
de los metabolitos de las catecolaminas, es posible tam-
bien el dosificar sustancias de gran interés en el estu-
dio del catabolismo de la tirosina tales como el ácido -
parahidroxifenil acetico y ácido orto hidroxifenil acéti-
co entre otros.

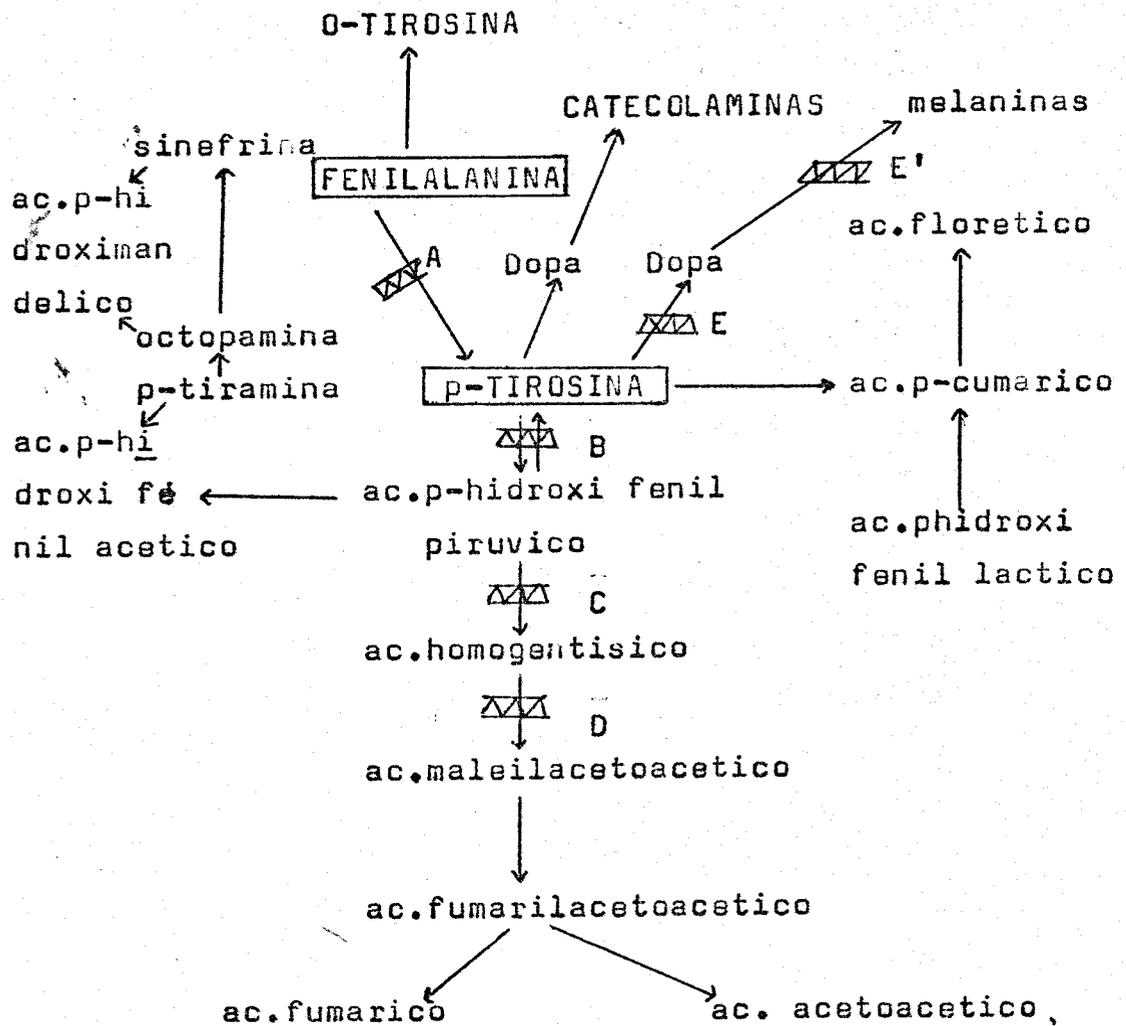
Los enzimas mas importantes en el catabolismo de la tiro-
sina son:

a) La fenil alanil 4 hidroxilasa, que como ya hemos dicho
actua en el paso de fenil alanina a p-tirosina.

En el deficit de este enzima la fenil alanina se trans-
forma en orto tirosina la cual sufre una descarboxila-
ción transformándose en orto tiramina. la ortotirami-
na por acción de la MAO sufre una descarboxilación oxi-
dativa transformándose en el ácido ortohidroxifenil --
acético. (Esquema en pagina siguiente).

Enun sujeto normal se produce siempre algunas canti-

LOCALIZACION DE LAS ANOMALIAS ENZIMATICAS EN EL
METABOLISMO DE LA TIROSINA



A.- Fenil alanil 4' hidroxilasa

B.- Tirosin amino transferasa

C.- p-Hidroxifenil piruvato hidroxilasa

D.- Homogentisato oxigenasa

E.- Modificación de la actividad de la tirosinasa (Albinismo).

-dades de OHFA pero en los enfermos afectos de fenil cetonuria este ácido esta aumentado. No obstante se cree que el aumento de este ácido no solo es debido a la desaminación de la tiramina, sino que tambien previene, y en algunos casos en gran cantidad, del ácido fenil piruvico por efecto de la misma p-hidroxifenil piruvato hidroxilasa que transforma el ácido fenil piruvico en ácido homogentisinico.

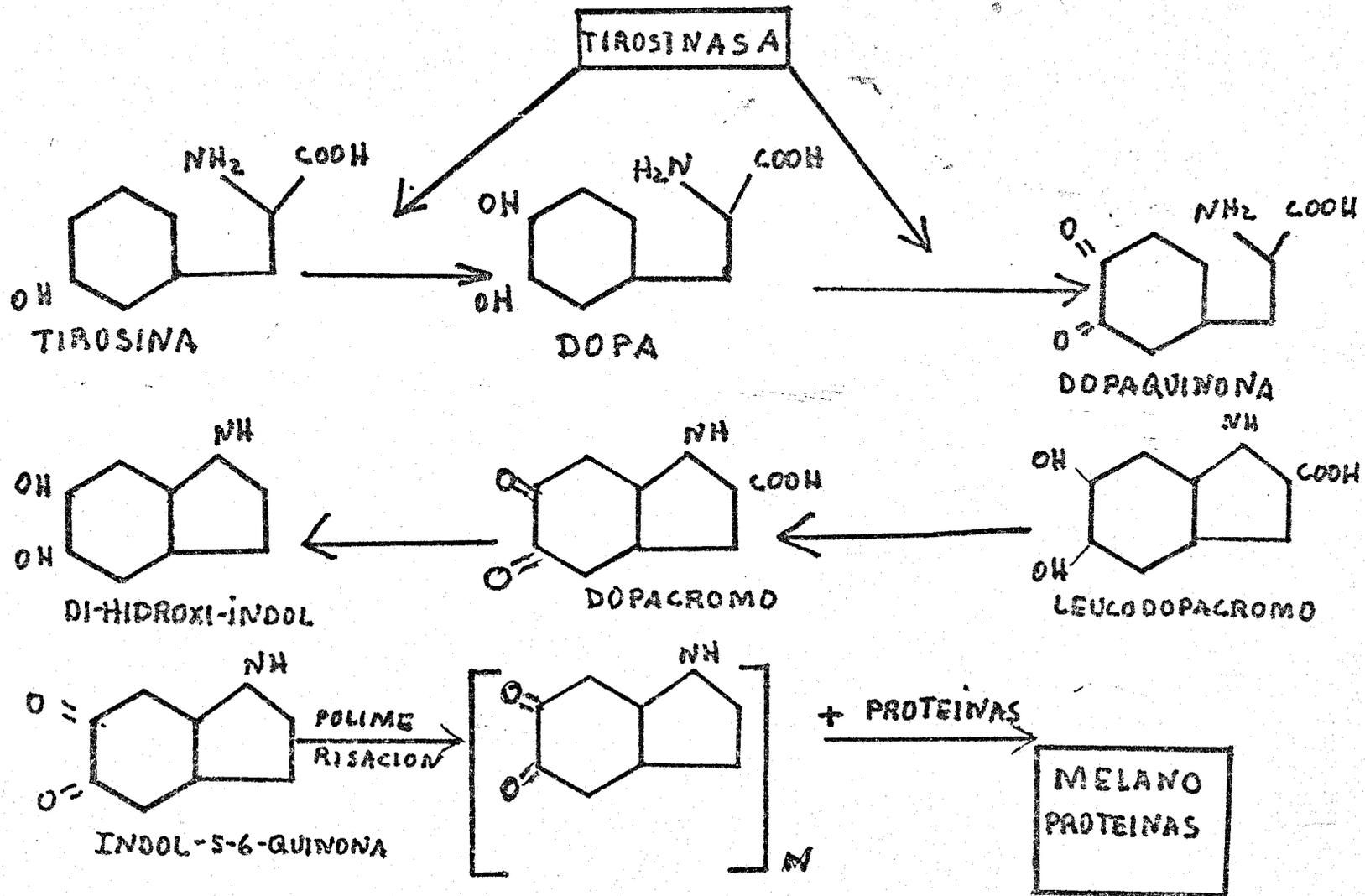
b) La tirosin amino transferasa. Este enzima actua en el paso de p-tirosina a ácido para hidroxifenil piruvico. Cabría pensar que en el deficit de este enzima no se produciría ácido parahidroxifenil piruvico tal como describió G. Medes en 1927, el cual viendo que se produciá tal ácido pensó que se trataba de un deficit no de tirosin amino transferasa sino de p-hidroxifenil piruvato hidrolasa, No obstante La Du sostuvo que se trataba en efecto de deficit de tirosin amino transferasa hepatica y que el ácido parahidroxifenil piruvico que se producía era una formación a nivel renal, a partir de la tirosina endo y exogena.

Si el aporte de tirosina no es muy grande, el PHFP se excreta sin pasar a la circulación, pero en un exceso del ácido aminado la función renal se satura, el PHFP pasa a la circulación y se reduce a ácido fenillactico (AFL) y al PHFA. El exceso de tirosina hace que esta se degrade siguiendo la vía de la Dopa.

- c) P-hidroxifenil piruvato hidroxilasa. La falta de actividad de este enzima produce un gran aumento del ácido parahidroxi fenil piruvico, sin embargo, este aumento, mayor que el que se produce en la falta de tirosin amino transferasa, no tiene la misma etiología - que la que tenía aquella alteración sino que se debe al no paso del ácido fenil piruvico a ácido homogentidínico, y en algunos casos, además, al aumento de - tirosina en la sangre circulante. Su defecto puede -- ser total o parcial, debido a una deficiencia en si - del enzima o debido al defecto de protectores del enzima como ocurre en este caso con la vitamina C. Tanto en un caso como en otro, aunque naturalmente -- mas en la falta total de actividad, se produce un aumento considerable del ácido PHFP del ácido PHFL y -- del PHFA, este último puede ser detectado facilmente con el método usado por nosotros y que mas tarde describiremos.
- d) La homogentisato oxigenasa. Este enzima cataliza el - paso de ácido homogentisinico al ácido maleylacetico y en su deficit existe un aumento del ácido homogenti sinico.
- e) Por último hablaremos de los procesos de melanogene-- sis ya que trataremos mas tarde de los melanomas, aun que solo tenemos recogido 4 casos.
- La sustancia madre de la melanina es la tirosina, la

cual es oxidasa o DOPA por acción de la tirosinasa. Después la DOPA es oxidada a Dopacquinona por acción de la misma tirosinasa. Esta última reacción es muy rápida al contrario de la primera que es lenta. (Esquema en la página siguiente).

Las reacciones siguientes, al parecer no necesitan de catalizadores biológicos y así la dopacquinona por ciclización da lugar al laudodopacromo y este al dopacromo, que por descarboxilación y oxidoreducción da lugar al Dihidroxi-5-6 indol, precursor inmediato de las melaninas por polimerización.



BIOSINTESIS DE LOS PIGMENTOS MELANICOS

CAPITULO II

TUMORES DERIVADOS DE LA CRESTA NEURAL

Embriologicamente las células cromafines de la médula -- adrenal y de otros tejidos se originan de elementos primitivos de la cresta neural, que son también el origen de -- células del sistema nervioso simpático.

El común progenitor se llama simpatogonia la cual es una célula linfocitiforme pequeña, con una densa cromatina, -- núcleo esférico o piriforme y con un escaso protoplasma. --

Esta célula puede tomar dos caminos en su diferenciación:

La línea cromafínica, dando lugar a el feocromoblasto y -- al feocromocito, o la línea neurogética, dando lugar primero a el simpatoblasto, que ocasionalmente se llama neuroblasto. El neuroblasto es una célula más larga que la -- simpatogonia y con un núcleo de menos intensidad y más citoplasma. Esta célula se diferencia más tarde para dar lugar a las células maduras ganglionares.

Cada uno de estos tipos de células, simpatogonia, simpatoblasto, células ganglionar simpática, feocromoblasto, y -- feocromocito pueden dar lugar a un tumor, y así tenemos, el simpatogonioma, el simpatoblastoma, el ganglioneuroma, el feocromoblastoma y el feocromocitoma.

Naturalmente que este tipo de clasificación es muy discutida ya que como el proceso de maduración de estas células es continuo es difícil a veces de encasillar una célula --

en uno de los apartados mencionados, y de la misma manera la identificación y la clasificación de estos tumores varia con la experiencia y la "manera de ver" del patólogo que lo examina. Es por esto por lo que las observaciones hechas por diferentes autores son difíciles de comparar.

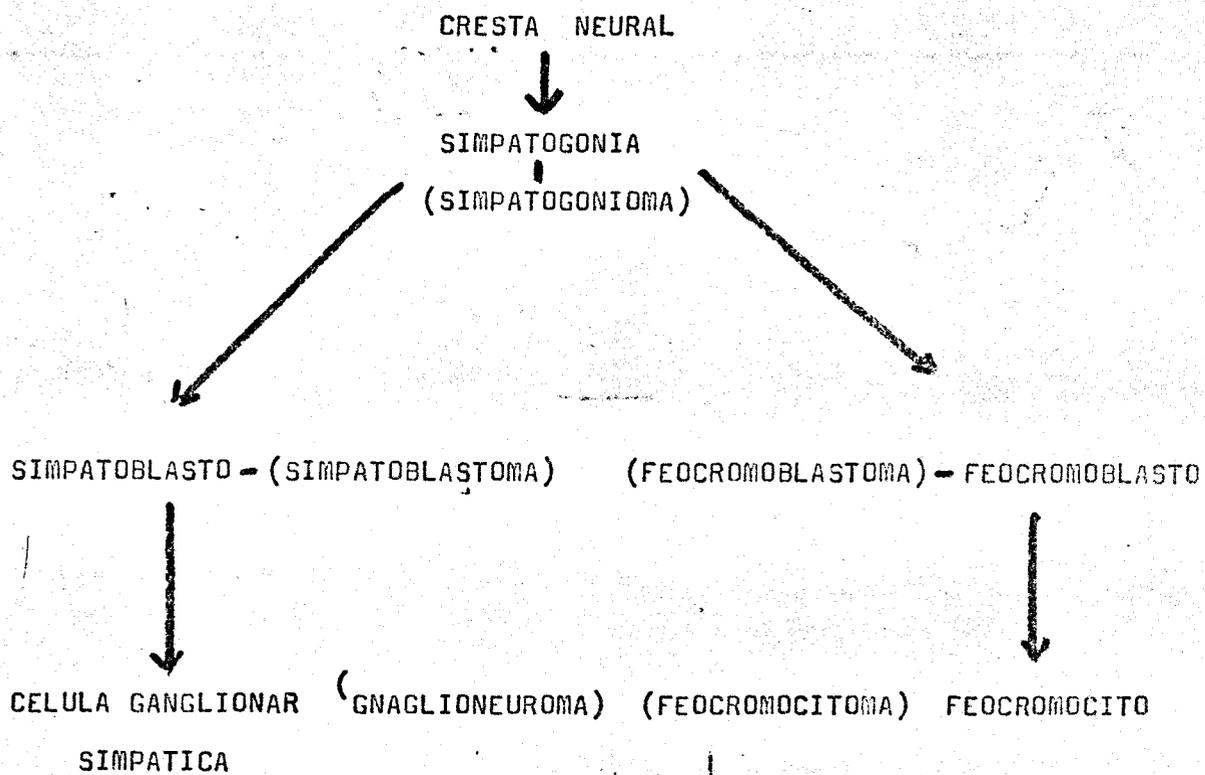
Nosotros siguiendo las directrices del Dr. Kässer clasificamos a los tumores bajo dos puntos de vista, el clínico y el histológico y así decimos.

I.- Tumores malignos con células altamente indiferenciadas = SIMPATOGONIOMA.

II.- Tumores malignos en los que se encuentran elementos neuropolulares y células ganglionares simpáticas maduras = SIMPATOBLASTOMAS O NEUROBLASTOMAS.

III.- Tumores benignos en los que solo existen células ganglionares simpáticas = GANGLIONEUROMA.

Otros tumores que embriológicamente derivan de la cresta neural son los melanomas. Estos tumores contienen melanocitos que han tomado una transformación neoplásica. Los melanocitos son células que contienen en su citoplasma orgánulos especiales que contienen melanina. Estos orgánulos son conocidos como melanosomas y en ellos o en sus precursores los premelanosomas tiene lugar la síntesis de la melanina.



CLASIFICACION DE LOS TUMORES DE LA CRESTA NEURAL
 SEGUN H. KASSER

CAPITULO III

METODOS DE VALORACION DE LAS CATECOLAMINAS Y SUS DERIVADOS.

PRIMERA PARTE.-

RECOGIDA DE MUESTRA.-

La recogida de muestras, sangre, orina, LCR, tejidos etc. han de ser hechas en unas ciertas condiciones que de no ser respetadas conducirían siempre a determinaciones erróneas.

Estas condiciones cuya explicación tanto química como fisiológica trataremos de aclarar, son las siguientes:

A.- URINA

1º Periodo de recogida y estado del paciente.

Las orinas deben ser recogidas durante un periodo por lo menos de 24 horas, ya que se ha comprobado que la secreción de catecolaminas varia en los momentos del día y de la noche y así se sabe por ejemplo que la excreción por minuto de adrenalina durante el día es 5 veces superior que durante la noche y, que la excreción de noradrenalina es 3 veces superior y que la de la Dopa es 2 veces superior.

El paciente aunque puede hacer sus habituales menesteres, (si no son ejercicios físicos intensos) no ha de encontrarse en estado de stress. Se ha comprobado que el ejercicio físico, no muy intenso, no modifica la tasa de excreción -

de catecolaminas, sin embargo se sabe que los estados de stress, irritación psíquica, miedo, cólera etc., lo modifican en muy alto grado pudiendo llegar hasta ser 40 veces superior al excretado en estado normal.

Durante dos días antes a la recogida de orina y durante el día de la recogida el enfermo no podrá tomar los siguientes medicamentos y alimentos:

Medicamentos: alfametil dopa y derivados, antabus, reserpina, regitina, guanetidina, propranolol, IMAO, etc en resumen todas las sustancias de acción hipertensora, antihipertensora, vasoconstrictora o vasodilatadora, han de ser suprimidas por las acciones que tales sustancias poseen sobre el metabolismo o sobre el mecanismo de acción de las catecolaminas. Por la misma razón los medicamentos tranquilizantes y normalizadores. También las tetraciclinas y neomicinas ya que destruyen la flora intestinal y por tanto al descarboxilarse la tirosina en tiramina a nivel intestinal y ser esta absorbida en el intestino grueso y mas tarde oxidada a p-OH- P -A, este ácido se encontraría disminuido.

Alimentos: platanos ya que poseen un similar enzima a la dopamin-beta-oxidasa con lo que da lugar a una mezcla racémica, frutos cítricos por su gran contenido en vitamina C que tan importante papel juega en la síntesis de catecolaminas. El café, te por sus efectos hipertensivos y excitantes. También la vainilla cuyo núcleo estructu-

ral es tan similar al de los metabolitos principales de las catecolaminas y cuya presencia puede enmascarar los resultados.

2ª Condiciones en que ha de ser recogida la orina.

La orina de 24 horas ha de ser recogida en un medio ácido, pH 2 aproximadamente. Esto se debe a lo siguiente: Como ya sabemos todas las catecolaminas poseen en común un grupo difenólico el cual tiene una gran tendencia a la oxidación característica que ha servido como más tarde veremos como punto de partida para su dosificación. Esta oxidación se realiza con una gran facilidad en medio alcalino y por lo tanto hay que agregar en el bote de recogida unos 6 c.c. de ácido clorhídrico puro. Es conveniente agregar este ácido poco a poco según se vaya recogiendo orina. Lo ideal sería medir el pH varias veces al día y agregar el ácido necesario para obtener el pH indicado. Es también necesario para evitar esta oxidación el guardar la orina en oscuridad (frasco topacio es suficiente) y a - 4 °C. Una vez recogida mandar la orina lo antes posible al laboratorio.

B.- OTROS LIQUIDOS BIOLÓGICOS. TEJIDOS

En lo concerniente al estado y a la dieta del paciente vale todo lo dicho anteriormente para la orina.

Para la recogida de la sangre, como es imposible el recogerla en el medio ácido mencionado, se debe recoger en -

bote heparinizado conteniendo metabisulfito sódico, 0,5 mgrs por c.c. de sangre, que es un gran reductor. Después de centrifugada a 4 °C debe ser recogido el plasma y mandarlo lo mas pronto posible al laboratorio, siempre en hielo con objeto de mantener la temperatura.

El LCR debe ser tomado sobre bisulfito sódico y guardar y mandar en las mismas condiciones de la sangre.

Los tejidos tomados de una biopsia o una autopsia precoz deben ser congelados y así ser mandados al laboratorio.

MÉTODOS DE VALORACION.

Los metodos de valoración podemos clasificarlos:

A) Métodos biológicos

a) Colorimetricos

b) Con luz ultravioleta

c) Fluorimetricos

B) Métodos químicos

d) Cromatográficos

Solo describiremos extensamente los métodos fluorimetricos con los que actualmente trabajamos y los cromatograficos con los que hemos obtenido los resultados que describimos en este trabajo de tesis.

Los métodos biológicos y colorimetricos así como los que usan luz ultravioleta, por haber sido ya abandonados serán reseñados muy someramente.

A) Metodos Biológicos.

Los métodos mas corrientes estan basados en la medida de la presión sanguínea de animales atropinizados y des-

-medulanzados despues de inyectar soluciones que contienen catecolaminas. Estos métodos no tienen sensibilidad suficiente para poder sacar resultados útiles para la clínica humana. Hay otros que consisten en medir la disminución de movimientos del utero de rata o medir las propiedades vasoconstrictoras de las catecolaminas a nivel de ciertas partes del organismo animal por medio de la medición del debito sanguineo. Estas dos últimas técnicas son algo mas sensibles.

Valette y colaboradores en 1960 describen un método en el que se mide por medio de un miografo las alteraciones producidas en la aorta aislada de rata. Este método permite obtener buenos resultados pero la realización del método es difícil ya que la preparación de la aorta conservando las fibras circulares es muy difícil y delicada.

Por otra parte uno de los principales problemas que plantean los métodos biológicos radica en la purificación de los extractos a inyectar así como el empleo de inhibidores específicos de la acción de algunas de las catecolaminas ya que mientras en una de ellas, por ejemplo la noradrenalina, la dietilaminoetil-benzodioxana, reduce la acción, en la adrenalina esta misma sustancia realiza la acción inversa.

B) Metodos químicos

a) Colorimetricos.-

Su principal inconveniente radica en su falta de especificidad, por ejemplo, no permiten la diferenciación entre adrenalina y noradrenalina a la vez que son interferido por otras sustancias y así las reacciones que se fundamentan en el poder de reducción de las catecolaminas se ven interferidos por otras sustancias también reductoras tales como la glucosa, el ácido urico, glutatión etc. También las reacciones que se fundamentan en la oxidación de la adrenalina en adenocromo utilizando el cloruro de mercurio, el iodo o el ioduro de potasio en medio ácido aunque su especificidad es mejor, no llega a tanto como para la diferenciación entre adrenalina y noradrenalina. Este último problema fue resuelto por Euler y Hamley en 1949 realizando la oxidación a pH 4 donde la adrenalina se transforma completamente y la noradrenalina solo en un 5%; sin embargo a pH 6 las dos aminas se transforman por igual. Este método tiene el inconveniente de su falta de sensibilidad ya que la muestra debe contener por los menos 20 gammas de catecolaminas.

Por último reseñamos el método de Aurbach y Anfel específico de la noradrenalina y que se basa en la formación de un compuesto de color púrpura al encontrarse en presencia de B-naftoquinona sulfónico y de cloruro de bencalkonium a pH 6 la reacción se realiza y después el color es extraído por una mezcla de tolueno y dicloroetano. Tiene también el inconveniente de su falta de sensibilidad.

b) Con Ultravioleta.-

Los métodos en los que se utiliza la luz ultravioleta se fundan en la medida del adenocromo obtenido por oxidación en cuatro longitudes de ondas diferentes a saber -- 355, 373, 390 y 450. La absorción obtenida a 450 es restada de cada una de las otras tres y así se obtiene una absorción llamada real. Los cálculos se efectúan por comparación con sustancias patrón de concentración conocida. Tiene la dificultad de que las mediciones han de hacerse con una gran rapidez puesto que los colores se destruyen con gran facilidad.

Nosotros hemos comprobado que si se conservan las muestras una vez efectuada la reacción en baño de hielo los colores son algo mas estables, no obstante esto, aconsejamos una rapida medida. Este método es debido a Mattok y colaboradores. El método permite determinar al mismo tiempo la adrenalina la noradrenalina la dopamina y las metanefrinas. Es, creemos un buen método analítico para la práctica diaria pero su sensibilidad aunque es buena no llega a ser como la de los métodos fluorimétricos.

c) Métodos fluorimétricos.-

Son hoy día junto con los métodos cromatográficos los mas empleados. Necesitan al igual que en cualquier técnica fluorimétrica una gran rigurosidad y limpieza en la preparación de reactivos y en las manipulaciones técnicas. Presentan la gran ventaja de que se pueden medir

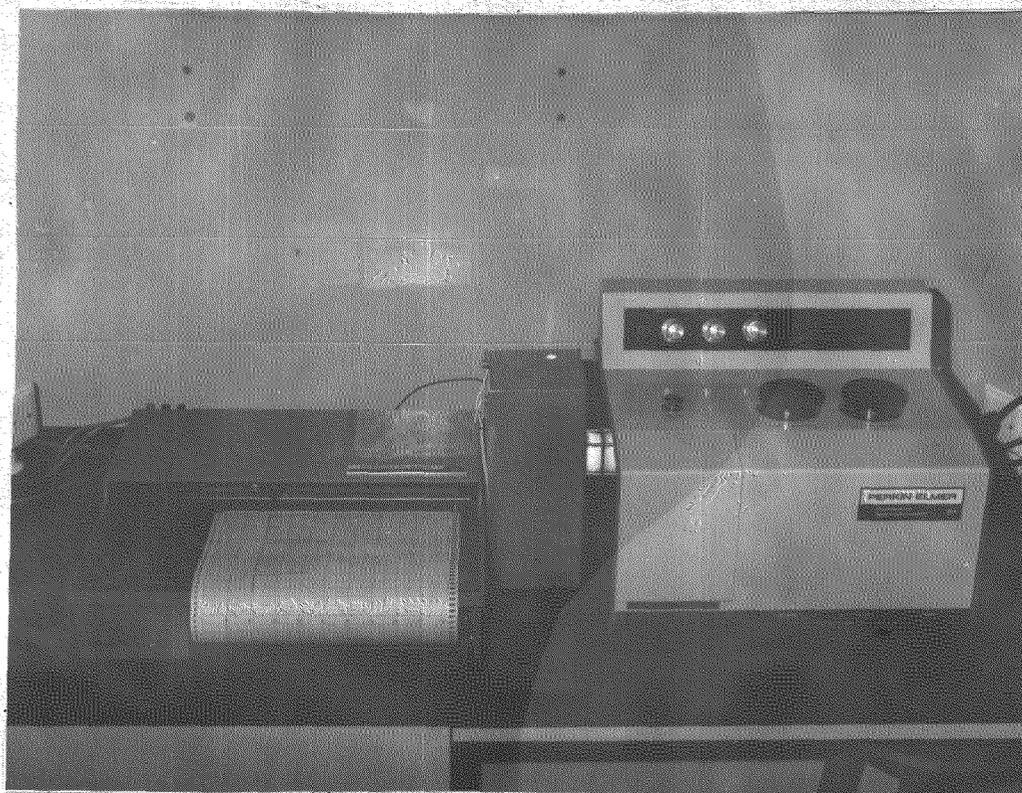
cantidades muy pequeñas de catecolaminas.

MÉTODOS PARA LA VALORACION DE LA DOPA.-

A) Métodos basados en la formación de derivados hidroxindolíticos o lutinas que poseen propiedades fluorescentes - por oxidación y posterior alcalinización. La formación de los compuestos o derivados hidroxindolíticos son descritos en la figura de la página siguiente debida a los estudios de Harley Mason.

El rendimiento máximo de oxidación de la noradrenalina y adrenalina se realiza a pH 6,5 mientras que a un pH 3,4 solo un 5% de noradrenalina esta oxidada y la adrenalina lo esta totalmente. Tambien a un pH 6,5 la dopamina esta totalmente oxidada. Para esta oxidación se emplea ferricianuro o iodo. Despues de la alcalinización la fluorescencia se produce. Si en el medio no existe una sustancia reductora, por ejemplo el sulfito, la adrenolutina se descompone en 3 o 4 minutos mientras que la noradrenalina es mas estable.

La oxidación para la determinación de la DOPA se realiza con iodo a pH 6,5, la alcalinización se realiza con sulfito alcalino y por último una acidificación con ácido acético hasta obtener un pH 5,3. Para intensificar la fluorescencia se utiliza una exposición con rayos ultravioletas antes de efectuar la lectura en el fluorimetro. El fluorimetro que nosotros utilizamos es un fluorimetro marca Hitachi de Perkin Elmer modelo 204.



FLUORIMETRO MODEMO HITACHI 204 UTILIZADO PARA
LAS MEDICIONES FLUORIMETRICAS

La descripción del método que nos parece mas correcto -
la señalamos a continuación.

REACTIVOS.-

- a) Tampon de fosfato 0,5 M a pH 7
- b) Etanol al 70 %
- c) Mezcla de etanol con el tampon fosfato

Reactivo a = 2,7 c.c.

Reactivo b = 0,3 c.c.

Preparar antes del uso.

- d) Periodato sódico al 0,5 %. Preparar antes del uso.
- e) Sulfito alcalino: Solución de sulfito de sodio al 25%
Tomar 0,5 ml de esta solución y añadirsele a 4,5 c.c.
de sosa 5 N.
- f) Tampon citrato 0,5 M a pH 4. Diluir este tampon para
su uso tomando 1 vol de tampon y 2,5 vol de agua des-
tilada.
- g) Acido fosforico 3 M.
- h) Acido clorhídrico 2 N.

Solución estandar de Dopa con concentración de 0,5 gam-
mas por c.c.

Solución estandar de dopamina de 1 gamma por c.c.

METODICA.-

Tomar 0,4 c.c. de standar y 0,4 c.c. de muestra en dos
tubos

Reactivos	T. standar	T. muestras
R-c	0,2 c.c.	0,2 c.c.



a un pH entre 6 y 7 con tampon de fosfato 0,5 M de pH 7. estado donde la oxidación es máxima para las dos aminas. Despues se realiza otra oxidación a pH 2 obtenido con ácido acético 1,6 N. Despues de la etapa de alcalinización realizada con ascorbato alcalino se efectua la medida con fluorimetro con una longitud de onda de activación de 409 mg y de análisis 519 para un pH 7 y de 422 de activación y 529 de analisis para un pH 2.

El método es como sigue:

Reactivos.-

R-a = Tampon de fosfato 0,5 M a pH 7

Rb = ácido acético 1,6 N.

Rc = Ferricianuro potásico al 0,25 %

Rd = Solución de ascorbato alcalino: Disolver 10 mgs de ácido ascorbato en 0,1 c.c. de agua y añadir 5 c. c. de Na OH 10 N. Preparar antes del uso.

Re = Solución standar de noradrenalina conteniendo 2 gammas por c.c.

En 4 tubos de 5 c.c. señalados como problemas y como Standar poner 0,4 c.c. de problema y de standar respectivamente, despues de añadir:

Reactivos T.problemaA T. StandarA T.problemaB T.StandarB

Ra 0,2 c.c. 0,2 c.c.

Rb 0,2 c.c. 0,2 c.c.

MÉTODOS PARA LAS METANEFRINAS.-

Los métodos utilizados para la dosificación de los 3-Oxi metilados de las catecolaminas son todos ellos puramente químicos ya que los métodos biológicos no son posibles. Dentro de los métodos químicos los fluorimétricos son los mas usados actualmente.

Estas aminas son excretadas conjugadas en un 90% (Sulfoconjugadas) y se eliminan en una cantidad aproximada de 0,4 mgrs/24 horas donde las dos terceras partes son normalmente metanefrinas. La décima parte del ácido vanilmandelico y la quinta parte del MHPG eliminados proceden de las metanefrinas.

Dado que la relación metanefrina libre/metanefrina conjugada no presenta al parecer ningún interes todos los métodos realizan una hidrolisis a pH 0,9-1 con CLH 5 N durante 20 minutos a 100°. Esta etapa solo es necesario para la orina. Despues de esta hidrolisis muchos autores hacen pasar la muestra por alumina realizabdo así una fijación de las metanefrinas las cuales son eliminadas por forma de sulfatos, realizando mas tarde una segunda hidrolisis. De esta manera se obtiene según estos autores doble cantidad de MN que en simple hidrolisis.

Despues de esta primera etapa los métodos pueden dividirse en dos grupos. Un grupo en los que se realiza una extracción en medio alcalino otro en los que se realiza una fijación de las metanefrinas sobre resinas cambiaio-

nes tales como la Amberlita IRC 50 o el Dowex 50. Realizada esta etapa de cualquiera de las dos maneras antes descritas los métodos pueden seguir tres caminos diferentes. Uno de ellos es la formación de la lutina correspondiente mediante una oxidación y realizar la medición fluorométrica. Otro es la separación de las metanefrinas por cromatografía bidimensional sobre papel y revelado final con p-nitroanhilina diazotada. Otro en fin es la transformación de la metanefrinas en vainillina y dosificación de esta por colorimetría.

La descripción de un método fluorimétrico para la medición de las metanefrinas es como sigue:

Reactivos:

a = Solución de ClH 5 N.

b = Tampon Tris 1M a pH 7 a 9

c = NaOH 10 N

d = Alcohol isoamilico

e = Eter etílico libre de peroxidos.

f = EDTA disódico con 1 mol de H₂O solución de 50 mgrs/c.

g = IO₄Na Solución al 2%

h = SO₃Na₂ solución al 10 %

i = Acido cítrico 0,85 M

j = Tampon cítrico-acetato. Ajustar a pH 5 una solución de acetato de sodio 2M añadiendo la cantidad necesaria de una solución de ácido cítrico 2M. Una vez conseguida añadir agua hasta obtener una concentración

0,8 M.

K = Tampon borato 1M pH 10 saturado de Cl_{Na} y butanol

l = Ascorbato alcalino. Disolverlo mgrs de ácido ascórbico en 0,1 c.c. de agua y añadir 10 c.c. de NaOH

10 N.

Metodica:

Ajustar 3 c.c. de orina a pH 0,9 con Cl_H 5N. Realizar una hidrolisis a 100 °C durante 20 minutos. Enfriar y llevar a pH 6,8 a 7,2 con tampon Tris.

Añadir 5 c.c. de alcohol isoamilico y agitar durante 3 minutos.

Centrifugar y mediante una aspiradora y con una pipeta muy fina deshechar la capa orgánica debiendo quedar el alcohol perfectamente limpio.

Añadir 1 c.c. del tampon de borato y mezclar bien.

Añadir unos 7 grs de PO₄ HK₂ en polvo y mezclar lo mejor posible para lograr la saturación.

Añadir 15 c.c. de eter y cerrar hermeticamente (Lo ideal son tubos de centrifuga con tapon de cristal) y agitar durante 10 minutos, Centrifugar.

Descartada la capa eterea volver a repetir desde que se le añade el tampon de borato.

Añadir 4 c.c. de Cl_H 0,1 N y agitar 10 minutos. Centrifugar.

Descartar la capa eterea y transferir la capa acuosa en otro tubo.

Medida Fluorimetrica.--

En la misma cubeta del fluorimetro poner:

0,2 c.c. de la capa acuosa ácida que contiene las Mn

0,2 c.c. de H₂O

0,1 c.c. de EDTA

0,05 de tampon cítrico acetato de pH 5

0,05 de la solución de periodato, mezclar y esperar 4 minutos.

Rapidamente añadir 0,1 c.c. de la solución de sulfito y 0,3 c.c. del ascorbato alcalino. Mezclar bien y vigorosamente.

En otra cubeta del fluorimetro colocar todo igual excepto los 0,05 c.c. de tampon cítrico que se sustituyen por 0,05 c.c. de la solución de ácido cítrico que naturalmente tiene un pH muy bajo.

Leer despues de 15 minutos con onda de excitación 409 y analisis 519 para las MN NMN a pH elevado y a longitud de 422 y 531 para las Mn a pH bajo.

Los blancos pueden ser usados con agua destilada..

Calculos: para las NM

$$C \text{ de NM} = \frac{1,064 [A - (1,07 \times B)]}{96,25}$$

y para las MN = (0,0071xB) - (0,023xNM en gammas)

A = Fluorescencia a pH elevado

B = " " 2 pH bajo

La recuperación de las Mn realizada de esta manera es -

-aproximadamente de un 50 por ciento por lo que los resultados finales deben ser multiplicados por 2.

METODOS CROMATOGRAFICOS.-

Los métodos cromatográficos presentan la ventaja de que pueden visualizar en una sola cromatografia todos los principales metabolitos de las catecolaminas.

Los métodos cromatográficos utilizados van desde la cromatografia monodimensional en papel hasta la cromatografia en fase gaseosa, pasando por la bidimensional en papel, bidimensional en capa fina, bidimensional con una primera fase electroforética y otra segunda cromatográfica. Tambien existen métodos de dosificación puramente electroforéticos.

De todos estos métodos cromatográficos destacan por su utilidad y tambien por su diferencia de coste con los demas, ya que no necesitan aparatos especiales los métodos basados en la cromatografia en papel y en placa fina. Todos ellos tienen una primera parte que es la fase de extracción.

Dos son los elementos utilizados para la extracción: el éter anestésico o el acetato de etilo, este último parece ser el más utilizado por diferentes autores aunque personalmente hemos utilizado ambos y no hemos encontrado diferencia a no ser la mas lenta extracción con el éter anestésico.

La orina con un pH 1 a 2 (ver las instrucciones de re-

-cogida de la orina en este mismo trabajo) es mezclada -
con el medio extractor durante un cierto tiempo pasado -
el cual la fase no acuosa es separada y desecada. El ex-
tracto así conseguido es diluido en una cierta cantidad
de alcohol metílico de gran pureza o bien acetato de etil
lo y alcohol, una parte del cual es depositado en el pa-
pel o placa fina donde se realizan el o los desarrollos.
Una vez terminado el desarrollo el medio cromatográfico
es secado y revelado con un tinte de paranitroanilina -
apareciendo las manchas coloreadas que corresponden a -
los distintos metabolitos de las catecolaminas.

Respecto al medio utilizado en placa fina en todos los -
trabajos publicados se utiliza la celulosa en polvo MN -
400. En papel bidimensional el aconsejado es el Whatman
nº 1 y en la monodimensional el Whatman nº 3 o el papel
Arches de paris 304 que a nosotros personalmente es el que
mejor resultado nos ha dado.

Los solventes utilizados en la cromatografía de catecola
minas estan todos generalmente formado por las siguien--
tes sustancias, aunque la proporción es diferente según
el método empleado, estas son: Isopropanol-Amoniaco-agua,
n-butanol-ácido acético agua y a veces se emplea tambien
el ácido propionico, y el benzol que introdujo Armstron
pero debido a la toxicidad del benzol y al desagradable
olor del ácido propionico uno y otro han sido totalmente
desechados.

La dosificación cuantitativa ha sido y todavia es el -- gran caballo de batalla de la cromatografia. No obstante empleando la cromatografia monodimensional, que mas adelante describiremos, podiamos decir que nosotros la hemos resuelto casi totalmente empleando un fotodensitometro con integrador adjunto y que nos da cifras realmente satisfactorias. El fotodensitometro usado por nosotros es el llamado Cromoscan de la casa Joyce Lobel y la lectura la realizamos por reflexión. Los valores así encontrados son comparados con patrones de concentración conocida sometidos a las mismas manipulaciones que los problemas.

Las sustancias mas importantes que son visualizables despues del revelado con paranitroanilina son las siguientes:

APC = Ac para cumarinico

APHB = Ac parahidroxi benzoico

AJHIA = Ac 5 hidroxiindolacetico, metabolito de la 5 OH triptamina o serotonina.

AVM = Ac vanil mandelico

AVL = Ac vanil Lactico

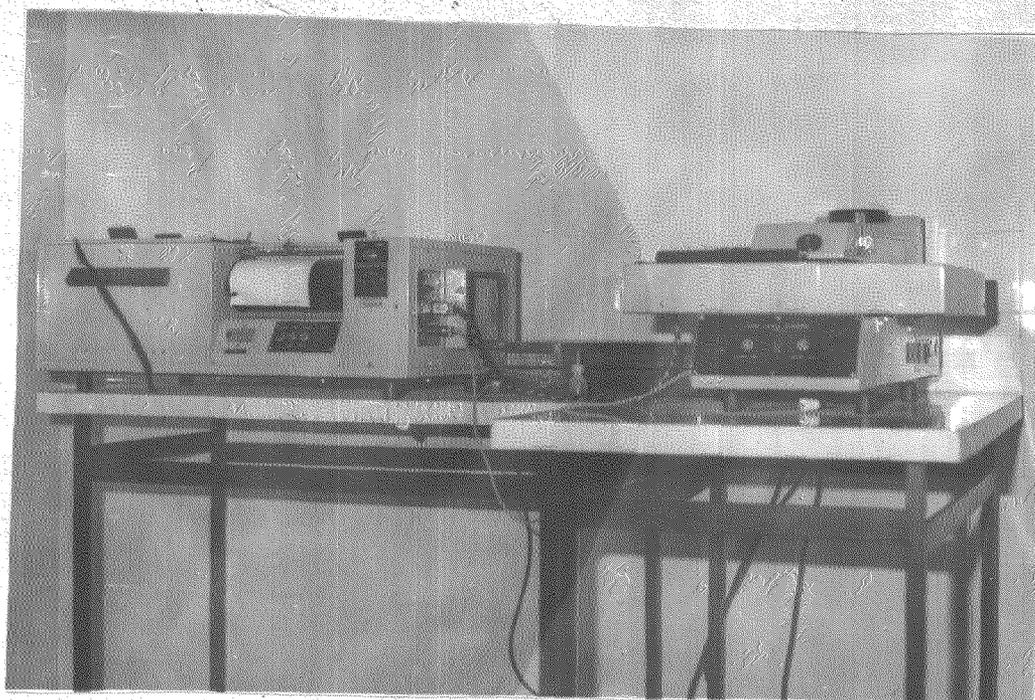
APHM = Ac para hidroximandelico

AHV = Ac homovanillinico

APHFA = Ac para hidroxifenil acetico

APNFL = Ac para hidroxifenil lactico

Naturalmente que en condiciones distintas de pH de hi-



FOTODENSITOMETRO "CROMOSCAN" DE LA FIRMA JOYCE LOBEL
UTILIZADO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA

-drolisis y de extracción pueden aparecer además otras - sustancias como el MHFG = Ac metahidroxifenil glicol me- tabolitos como ya vimos de la adrenalina y noradrenalina pero que es transformado en el hígado y en el riñón en - ácido vanil mandélico, por lo que solo tiene interés su dosificación en sangre. También el PHFP (Ac para hidroxi fenil piruvico) puede ser identificado por cromatografía en papel y placa pero al ser destruido en medio alcalino es necesario su previa transformación en hidrazona por me- dio de la prañitrofenilhidrazina en ácido acético 2 N. Pa- ra la realización de la cromatografía de este ácido se em- plea placa de silicagel mezclado con ácido propionico y- agua y el solvente empleado es el éter de petróleo forma- te de metilo - ácido propionico en proporción de 130-70- 15 v v la cromatografía es monodimensional. Las placas - una vez secada son visualizadas en caliente con luz ultra violeta.

Como en diversas tirasolurias se excreta este ácido en - cantidades importantes como esta excreción se acompaña también de una eliminación importantes de ácido PHFL y - PHFA que son visualizadas perfectamente por el método ge- neral antes descrito no creemos que sea de interés el rea- lizar este método.

METODO ELECTROFORETICO.-

Para los métodos electroforéticos se usa el mismo extra- to que el que se usa en cromatografía.

Sobre una tira de papel Arches 301 o Wattman nº 1 se depositan 0,02 c.c. de extracto. Se practica la electroforesis utilizando una solución acuosa de ácido acético - al 1,5 %. Se aplica un voltaje de 15 voltios/cmm durante 7 horas. Una vez seca la tira se pulveriza con el diazo de paranitroanilina. La mancha color violeta corresponde al ácido vanil mandélico.

Esta mancha se diluye con metanol-carbonato sódico al 2% y se compara con patrones en cantidad creciente de AVM. El acetato de celulosa tambien ha sido empleado usando un tampon de piridinaacetico-agua 3,5:16: hasta 1000 de pH 4,2. Como es dificil colocar el extracto en esta tira se ha utilizado por algunos una porción de 25x33mm de papel de filtro S y S 403 A en donde se ha depositado 0,02 c.c. de orina varias veces secando en intervalos. Este papel se deposita sobre la tira de acetato de celulosa en el extremo catódico. Electroforesis de 2 horas a 20 V y 2 mA por tira.

DOSIFICACION DEL ACIDO HOMOVANILLICO.-

El ácido homovanillínico fue descubierto por Shaw y Armstrong en el año 1957 y es el 3 metoxi 4 OH fenil acético. Existen gran cantidad de métodos de valoración del ácido homovanillínico. Describiremos aquí solo el método fluorimetrico de SATO ya que los métodos cromatograficos usados por nosotros se describen mas adelante.

Fundamento del método.-

La orina muestra es tratada con Dowex X4 que es una resina intercambiadora de iones y que fija el ácido homovanilínico. El ácido fijado a la resina es diluido con una solución de ClNa y extraído con una mezcla de tolueno-cloroformo. Mas tarde es oxidado por el ferricianuro potásico en medio alcalino. La fluorescencia es medida a 313 excitación y 420 análisis.

Reactivos.-

- R a = ClH 1N y 6N
- R b = Na OH 1N
- R c = Acetato de amonio al 7,6grs/litro ajustado a pH 4,5 con ácido acético.
- R d = ClNa al 1,5 M
- R e = ClNa en polvo
- R f = Tampon Tris a pH 8,5 (Ajustar con ácido acético)
- R g = Mezcla Tolueno cloroformo: (Volúmenes de Tolueno por 1 volumen de cloroformo)
- R h = Solución de NH_3 5N
- R i = Ferricianuro potásico al 0,01 grs %
- R j = Cisteina al 0,1 % (Conservar en nevera)
- R k = Resina Dowex AGIX4 en forma ácida
- R l = Patrón de ácido homovanilínico conteniendo 10 gammas por c.c. y otro de 20 gammas por c.c. (Conservar en nevera)

Metódica.-

Tomar 5 c.c. de orina de 24 horas y ajustar a pH 4,5 con

sosa Normal. Añadir 5 c.c. de tampon de acetato de pH -- 4,5. Agitar y pasar la orina así preparada por una columna de Dowex recientemente preparada. Flujo de 0,6 c.c. -- por minuto.

Lavar la columna con 3 c.c. de agua destilada, deshechar este agua. Lavar nuevamente la columna con 18 c.c. de -- ClNa 1,5 M y recoger el eluyente en un matraz. Acidifi-- car con 2 c.c. de ClH N y saturar de ClNa en polvo.

Extraer con 20 c.c. de una mezcla de tolueno-cloroformo agitando durante 10 minutos. Retirar la fase organica -- que se guarda en un tubo y repetir la extracción con la mezcla 2 veces mas. Tomar 30 c.c. de la fase organica y añadirle 3 c.c. de tampon Tris de pH 8,5. Agitar, centri-- fugar y eliminar la fase organica.

De este extracto final tomar 1 c.c. y añadirle 1 c.c. de amoniaco 5 N y 0,2 c.c. de ferricianuro potásico. Agitar Añadir 0,2 c.c. de l cisteina. Hacer un blanco de la mis-- ma manera pero invirtiendo el orden de adición de la cis-- teina y del ferricianuro.

Medir la fluorescencia en un espectrofluorimetro en onda de excitación de 320 y onda de análisis de 420 frente a blanco de agua.

Realizar una curva de patrones tratados de la misma mane-- ra con 15, 30, 45, 60 y 80 gammas.

DOSIFICACION DEL ACIDO VANIL MANDELICO.-

Los principales métodos de dosificación de el ácido 3 ne

-toxi 4 hidroxí mandélico se dividen en dos grandes grupos a saber:

A) Métodos que se basan en la oxidación, obtención de la vainillina y dosificación mas tarde de esta.

B) Métodos de separación cromatográfica.

Nos referiremos ahora a los métodos de oxidación ya como hemos dicho, mas adelante hablamos de los métodos cromatográficos.

Fundamento del método.-

El ácido vanil mandelico es extraido por el acetato de etilo y oxidado en vainillina por el periodato. La vainillina es dosificada a 360 milimicras.

Reactivos.-

Ra = IO_4Na al 2% (Conservar en nevera)

Rb = $S_2O_3Na_2$ al 10% en agua (Conservar en nevera)

Rc = ClH 6 N

Rd = CO_3K_2 en solución 1 M

Re = Ac. acético 5 N

Rf = Tampon de fosfato según Sorensen a pH 7,5

Rg = Acetato de etilo

Rh = $ClNa$

Ri = Solución patron de ácido vanil mandélico que contengan 1 mg/ml.

Metodica.-

Preparar tres frascos con tapon de vidrio de unos 80 c.c. de capacidad y rotular B (blanco) M (muestra) y BI (patron

interno).

Orina filtrada	B 3 c.c.	M 3 c.c.	P I 3 c.c.
Solución patron	0	0	0,25c.c.
Agua destilada	2,5c.c.	2,5c.c.	2,25 c.c.
ClH 6 N	0,5	0,5	0,5
ClNa	3 grs	3 grs	3 grs
Acetato de etilo	30 c.c.	30c.c.	30 c.c.

Agitar durante 5 minutos y centrifugar.

Separar en otros tres tubos señalados de la misma manera

	B	M	P I
Extracto de acetato de etilo	25 c.c.	25c.c.	25 c.c.
CO ₂ K ₂ l M	1,5c.c.	1,5c.c.	1,5c.c.

Eliminar completamente el acetato de etilo en un evaporador rotatorio a vacío

A la solución de carbonato que resta añadir

	B	M	P I
Periodato	0	0,20c.c.	0,20 c.c.

Poner a b.mm a 50° durante 30 m. Enfriar y añadir

	B	M	P I
Sol de metabisulfito	0,20	0,20	0,20
Periodato	0,20	0	0
Ac. Acético 5 N	0,30	0,30	0,30
Tampon pH 7,5	0,60	0,60	0,60
Tolueno	20	20	20

Agitar y centrifugar 5 minutos a 5000 v. por minutos

El extracto de tolueno transferirlo a otros nuevos tubos

	B	M	P I
Extracto de tolueno	15c.c.	15 c.c.	15 c.c.

Carbonato potásico 1 M 4 4 4

Con una pipeta Pasteur tomar lo mas posible de la capa -
de carbonato y colocarlo en las cubetas del espectrofotó
metro leyendo todos los tubos frente a blanco de carbona
to potásico 1 M.

Calculos.-

$$\frac{DoM - DoB}{DoPI - DoM} \times 25 \times \frac{Vol\ 24\ horas}{3 \times 1000} = \text{mgrs en 24 h de}$$

AVM.

CAPITULO IV

METODOS EMPLEADOS

El método empleado por nosotros es la cromatografía en dos de sus variantes: Cromatografía monodimensional y cromatografía bidimensional en papel.

La monodimensional la realizamos en todas las orinas que para estos fines nos llegan al laboratorio y nos sirva para despistage de orinas patológicas y la mayoría de las veces para realizar la dosificación, cuantitativa de algunos de los metabolitos. Una vez comprobada que es patológica hacemos una cromatografía bidimensional. Tampara seguir una evolución clínica preferimos la monodimensional.

CONDICIONES DE RECOGIDA DE ORINA.-

Este punto ya fué explicado anteriormente y no insistiremos mas sobre el asunto.

EXTRACCION.-

Como ya dijimos hemos empleado indistintamente el eter anestésico y el acetato de étilo.

Extracción con eter anestesico.-

500.C. de orina previamente filtrada y comprobado su pH se coloca en un extractor líquido a líquido, empleando en el mismo 100 c.c. de eter. La temperatura de extracción puede ser aproximadamente de 45 °C y el tiempo 24 horas como máximo y 8 horas como mínimo. El extracto etereo es recogido y evaporado en un evaporador rotatorio y una vez

seco es diluido con 2,5 c.c. de alcohol metílico, 0,05c. c. de este extracto corresponden a 1 c.c. de orina.

Extracción con acetato de etilo.-

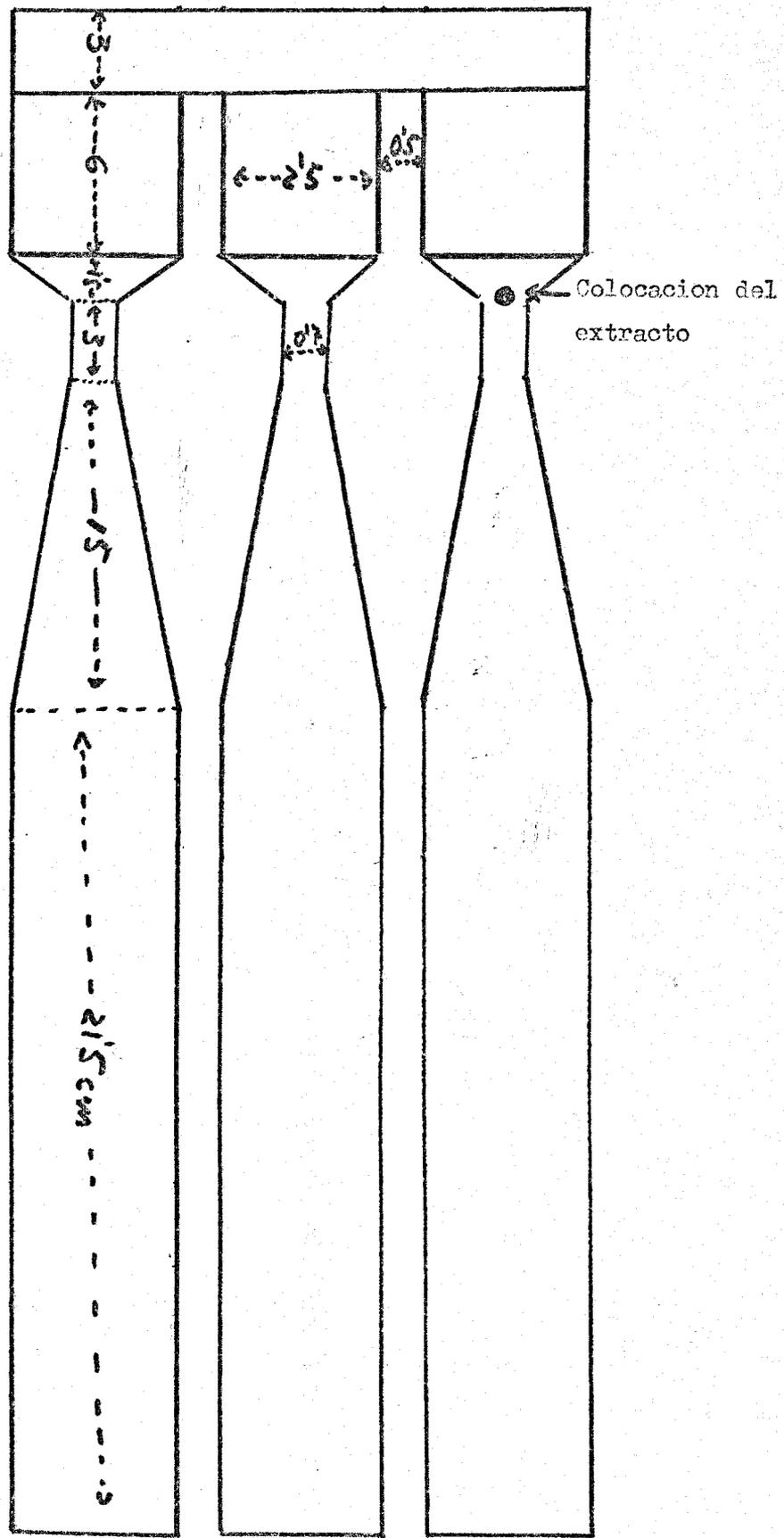
10 c.c. de orina, previamente filtrada es mezclada en un mezclador rotatorio con 10 c.c. de acetato de etilo durante 15 minutos. Una vez en reposo y separada las dos fases el acetato de etilo es retirado y colocado en un matraz en forma de corazón. Se vuelve a hacer des nuevas extracciones con la misma cantidad de acetato y una vez separado las fases itílicas se unen en el mismo matraz. El matraz se coloca en el evaporador rotatorio con vacío y una vez seco el extracto se diluye con 0,5 c.c. de metanol, 0,05 c.c. de este extracto corresponde a 1 c.c. de orina.

Desarrollo cromatográfico monodimensional.-

Se realiza sobre papel Arches 304 o bien sobre papel Whatman nº 4 el cual se corta según indica el dibujo de la página siguiente.

Con una micropipeta se coloca en el lugar de depósito 0,05 c.c. del extracto. Se coloca el papel en la cuba cromatográfica y se hace el recorrido por espacio de 24 horas. La cuba cromatográfica ha de estar saturada con el mismo solvente del desarrollo.

Junto con las muestras se colocan patrones que contienen en 0,05 c.c. 4 gammas de AVM + 8 de AHV y en otra tira 10 de AVM y 16 de AHV.



ESQUEMA DEL PAPEL CROMATOGRAFICO USADO EN LA CROMATO-
 GRAFIA MONODIMENSIONAL

El líquido de desarrollo esta compuesto de isopropanol - Merk, amoniaco al 25% vol- H_2O en proporción 8-1-1. Esta mezcla ha de realizarse una hora antes a fin de que la cuba cromatográfica se sature. Una vez empleada debe deshecharse.

Pasadas 24 horas se sacan las tiras, se secan y se pulveriza con el diazo de p-nitroanilina compuesto de la siguiente manera:

R-1 = 200 mgrs de p-nitroanilina (Merk) en 2 c.c. de ClH concentrado. Disolver y llevar hasta 100 con agua destilada.

R-2 = 200 mgrs de nitrito sódico (Merk) en 100 c.c. de agua destilada.

R-3 = 10 grs de carbonato sódico disuelto hasta 100 c.c. con H_2O .

Para el uso se mezcla 1 parte de R-1 mas 1 parte de R-2 mas dos partes de R-3. Ha de utilizarse antes de 1 minuto.

Los reactivos se conservan durante 15 días en nevera.

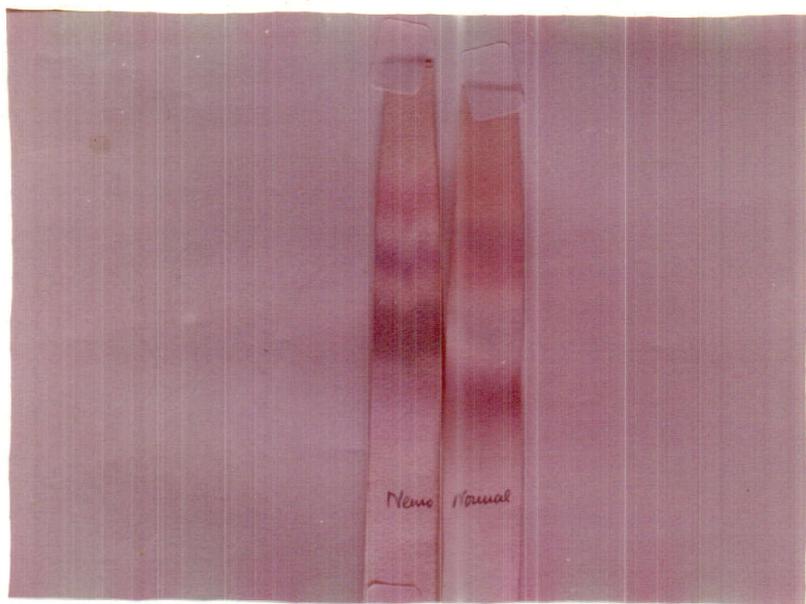
Las manchas aparecen de distintos colores y en el orden y Rf que describimos en la figura de la pagina siguiente.

Ultimamente nosotros al poseer mas sustancias patron hemos confeccionado unos patrones compuestos de la siguiente manera:

Patron I = AVM = 4 gammas

OHFA = 4 gammas

PHFA = 8 gammas



CROMATOGRAFIA MONODIMENSIONAL DE ORINA DE UN ENFERMO
CON NEUROBLATOMA Y UN SUJETO NORMAL

JHIA = 10 gammas
 Patron II = AVM = 10 gammas
 OHFA = 10 gammas
 PHFA = 16 gammas
 AHV = 16 gammas
 JHIA = 16 gammas

Naturalmente que en este tipo de cromatografía muchas de las sustancias reveladas por la paranitroanilina se superponen en una sola mancha por lo que en caso de duda es necesario hacer una cromatografía bidimensional ya que debido a la superposición podíamos tener un juicio falso. Esta superposición ha sido comprobada por nosotros y hemos averiguado cuales son las sustancias superpuestas en cada banda. Para mas claridad en el siguiente esquema -- pondremos a la izquierda la sustancia principal y frente a ella y encerrada en llaves las sustancias mas importantes cuyas manchas se pueden interponer:

Ac. vanillinico (violeta)	}	Ac. p-cumarinico(rojo purpura)
		Ac. p-OH-benzoico(rojo)
Ac. 5OH-indol acético		
Ac. vanil mandélico (violeta)	}	Ac. vanil láctico(azul gris)
		R-OH mandelico (rojo purpura)
Ac. Homovanillinico (azul gris)		
Ac. pOHfenil acético (purpura)		pOH fenil láctico(purpura)
Ac. O-OH fenil acético(purpura)		O-OH fenil láctico(purpura)

No obstante esto a veces con algo de experiencia podria ser suficiente esta cromatografia monodimensional para realizar un diagnostico o sospecha diagnostica por el laboratorio de un Feocromocitoma o un Neuroblastoma e incluso un carcinoide.

CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL.-

El extracto es el mismo que se emplea en la monodimensional.

Empleamos una técnica modificada de GJ Jessing usando papel Whatman en hojas de 35x35 cm y dos cubas cromatográficas, una para el primer recorrido y la otra para el segundo. Los dos recorridos son ascendentes. A una distancia de ambos extremos de 5 cm colocamos con una micropipeta 0,05 c.c. del extracto secando a intervalos con objeto de que la impronta sea la mas pequeña posible.

Después colocamos el papel dentro de la cubeta cromatográfica donde una hora antes ha sido preparada la mezcla de desarrollo.

Para el primer recorrido nosotros empleamos isopropanol- NH_3 y H_2O en proporción de volúmenes de 100-5-10, tardando este primer recorrido aproximadamente unas 18 horas.

Una vez pasado este tiempo el papel es secado a 40 °C y una vez seco en sentido vertical respecto al anterior se coloca en la segunda cubeta donde previamente se ha vertido el segundo líquido de desarrollo compuesto de n-butanol-ácido acético y agua en proporción de volúmenes

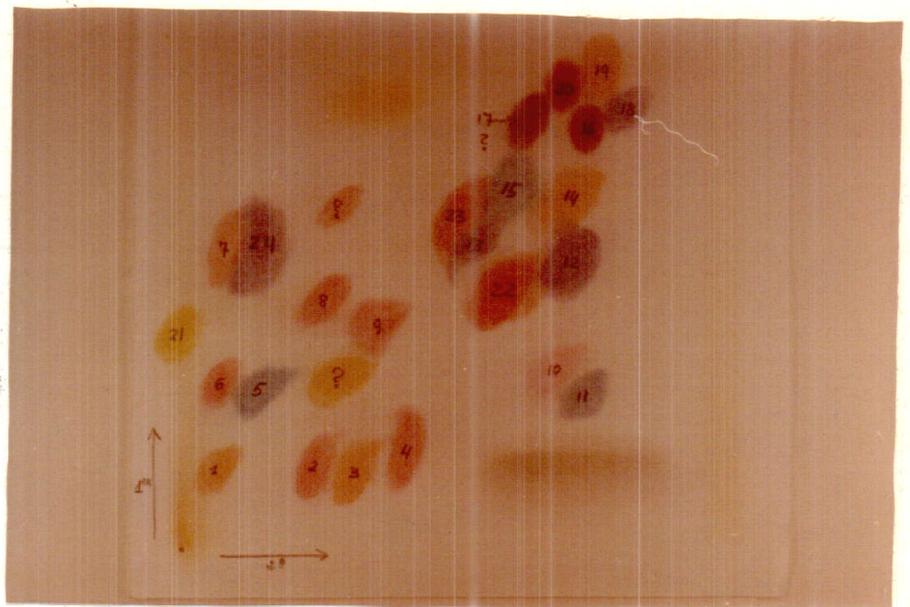
de 60-15-25. Este recorrido dura aproximadamente unas 10 horas. Finalizado este tiempo se saca la hoja se seca y mas tarde se pulveriza con el diazo de paranitroanilina apareciendo las manchas con su color caracteristico y -- perfectamente separadas unas de otras como vemos en la -- figura de la pagina siguiente que corresponde a un caso normal.

Para la dosificación cuantitativa el papel es mas idonea que la placa fina, es por esto por lo que nosotros nor-- malmente empleamos siempre papel, no obstante la placa -- fina tambien la hemos empleado en muchas ocasiones ya -- que presenta la ventaja frente al papel que el desarro-- llo es mas rapido e incluso las manchas aparecen con -- mas viveza de colores.

Las placas por nosotros empleadas han sido de las de ce-- lulosa MN 400 con dimensiones de 20x20. La cromatografia es ascendente en las dos direcciones y los solventes em-- pleados son los mismos que los empleados para el papel. Cromatografia monodimensional en placa fina .-

En este último año de 1973 hemos empleado con muchas fre-- cuencia la placa fina pero realizando una cromatografia monodimensional en vez de bidimensional.

Para mejor separación de las manchas colocamos las impron-- tas en forma de linea en vez de en forma esférica. El lí-- quido de desarrollo es tambien el isopropanol-amoniaco y agua 80-10-10 y el desarrollo es ascendente, Aproximada-



Esquema de una cromatografía bidimensional en placa fina = las sustancias identificadas son las siguientes

- | | |
|------------------------------|------------------------|
| 1 = Simpatol | 21=Ac resorcilico |
| 2 = Octopamina | 22= P-OH mandelico |
| 3=Normetanefrina | 23= P-OH-fenil acetico |
| 4=Metanefrina | 24= O-OH-fenil lactico |
| 5= 3 metoxitiramina | |
| 6= p-tiramina | CROMATOGRAFIA SEGUN |
| 7=Ortohidroxifenilacetico | GJESSIN |
| 8=3-metoxi-4OH-fenil glicol | |
| 9= " " " " " | |
| 10=P-tiramina | |
| 11=3-metoxi-4OHfenil alanina | |
| 12= Acido vanil mandelico | |
| 14= Ac.5OHindol acetico | |
| 15.=Ac homovanillinico | |
| 16= Ac ferulico | |
| 17 = ? | |
| 18=Ac vanillinico | |
| 19=P-OH-benzoico | |
| 20 = P-cumarinico | |

-mente dura unas 10 horas. Una vez seca se pulveriza tam-
bién con el mismo revelador de paranitroanilina y las -
manchas como se puede apreciar en las fotografías de la
pagina siguiente se visualizan perfectamente. Este méto-
do tiene la ventaja sobre el papel en que la dosificación
cuantitativa por medio de la densitometria es mas facil -
que en el papel.

Dosificación cuantitativa.-

La dosificación cuantitativa la hemos realizado de dos -
maneras distintas a saber

- a) Por elución de las manchas
- b) Por fotodensitometria

A) Cuantificación por elución de las manchas.

Este método lo hemos empleado en la cromatografia mono-
dimensional en papel. Una vez reveladas las manchas es-
tas se recortan en el papel y cortandola en pequeños cua-
dritos se diluyen en tubos de ensayo con la siguiente --
mezcla

Metanol 2 c.c.

Carbonato potásico al 2% 1 c.c.

Agitar bien y añadir una mezcla a partes iguales de para-
nitroanilina diazotada según la formula antes descrita.

Esperar 30 minutos y leer frente a blanco realizando con
un trozo de papel donde no hubiera mancha y diluido con
los mismos reactivos que el problema.

Las longitudes de ondas empleadas por nosotros son para



CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA DE URINA DE UN
ENFERMO CON UNA TIROSINOSIS EN DONDE SE PUEDE
APRECIAR EL EXTRAORDINARIO AUMENTO DE PHFA

cada sustancia las siguientes:

para el	AVM	= 560 my	para el	PHFA	= 540 my		
"	"	AHV	= 560 my	"	"	DHFA	= 540 my
"	"	SHIA	= 546 my	"	"	AVL	= 560 my

Las medidas se leen en extinción y se comparan con las -
obtenidas con los patrones tratados de la misma manera.
La ley de Beer se cumple hasta concentraciones de 20 mgrs/
l.

Los valores pueden ser relacionados con la diuresis de -
24 horas o bien con los mg de creatinina excretados con
lo que soslayamos algo los errores de recogida de orina.
Con este método los errores en los valores de recupera-
ción obtenido por nosotros han sido siempre menores de -
0,5 mgrs/l

Respecto a los valores normales que han sido encontrados
siguiendo esta técnica y realizando la determinación en
100 personas clínicamente normales han sido los siguien-
tes.

AVM.....	3,25mgrs/24 horas	D d ±	2,75
AHV.....	5,60 " "	D de ±	2,90
SHIA.....	4,95 " "	D de ±	4,25
DHFA.....	1,17 " "	D de ±	0,97
PHFA.....	7,95 " "	D de ±	4,75

CAPITULO V

MATERIAL

Este trabajo fúe comenzado en el año 1964 bajo la dirección del Profesor J. Cruz Auñon. Desde esa fecha hemos realizado un total de 4612 determinaciones de catecolaminas todas ellas con los métodos cromatográficos reseñados antes si bien hay que añadir que las 50 primeras fueron realizadas por el método de Pisani, colorimétrico para la dosificación del AVM y que antes ya hemos -- descrito. La procedencia de estos casos pueden ser clasificados de la siguiente manera..

3987 determinaciones realizadas sobre adultos procedentes en su mayoría de los Servicios de Cardiología de la Escuela Oficial de Aparato Circulatorio, del Servicio -- de Cardiología de la Ciudad Sanitaria Virgen del Rocío de la Seguridad Social, de diferentes servicios de las diferentes cátedras de medicina de la Universidad de -- Sevilla, Profesor Zarapico, Profesor Aznar, Profesor -- León Castro, Profesor Sanchez de la Cuesta, de la Residencia Sanitaria de la Seguridad Social de Huelva, de Cordoba y de Cadiz, a mas de algunos enfermos que fueron visitados en las consultas particulares de los Dres Conde Hernandez, Rivera, Rios Mozo, Fajardo, Andreu Kern, R. Moreno y otros. 100 determinaciones realizadas a individuos clinicamente normales escogidos al azar. 525 determinaciones realizadas en niños procedentes en su mayoría

de la catedra de Pediatria de la Universidad de Sevilla y en menor grado del Hospital Infantil de la Seguridad Social, del Servicio de Puericultura de Sevilla así como enfermos vistos en visita privada de los Doctores Estefania, Navarro, Meneses, Laffon, Rioz Mozo, etc. Tambien se han realizado determinaciones en orina de niños procedentes de las Residencias Sanitarias de Cordoba, Huelva y Cadiz.

Entre todos estos pacientes cuyas orinas fueron examinadas por nosotros fueron diagnosticados los siguientes tipos de tumores que han sido en todos los casos comprobados anatomopatologicamente.

Neuroblastomas	113
Ganglioneuroma	18
Feocromocitoma	10
Melanomas	4
Carcinoides	15
C. de mama	12

Las sustancias en las que nosotros hemos centrado nuestros estudios son las siguientes:

AVM, AHV, AVL, PHFA, OHFA, 5OHIA

En el siguiente cuadro hemos comparado el aumento o la excrección normal de cada tipo de sustancias en cada tipo de tumor. Hemos señalado con flechas la calidad del aumento.

TIPOS DE TUMOR	AVM		AHV		AVL		PHFA		OHFA		5 OHIA	
	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A
NEUROBLASTOMA	25	↑↑ 88	10	↑↑↑ 103	111	2	97-	↑↑ 16	112	1	113	0
GANGLIONEUROMA	16	↑ 2	4	↑↑ 14	18	0	18	0	18	0	18	0
PERGROMOCITOMA	0	↑↑↑ 10	8	↑ 2	10	0	9	1	10	0	10	0
MELANOMA	4	0	2	2	11	↑↑ 3	2	↑ 2	3	1	4	0
CARCINOIDES	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	0	↑↑↑ 15
C DE MAMA	11	↑ 1	12	0	12	0	12	0	12	0	2	↑↑ 10

CAPITULO VI

COMENTARIOS Y DISCUSION

Desde que en 1957 Mason y colaboradores describieron por primera vez la presencia de aminas presoras en un niño - con un neuroblastoma el estudio de las catecolaminas ha dado un paso gigantesco.

Los tumores derivados de la cresta neural producen como ya hemos observado grandes cantidades de catecolaminas.- Por tanto la dosificación de ellas nos sirve como un punto de apoyo muy sólido tanto para emitir el diagnóstico como para poder seguir, como luego veremos, la evolución del proceso y así enjuiciar la actuación y métodos terapéuticos..

De todos los tumores estudiados por nosotros el hallazgo de una cifra patológica y por tanto el diagnóstico por el laboratorio de un tumor, nunca ha sido discordante -- con la anatomía patológica. Es decir, siempre que encontramos una cifra elevada la anatomía patológica nos ha -- confirmado, siempre que la biopsia ha sido posible, que se trataba de un tumor y solo en muy contados casos, cuya frecuencia ha sido ya expuesta en el capítulo V de este -- trabajo de tesis, hemos encontrado, en lo que se refiere a neuroblastoma y ganglioneuromas sobre toda, cifras normales de AVM y AHV y sin embargo la anatomía patológica -- diagnóstico que se trataba de un tumor.

Ahora bien no siempre en la primera determinación reali-

-zada a un enfermo con sospecha clinica de tumor deriva-
do de la cresta neural las cifras han sido patológicas -
sino que, bien porque el enfermo no recogiese correcta--
mente la orina, bien porque el estado funcional del tumor
no se lo permitiera, han sido necesaria dos y en dos casos
hasta cuatro determinaciones para que las cifras encontra-
das nos hicieran sospechar que se trataba de un tumor. No
ha ocurrido así con los feocromocitomas y melanomas que
excepto en un caso de comprobada mal recogida de orina, -
en todos ellos en la primera determinación las cifras ob-
tenidas de AVM nos han hecho diagnosticar un feocromocito-
ma.

En relación con los resultados obtenidos y centrando nues-
tra atención en la frecuencia de los aumentos de las dife-
rentes sustancias en los distintos tumores, podemos hacer
las siguientes consideraciones.

En los neuroblastomas el metabolito de las catecolaminas
cuya excreción resulta con mas frecuencia aumentada es el
AHV cuya cifra puede llegar a alcanzar hasta los 42 mgrs
en las 24 horas. No obstante hay que hacer constar que de
los 113 casos en 10 de ellos las cifras resultaron norma-
les, sin embargo es de resaltar que de esos 10 casos de -
cifras de AHV normales 6 de ellos tenian un PHFA patologi-
co, por lo que creemos de un gran interes este último áci-
do y creemos que la presencia de un aumento en su excre--
ción nos debe obligar a repetir a los menos por 4 veces la

cromatografía.

También el AVM resulto en un 77,8 por ciento de los casos aumentados. Ahora bien este aumento de AVM nunca sobrepaso los 11 mgrs en las 24 horas.

En los feocromocitomas sin embargo siempre en todos los casos existio un marcado aumento de AVM, aumento que en algunos casos llevo hasta los 36 mgrs en las 24 horas es decir siempre mayor que en los neuroblastomas. También en un 20 por ciento el AHV se encontro aumentado pero este aumento fue siempre menor de 13 mgrs/24 horas.

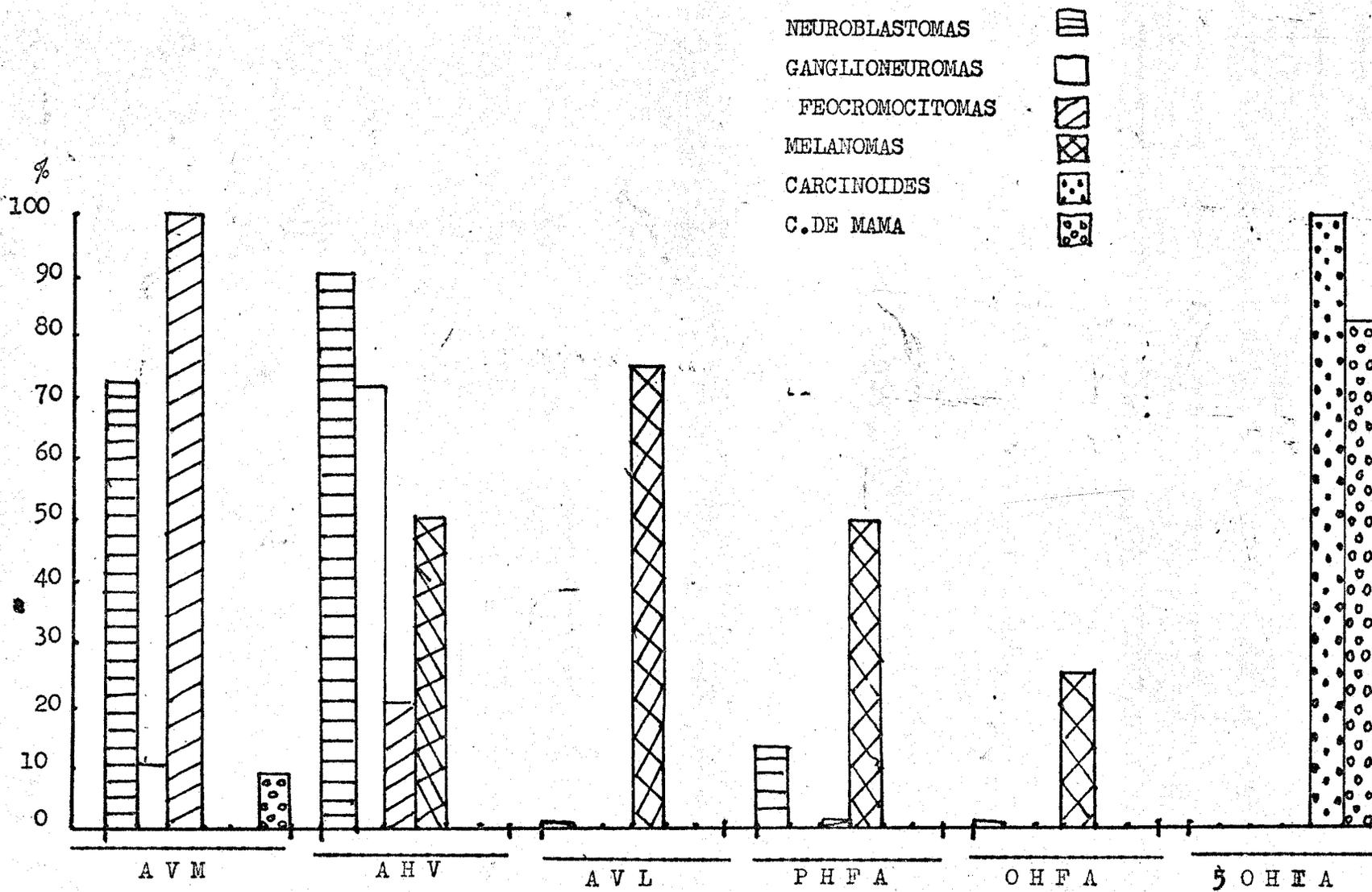
Solo en un caso el PHFA resulto ligeramente aumentado en el feocromocitoma.

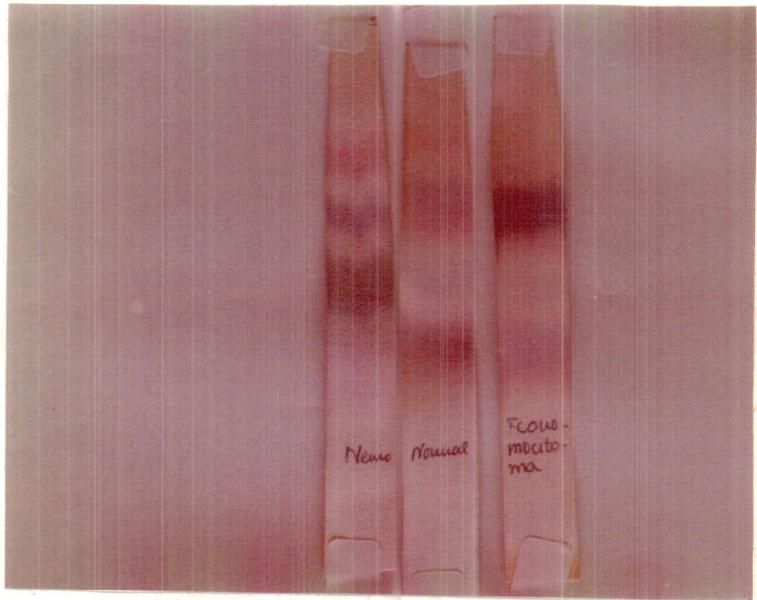
Respecto a los ganglioneuromas el metabolito principal encontrado en aumento fué el AHV aunque con menor frecuencia que en los neuroblastomas y no en menor cantidad que en estos; También encontramos en un 11 por ciento de los casos un aumento de AVM.

En los melanomas el AVL resulto marcadamente aumentado, sobre todos en los últimos estudios de la enfermedad. Esto ocurrio en un 75 por ciento de los casos. Ligeros aumentos de AHV ocurrio tambien en un 50% de los casos y aumento del OHFA en un 25 por ciento. No obstante al tener tan pocos casos, solo 4, creemos que estas dos últimas cifras sobre todo no tienen significación estadística, quedandonos solo con el aumento de AVL, cosa que ademas va de acuerdo con las publicaciones del Dr. Hans Kasser del

<u>TIPO DE TUMOR</u>	<u>A V M</u>	<u>A H V</u>	<u>A V L</u>	<u>P H F A</u>	<u>O H F A</u>	<u>5 O H I A C</u>
NEUROBLASTOMAS	77.8 %	91.5 %	1.77 %	14.16 %	0.88 %	0 %
GANGLIONEUROMA	11.1	77.78	0	0	0	0
FEOCROMOCITOMA	100	20	0	1	0	0
MALANOMAS	0	50	75	50	25	0
CARCINOIDES	0	0	0	0	0	100
C. DE MAMA	9.17	0	0	0	0	83.3

AUMENTO DE LOS DIFERENTES METABOLITOS EXPRESADOS EN %





Cromatografía monodimensional en papel en donde se compara el espectro que presenta un Neuroblastoma, un Feocromocitoma y un sujeto normal.

Tifenan Spital de Berna.

Respecto al constante aumento del 5OHIA encontrados en los carcinoides y C. de mama por no ser tumores derivados de la cresta neural objeto de este trabajo no haremos más comentarios.

En cuanto a los muy numerosos casos de hipertensión esencial estudiados por nosotros, mas de 1000, hemos de decir que excepto los casos en que se demostro la presencia de un feocromocitoma en los demas no hemos encontrado en ninguno de ellos alteración alguna en la excreción de los metabolitos estudiados.

No sabemos si la extensión o la malignidad del tumor podría tener un reflejo en cuanto al estudio bioquímico se refiere lo que si hemos comprobado en aquellos casos de neuroblastomas y feocromocitomas en los que hemos podido seguir su evolución despues de la intervención es que inmediatamente despues de la intervención las cifras han descendido bruscamente para desgraciadamente en un 99% de los casos ir subiendo paulatinamente como expresamos en las gráficas de la siguiente página correspondientes a un caso de neuroblastoma en un niño de 3 años y en un caso de feocromocitoma de un adulto que aún vive y que periodicamente se controle.

Tambien en los melanomas la excreción de AVL aumenta, conforme aumenta la extensión del proceso. En el unico caso de melanoma en el que pudimos hacer la determinación cada

5 días el aumento de excrección fúe notablemente elevado y aunque en la época en que hicimos estas determinaciones no poseíamos el patron de AVL para poder comprobar y comparar con el fin de obtener el valor cuantitativo - no obstante, con solo la visión de la mancha de AVL nos podemos hacer una idea del aumento tan extraordinario de excrección.

mgs/24 horas

22

Intervencion

A.V.M.

18

14

10

6

2

1

2

3

4

5

6

7

C O N T R O L E S

mgs /24 horas

10

A.H.V.

8

6

4

2

1

2

3

4

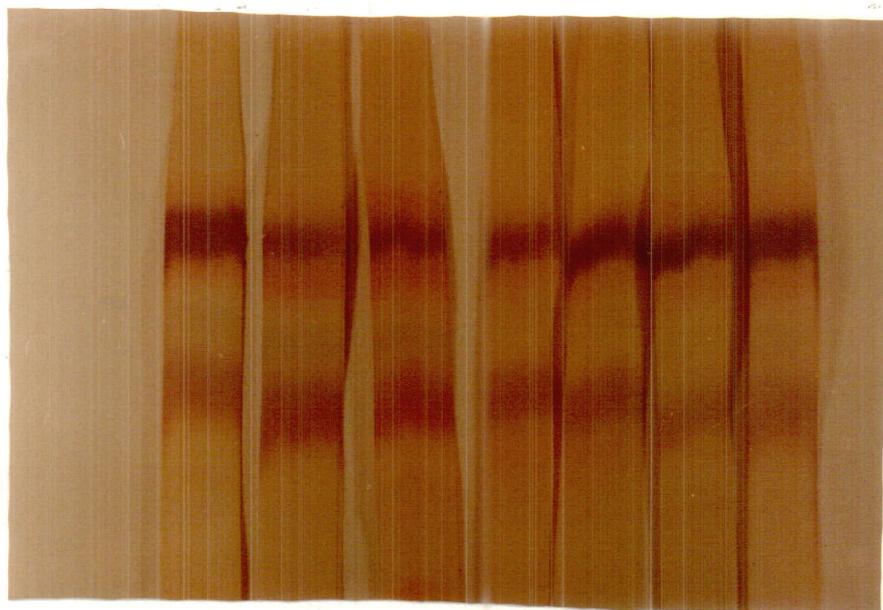
5

6

7

C O N T R O L E S

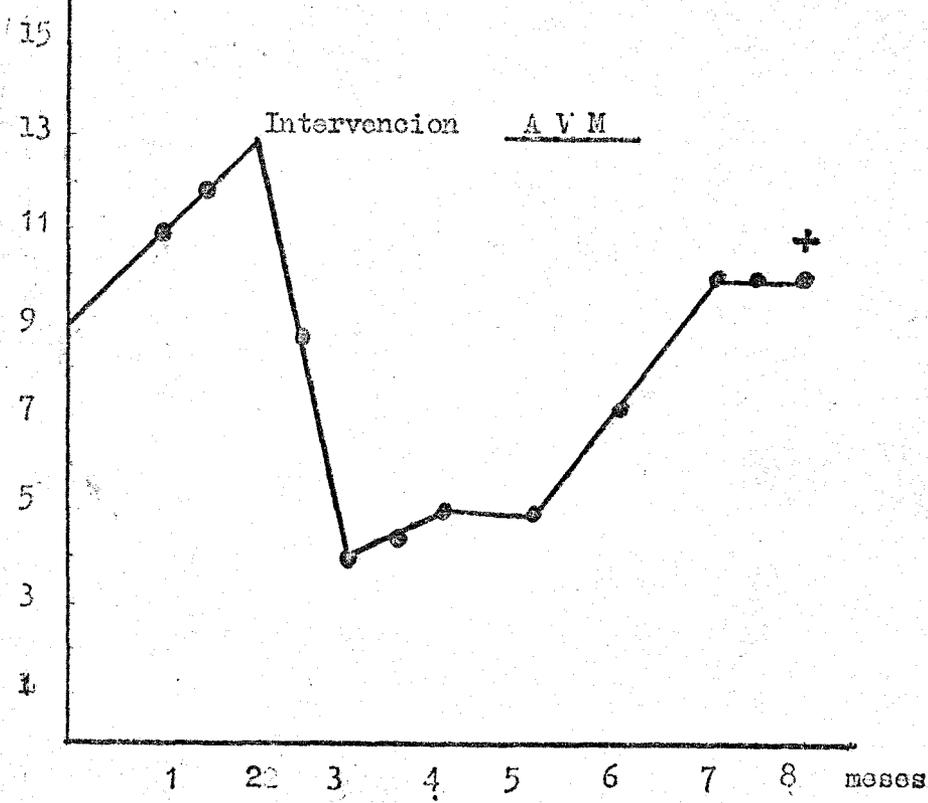
EVOLUCION DE UN FEOCROMOCITOMA



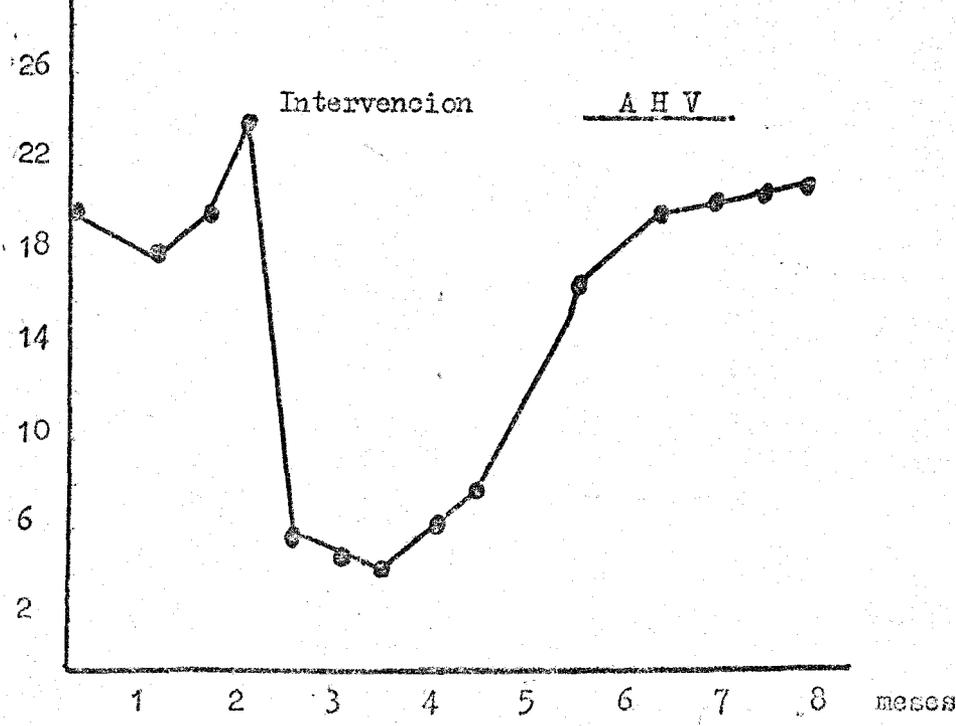
EVOLUCION DE UN FEOCROMOCITOMA.-Cromatografia

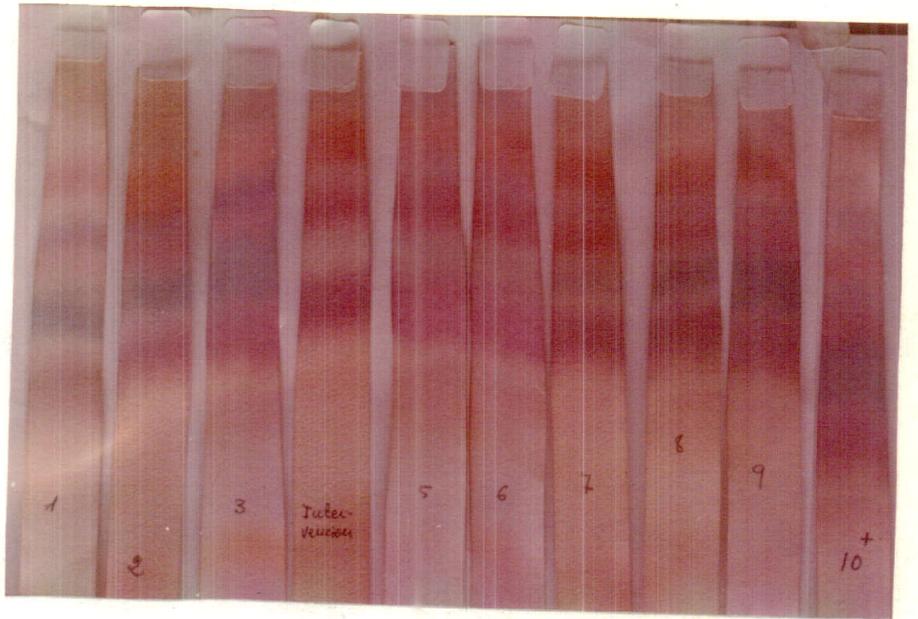
monodimensional en papel

mgs/24 horas

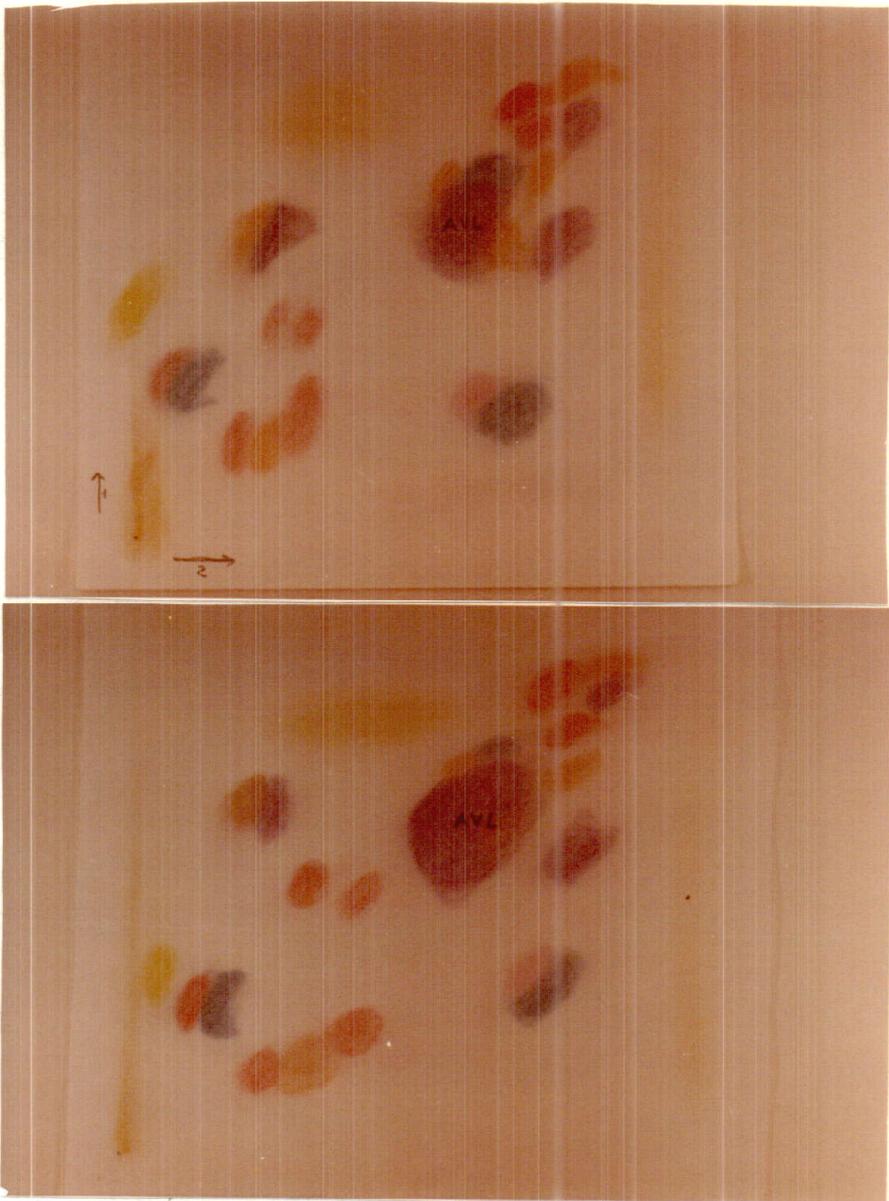


mgs /24 horas





EVOLUCION DE UN CASO DE NEUROBLASTOMA= Cromatografía monodimensional en papel



Esquema de la evolucion de un melamona. Cromatografia bidimensional en papel donde se puede apreciar el aumento de la mancha de A.V.L.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

- 1ª De todos los métodos existentes para la determinación de los metabolitos de las catecolaminas los métodos cromatográficos son los que en la actualidad presentan mayores ventajas tales como: rapidez, economía y posibilidad de hacer una "Biopsia bioquímica" del tumor en una sola determinación. Detrás de estos métodos bioquímicos son los fluorimétricos -- los que mas recomendamos. Los colorimétricos y biológicos por su falta de especificidad y de sensibilidad son hoy día desechable.
- 2ª La recogida de orina para estas determinaciones ha de ser hechas en condiciones standar y que consta.
- A.- Prohibición de tomar durante 2 días antes de la recogida de orina los siguientes alimentos y medicamentos.
- a) Cualquier medicamento antihipertensivo, vasoconstrictores y vasodilatadores. También tranquilizantes de cualquier tipo.
 - b) Tetraciclinas y neomicinas
 - c) Café, te, chocolate, vainilla platano y cualquier alimento que contenga gran cantidad de vitamina C.
- B.- Durante el día de la recogida de orina el paciente no debe encontrarse en situación de stress.

C.- La orina debe ser recogida en medio ácido de pH aproximadamente 1 a 2 lo que se consigue añadiendo unos 6 c.c. de ClH puro.

D.- La orina una vez recogida debe ser guardada en sitio fresco y al abrigo de la luz y enviada lo antes posible al laboratorio.

3ª La recogida de los demás líquidos biológicos tales como sangre se hace en bote heparinizado conteniendo metabisulfito sódico 0,5 mgrs por c.c. de sangre. El LCR también debe ser tomado con metabisulfito y guardar en nevera y en oscuridad hasta su envío al laboratorio.

4ª Creemos que como método de "scrining" debe ser utilizado la cromatografía monodimensional según el método que se describe en este trabajo.

5ª A toda muestra no normal según la cromatografía monodimensional es necesario hacer una cromatografía bidimensional a fin de separar mejor las manchas de los metabolitos que nos interesan dosificar.

6ª Dado que algunas sustancias como el AVL no son bien aislados en cromatografía monodimensional, en pacientes con diagnóstico de melanoma debe realizarse una bidimensional.

7ª Según el presente trabajo los neuroblastomas presentan una elevada excrección de ácido homovanilínico en un 91,15 % de los casos y una elevada excrección

de AVM en un 77,8% de los casos.

8ª Los feocromocitomas presentan un aumento de AVM en un 100% de los casos y un aumento de AHV en un 20% de los casos.

9ª El aumento de excrección de APHFA debe obligar a repetidas dosificaciones de los metabolitos de las catecolaminas.

10ª Al igual que los neuroblastomas los ganglioneuromas presentan tambien un aumento en la excrección de AHV aunque este aumento no suele ser tan marcado como en los neuroblastomas y su frecuencia es según nuestros estudios de un 77,7% frente a un 91,15 % encontrado en los neuroblastomas.

11ª Los melanomas tienen como principal producto de excrección, en lo que se refiere a metabolitos de las catecolaminas al ácido vanil láctico AVL en un 75% de los casos.

12ª El aumento de AVM de los neuroblastomas es siempre menor que en los feocromocitomas y el aumento de AHV de los neuroblastomas es siempre mayor que en los -- feocromocitomas.

13ª En las hipertensiones cuyo origen no sean tumores -- de la cresta neural los metabolitos de las catecolaminas no se modifican.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON P.J.y D'ORIO .--Biochemi.Pharmacol 17, 1943,1949(1968)
- ARENDF J CONTRACTOR S.F. .--Biochem.Pharmacol 16,413-418 (1967)
- ARMSTRONG M.D. Y MAC MILLAN.-- Pharmacol Rev 11,394-401 (1959)
- ARMSTRONG M.D. MAC MILLAN A. .--Fed Proc 16,146 (1958)
- ARMSTRON M.D. MAC MILLAN .!- PHARMACOL Rev 13 ,201,206 (1959)
- ARMSTRONG Y Shaw K.N. .--Biochem biophys Acta Amst. 218 .--293
- ARMSTRONG Y SHAW Y WALL =! .-- J.Biol Chem 218.-- 293
- ARMSTRON Y MAC MILLAN .--Biochem. biophys Acta 25,422-423 (1957)
- AXELROD J.--Science 140,499-500 (1963)
- AXELROD J. .--Physiol .Rev 39,751-775 (1959)
- AXELROD J., INSCOE J.K. SENOH S yWITKOP .!-Biochim biophys Acta
(Amst) 27.--210
- AXELRODJ .-- Physiol Rev 39,751 (1959)
- AXELROD J.--Journal biol Chem,237,1660 (1962)
- BETTEK ,M.y KASSER H.- Arch.dis Child 37.-- 138
- BELL ,M .;ELSEVIER .-- Publ.Co. Amsterdam London 1963
- BELL M y STEWARD J.K.-- Lancet i:1061,1961
- BOHUON C. Rev franc Etud clin .biol. 9:165-169,1964
- BERTLER ,A. CARLSSON .-- Acta Physiol Scandinav 44:273-292 (1958)
- BLASCHKO H- J.PHYSIOL (Lond) 96,50-51P (1939)
- CARLSSON A.RASMUSSEN HB.KRISTJANSSEN P. -Jour Neurochem 4: 318-320
1959
- CARLSSON .WALDEK, .--Acta Pphysiol Scandinav 44:293-298.(1958)
- CHAPTAL J JEAN R CRASTES DE PAULET =BONNET .--Pediatria 18:417-425

CHIRIGOS M.A. GREENGARD P. UNDEFRIEND .-J. Biol Chem 235-275 (1960)

COHEN R.A. Ann. Inter Med. 56, 960 (1962)

Creveling C.R. LEVIT M. UNDEFRIEND.- Life Scandinav 1:523-526 (1962)

DONATH A. KASER H. ROOS B. ZIEGLEC, W OETIKLER . COLOMBO J.P. y BETTEK
Helv paediat. acta. 20:1-18 (1965)

DUCHON J. GREGORA V.- Clin Chim. Acta 7: 443 (1962)

DUKE W.M. PHILLIPS M.W. DONALD .- Amer. med Ass 193 :20 (1965)

v. EULER U.S. FRANKSSON ^C HELLSTRON .- ACTA Physiol Scandinav 31:6, (1964)

v. Euler U.S. .- Shem C. Thomas (1956)

v. EULER U.S. y HELLNER S. .- Actaphysiol scandinav 22:161 (1951)

FRIEDMANN S. KAUFMAN S. .! J. Biol Chem 240:552 (1965)

GETROT T. LAGERLOF B WERSALL .- Acta otalaring (Stockh) 188:220 (1963)

GITLOWS. E. MENDELWITZ .!- J. Clin. Invest 39:221 (1960)

GJESSING L R - J. Clin Labor Inves. Scandinav 16:661-669 (1954)

GJESSING L R .- J. Clin Labor Invest. Scandinav. 15:649-653: (1963)

GLENNER G.G. CROUT J .R. ROBERTS W.C. .- Arch Path 73:231 (1962)

GOODALL Mc KIRSCHNER N y ROSEN .- J. Clin Invest 38:707 (1959)

GREEN M. COOKE R. LATTANZI .- Pediatrics Springfield 24:683-684 (1959)

GREER M. WILLIAMS C.M. .- Clin Res. 11:46 (1963)

GREEMBERG y GADNER .- Pediatrics Springfield. -24: 683-684 (1959)

GREEMBERG y GADNER .- J. Clin Invest 39:1729-1960

HAGGENDAHL .- Acta Physiol Scandinav 59: 242 1963

KASER H. - Schweiz med Wschr 91:586 (1961)

KASER H. .- Schweiz medicin Wochenschrift 8: 258-262 (1966)

KASER H. STUDNITZ =! J. Dis Child 102: 199-204, (1961)

KASER H. .- Journees Peddiatriques, Lanord, Paris 1961

- KASER ,STUDNITZ,A. SJOERDSMA England Journal of Medicina 269:232-235 1966
- KASER Pharmacological Reviews 18: 659-665 . 1966
- KASER, M.BETTEX ,W,v,STUDNITZ .- Archives of disease in Child 204,39,
168-171 1964
- HANSON ,A. V STUDNITZ Clin Chim Acta 11: 384-385 , 1965
- HERRLICH ,P y SEKERIS , D.E. .- Hoppe - Seyl Z. 339:249-250,1964
- HOLTZ P.-Naturwissenschaften 27: 724, (1939)
- ISAACS ,H.MEDALIE,M. POLITZER ,W. .- Brit Med J. 1: 401-404,1959
- JACOBS S.L. SOBEL,C. y HENRY,R.J. .- J Clin Endocrin. 21:315-320,1961
- KASER H.- Journes Pedriatiques,Paris p 203
- KASER ,H. .- Akad Med Wis 17:322-328(1961)
- KASER,H .- Journes Pedriatiques ,Lanord Paris (1961)
- KASER ,H.- Schweiz med Wschr 91:586-589 (1961)
- KASER;H. BETTEX,M. STUDNITZ .- Arch,Dis. Childh 39:168-171 (1964)
- KASER,H.SCHXEISGUTH,O.SELLEI .-Helv med acta 30:628-639 41963)
- KASER ,H.STUDNITZ.-Amer J. Dis Child 102:199-204,(1961)
- KOGUT,MD. KAPLAN .- J.Pediatriquez 60:694-704(1962)
- KONTRAS ,S.B. .- Cancer 15:978-986,1962
- KONTRAS,S.B.- Cancer Chemother .Rep. 16:443-453,1962
- LA BROSSE ,E.H.- Science ,128,593
- LA BROSSE ,E.H.-J. clin. Invest .40,253
- LEBOEF ;G EBERLEIN , WS STEIKER .- Amer J. Dis.Child .102:693, 1961
- LEEPER ,L.CW Weissbach,H;Udenfriend ,S .- Arch Biochem; 77, 417
- LEVER ,J.D.;LEWIS P.R.- J. Anat (Lond) 93,478 (1959)
- LEVIN E.Y.;LEVENBERG B. : J.Biol Chem. 235 , 2080 (1960)
- LOVENBERG W;WEISSBACH H. : J. biol. Chem . 237, 89 (1962)
- MARSDEN,H.B. , STEWARD ,J.K. :J.Clin .Path . 17:411-417, 1964

MASON, G.A.; HART-MERCER .: Lancet 2: 322-325, 1957

NADLER H.L. , HSIA D.Y. : Proc . Soc exp .Biol .(N.Y.) 107,721 (1961)

NAGATSU T.; LEVITT M. :J. Biol.Chem.239,2910(1964)

OATES ,J.A. Year Book Medical , 1961.Pp.169-174.

PISANO ,J.J. ;Crout,J.R.: Clin . Chim . acta 7 :285-291, 1962

PISANO ,J.J. Clin .Chim . acta 5 : 406-414 , 1960

POTTER ,L.T. , AXELROD J.: J.Pharmacol .exp Ther .142,291(1963)

POTTER L.T. ;AXELROLD J. : J. Pharmacol . exp .Ther 142 , 299(1963)

RENNICK B. ,YOSS N.: J. Pharmacol . exp . Ther 138, 347(1962)

ROBINSON,R. , SMITH ,P. .Clin = Chim .Acta 7 : 29-33, 1962

ROBINSON ,R.;SMITH ,P. - Brit. med. J.1:1422-1424, 1964

ROBINSON ,R. ;RATCLIFFE J.:J.Clin .Path.12,541(1959)

ROBINSON ,R.RATCLIFFE ,J. and SMITH ,P. (1960) : Nature (Lond)186,240

ROSENSTEIN ,B.J. ;ENGELMAN ,K. :J.Pediat.63:217-226, 1963

SACREZ ,R.JUIF,J.G.:Sem . Hop. Paris (Ann.Péd.)39:1978-1985, 1963

SMELLIE ,J.M. ;SANDLER ,M.: Proc.R.Soc .Med.54:327-329, 1961.

SANDLER ,M.: Personal Communication 1964

SANDLER ,M. ;RUTHVEN ,C.R.J. Lancet 2: 114-115 ,1959

SIEGEL J.H. Gilmore J.P.: Circulat. Res 9,1336(1961)

SMITH A.A. ;TAYLOR T.: New Engl . J. Med .268, 705(1963)

SMITH ,P. Nature 205:1236, 1965

SMITH R.A. WHITEHEAD ,T.P.Arch. Dis.Childh.36:82-89, 1961

SOURKES ;DENTON , R.L..Federation Proc.21 :192, 1962

SOURKES ,T.L.DENTON ,R.L.Pediatrics, Springfield 31:660-668, 1963

STICKLER ,G.B.;HALLENBECK,G.A.:J.Dis .Chil.104:598-604, 1962.

STICKLER ,G.B. HALLENBECK,G.A.:Preliminary report.Procc.Staff Meet
Mayo Clin .34 :548-, 1959

STIKLER ,G.B. HARLENBECK,G.A.:Amer .J.Dis.Child .104:598-604, 1962

- STICKLER ,G.B. FLOCK,E.V. :Cancer Chemother.Rep .16:439442, 1962
- VON STUDNITZ,W.:Clin .Chim . Acta 6:526-530,1961
- Von STUDNIZ ,W. :Klim .WCHNSCHR. 40:163-167, 1962
- VON STUDNITZ,W. S:Lancet 2, 215 (1961)
- V STUDNITZ,W.:J.Clin .Lab.Invest;12:(Suppl 48) 1960
- V STUDNITZ ,W.:Scand.J.Clin.Lab.Invest.;12, ~~Suppl 48~~ 101
- V STUDNITZ,W.:New Engl.J. Med.269:232-235, 1963
- V STUDNITZ ,W. :Lancet 1961/II , 212
- V STUNITZ ,W. :Scandinav.J. Clin;Lab. Investigation 12 (Supp48) 1-73,196
- SUNDERMAN ,F.W.,Jr .:Amer.J.Clin. Path.42:481-497, 1964
- UDENFRIEND,S.:Tyrosine hydroxylase . 2ndInternational Catecholamine
Symposium, Mailand 1965.(Erscheint 1966als Supplement von
Pharmacol . Rev.)
- VENDSALU,A.: Acta physiol .scand.49, Suppl.173 (1960)
- VOORHESS, M. L. GARDNER ,L.I. :Lancet 2:651, 1960
- VOORHESS .M.L. ;GARDNER,L=I.:J.Clin. Endocrin.21:321-335,1961
- VOORHESS,M.L.; GARDNER,L.I.: J.Clin.Endocrin.22: 126-133,1962
- VOORHESS ,M.L.; GARDNER,L=I. PediatricsSpringfield 30:241-246, 1962
- VOORHESS M.L.;GARDNER L.I.:Follow-up report.Amer J.Surg106:33-35,1963
- WILLIAMS,C.M.; GREER ,M. :Clin. CHIM.Acta7: 880-883, 1962.