

Metanefrinas plasmáticas: mayor eficacia en el diagnóstico bioquímico del feocromocitoma

G. CASALS^a, E. CALVO^a, C. FERRAN^a, I. HALPERIN^b y W. JIMÉNEZ^a

^aServicio de Bioquímica y Genética Molecular. Laboratorio de Hormonas. Centro de Diagnóstico Biomédico. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona. España.

^bServicio de Endocrinología. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona. España.

PLASMA METANEPHRINES: IMPROVED ACCURACY IN THE BIOCHEMICAL DIAGNOSIS OF PHEOCHROMOCYTOMA

Introduction: The optimal approach to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma is currently being debated, due to the possibility of determining plasma free metanephrines, which show high diagnostic accuracy. In addition, evaluation of this parameter in plasma samples would overcome the problems associated with collecting 24-hour urine samples. The aim of this study was to assess the diagnostic efficacy of fractionated plasma free metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma.

Material and methods: In all patients evaluated for pheochromocytoma over a 1-year-period in our hospital (n = 137), urinary excretion of total metanephrines and catecholamines was determined in parallel with plasma free metanephrine concentrations through immunoassay.

Results: Five histologically confirmed pheochromocytomas were diagnosed. Plasma metanephrines gave no false negative results and only one false-positive result. Urinary catecholamines and metanephrines gave no false-negative results but produced 12 and 13 false positive results, respectively. Thus their specificity was significantly lower than that of plasma free metanephrine determination.

Conclusion: Determination of plasma free metanephrines concentrations through immunoassay is a highly effective technique for the diagnosis of pheochromocytoma that can be used in most laboratories. Consequently, it is a valid alternative to urinary determinations.

Key words: Pheochromocytoma. Metanephrines. Immunoassay. Catecholamines.

Introducción: La aproximación óptima al diagnóstico bioquímico del feocromocitoma es tema de debate debido a la posibilidad de determinar las metanefrinas plasmáticas libres, que muestran un elevado poder diagnóstico. Además, presentan la ventaja de eliminar los inconvenientes relacionados con las muestras de orina de 24 h. El objetivo del estudio es analizar la eficacia en el diagnóstico de feocromocitoma de las metanefrinas plasmáticas libres fraccionadas.

Material y métodos: A todos los individuos evaluados para la detección de feocromocitoma durante un año en nuestro hospital (n = 137) se les determinaron las concentraciones de metanefrinas y catecolaminas totales en orina y, paralelamente, de las metanefrinas plasmáticas libres mediante inmunoensayo.

Resultados: Se diagnosticaron 5 feocromocitomas, confirmados histológicamente. Las metanefrinas plasmáticas no presentaron ningún resultado falso negativo y sólo un falso positivo. Las catecolaminas y las metanefrinas en orina no ofrecieron ningún falso negativo, aunque mostraron, respectivamente, 12 y 13 falsos positivos, lo que dio como resultado una especificidad significativamente inferior a las metanefrinas plasmáticas.

Conclusión: La determinación de las metanefrinas plasmáticas libres mediante técnicas de inmunoensayo supone la incorporación de una prueba de gran eficacia para el diagnóstico del feocromocitoma asequible para una gran mayoría de laboratorios; por tanto, es una alternativa válida a las determinaciones urinarias.

Palabras clave: Feocromocitoma. Metanefrinas. Inmunoensayo. Catecolaminas.

INTRODUCCIÓN

Los feocromocitomas son tumores que producen, almacenan y secretan catecolaminas. Derivan generalmente de la médula suprarrenal, pero también pueden desarrollarse a partir de las células cromafines de los ganglios simpáticos (feocromocitomas extrasuprarrenales o paragangliomas).

Se trata de tumores poco frecuentes, con una incidencia anual aproximada de 2 a 8 casos por millón de habitantes^{1,2}. Sin embargo, la ausencia de diagnóstico y tratamiento puede comportar graves consecuencias, mientras que el diagnóstico y la posterior resección del tumor revierten los síntomas y consiguen la normalización de la presión sanguínea en muchos casos.

Correspondencia: Dr. G. Casals.
Laboratorio de Hormonas. Centro de Diagnóstico Biomédico.
Villarroel, 170, esc. 7.ª, planta 5.ª. 08036 Barcelona. España.
Correo electrónico: casals@clinic.ub.es

Manuscrito recibido el 1-6-2005; aceptado para su publicación el 18-7-2005.

Por ello, su diagnóstico es importante y debe considerarse ante una hipertensión mantenida o intermitente, asociada a menudo a paroxismos, así como ante hipertensión lábil, hipertensión resistente a tratamiento antihipertensivo y paroxismos o crisis hipertensivas.

Las pruebas utilizadas en el diagnóstico bioquímico de feocromocitoma pueden variar en diferentes laboratorios. En algunos centros se realiza la medición de catecolaminas plasmáticas, mientras que otros autores son partidarios de las determinaciones urinarias. El hecho de que los feocromocitomas puedan secretar catecolaminas de forma intermitente o en cantidades pequeñas ha llevado a la combinación de varias pruebas bioquímicas entre las que se incluye la medición de las metanefrinas en orina, metabolitos O-metilados de las catecolaminas, que pueden determinarse mediante métodos espectrofotométricos.

Sin embargo, la aproximación al diagnóstico bioquímico del feocromocitoma presenta actualmente un replanteamiento debido a la posibilidad de determinar las metanefrinas plasmáticas libres. Éstas han demostrado un poder diagnóstico superior a las demás pruebas, y han sido recomendadas como prueba de elección única para el diagnóstico de feocromocitoma por varios autores³⁻⁵.

En el presente estudio se comparó la utilidad diagnóstica de las metanefrinas plasmáticas libres con la de la determinación de las metanefrinas y catecolaminas totales en orina. Se estudió a todos los individuos referidos a nuestro hospital que presentaban características clínicas compatibles con el diagnóstico de feocromocitoma. También valoramos las ventajas y los inconvenientes derivados del uso de uno u otro procedimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos

El estudio se realizó en un total de 137 individuos evaluados para la detección de feocromocitoma de marzo del 2004 a febrero del 2005 en el Hospital Clínic de Barcelona. Los sujetos estudiados presentaban síntomas o hipertensión arterial con características indicativas de tumor productor de catecolaminas, imagen radiológica anormal en la glándula suprarrenal, historia previa de tumor o estudio de feocromocitoma hereditario. El estudio se realizó siguiendo las normas del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic de Barcelona.

Determinaciones bioquímicas

Se determinaron las concentraciones de metanefrinas y catecolaminas totales en orina de 24 h como parte del protocolo para el diagnóstico de feocromocitoma. Paralelamente, se determinó la concentración de las metanefrinas plasmáticas libres fraccionadas, cuyos resultados no se utilizaron en el proceso diagnóstico.

Metanefrinas plasmáticas libres fraccionadas

Las muestras sanguíneas para la determinación de las metanefrinas plasmáticas (metanefrina y normetanefrina) se

obtuvieron en un tubo de 10 ml, con EDTA como anti-coagulante, tras 20 min de reposo en posición de decúbito supino. Las determinaciones se efectuaron mediante un inmunoensayo enzimático competitivo que permite la cuantificación, por separado, de normetanefrina y metanefrina libres en suero/plasma (Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG® Nordhorn, Alemania). En este inmunoensayo, las metanefrinas de la muestra son inicialmente transformadas en sus correspondientes derivados N-acil. En las placas de microtitulación se encuentran ligadas moléculas de metanefrinas, que compiten con las metanefrinas aciladas de la muestra por un número fijo de sitios de unión a un anticuerpo no ligado a la placa. Tras un lavado que elimina las metanefrinas aciladas libres y unidas al anticuerpo, los anticuerpos que se han unido a las metanefrinas de la placa son detectados por un segundo anticuerpo que usa tetrametilbenzidina como sustrato. La reacción se monitoriza a 450 nm, y la cantidad de anticuerpo unido a las metanefrinas de la fase sólida es inversamente proporcional a la concentración de metanefrinas de la muestra.

Catecolaminas y metanefrinas totales en orina de 24 h

Las muestras de orina de 24 h fueron recogidas en frascos de plástico que contenían 15 ml de ácido clorhídrico, que proporciona un pH urinario ácido adecuado para la estabilidad de las catecolaminas. Se midió el volumen total de orina para calcular la cantidad de catecolaminas y metanefrinas presentes en la orina de 24 h. Para evitar interferencias con las determinaciones, se comunicó a los pacientes la necesidad de abstenerse de tomar café el día antes de la recogida de la orina de 24 h. Asimismo, se evitó, siempre que fue posible, el uso de antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la monoaminoxidasa, bloqueadores beta y contrastes radiográficos durante los 3 días previos a la toma de la muestra.

La determinación de las catecolaminas y metanefrinas en orina se realizó mediante un kit (Bio-Rad Laboratories GMBH® Múnich, Alemania) que permite su cuantificación mediante el uso de columnas de intercambio iónico. Las catecolaminas adsorbidas en la columna son eluidas con una solución ácida y oxidadas para formar compuestos fluorescentes. Éstos se estabilizan mediante una solución alcalina de ácido ascórbico y son subsiguientemente medidos en un fluorímetro. Las metanefrinas son eluidas de la columna mediante una solución de hidróxido de amonio, oxidadas a vainillín y medidas por espectrofotometría.

Análisis estadístico de los resultados

Se consideró como resultado positivo, en el caso de la metanefrina plasmática, una concentración superior a 90 pg/ml (457 pmol/l) y en la normetanefrina plasmática un valor superior a 200 pg/ml (1.087 pmol/l), valores proporcionados por el fabricante. También se analizó su poder diagnóstico tomando como *cut-off* el doble del límite superior del intervalo de referencia de los pacientes sin feocromocitoma de la muestra. En las catecolaminas y las metanefrinas totales en orina se consideró resultado positivo las concentraciones superiores a 100 µg/día y 1 mg/día (5,1 µmol/día), valores obtenidos a partir de series anteriormente evaluadas en nuestro centro.

En las pruebas bioquímicas que implicaron parejas de determinaciones (metanefrina-normetanefrina plasmáticas y catecolaminas-normetanefrinas urinarias), se consideró un resultado como verdadero positivo cuando uno o ambos re-

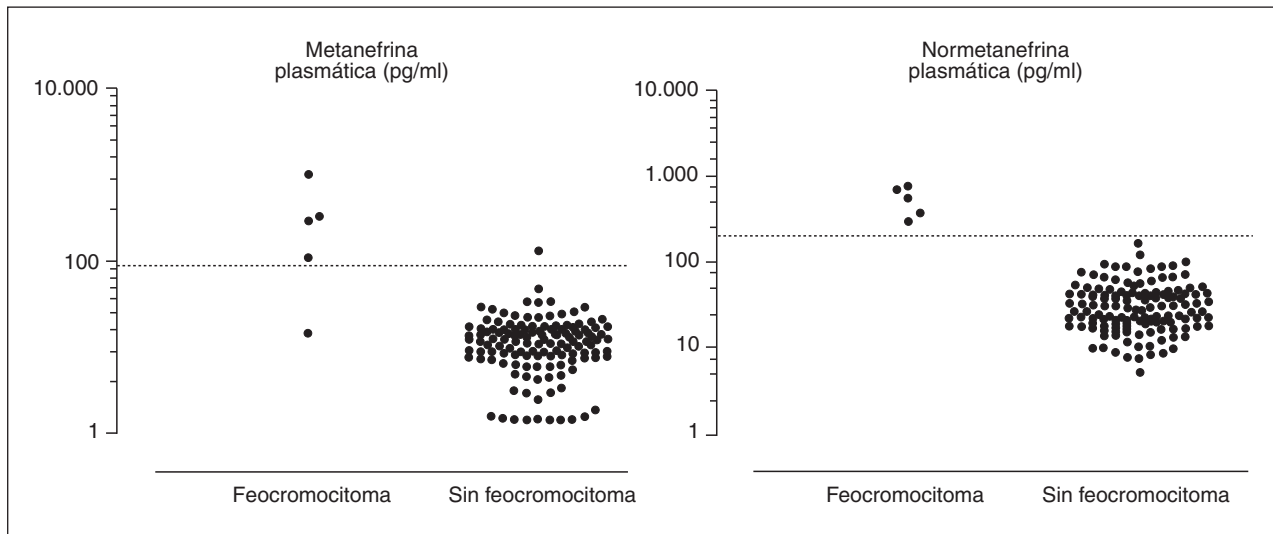


Fig. 1. Valores de metanefrina y normetanefrina plasmáticas en individuos con y sin feocromocitoma. La línea discontinua señala el cut-off diagnóstico.

sultados fueron positivos y existió confirmación de feocromocitoma; falso positivo cuando uno o ambos resultados fueron positivos en ausencia de feocromocitoma; verdadero negativo cuando ambos resultados fueron negativos en ausencia de feocromocitoma, y falso negativo cuando ambas pruebas presentaron un resultado negativo y se confirmó la presencia de feocromocitoma.

Se determinaron la sensibilidad y la especificidad de las metanefrinas plasmáticas libres, las catecolaminas totales en orina, las metanefrinas totales en orina y las catecolaminas junto con metanefrinas totales en orina. La sensibilidad se calculó como el porcentaje de verdaderos positivos sobre el total de pacientes con feocromocitoma. La especificidad se calculó como el porcentaje de verdaderos negativos sobre el total de pacientes sin feocromocitoma. Se compararon las especificidades diagnósticas mediante test de McNemar⁶.

RESULTADOS

En 16 de los 137 pacientes estudiados para el diagnóstico de feocromocitoma no fue posible la determinación simultánea de los parámetros bioquímicos plasmáticos y urinarios, a causa de una recogida de la orina en condiciones incorrectas. Además, en 3 individuos no fue posible descartar o confirmar la presencia de feocromocitoma, por lo que se les excluyó del análisis final. Por ello, la muestra estudiada se compuso de 118 individuos, 60 varones y 58 mujeres, cuya edad media fue de 51,7 años (rango, 19-82 años). No hubo diferencias significativas en la edad entre varones y mujeres. La valoración de la clínica y las pruebas radiológicas y bioquímicas (metanefrinas y catecolaminas totales en orina) condujo al diagnóstico de feocromocitoma, confirmado histológicamente tras cirugía, en 5 individuos, 4 varones y 1 mujer. Sólo 1 de los 5 casos de feocromocitoma fue de localización extrasuprarrenal (paraganglioma abdominal), mientras

que los 4 restantes fueron tumores suprarrenales. Ninguno de los feocromocitomas estuvo asociado con síndromes familiares como la enfermedad de Von Hippel-Lindau o neoplasia endocrina múltiple.

En los pacientes sin feocromocitoma se obtuvo un valor medio de la concentración de metanefrina plasmática de $13,8 \pm 13,2$ pg/ml y en la normetanefrina plasmática de $35,6 \pm 24,6$ pg/ml. En los 5 casos de feocromocitoma tanto la metanefrina como la normetanefrina plasmáticas sobrepasaron el límite superior establecido, excepto en el caso de paraganglioma abdominal, donde sólo la normetanefrina estaba elevada. No se encontró ningún resultado falso negativo en las metanefrinas plasmáticas libres fraccionadas, que sí presentaron un falso positivo. Sin embargo, las catecolaminas y las metanefrinas totales en orina presentaron, respectivamente, 12 y 13 resultados falsos positivos (figs. 1 y 2).

La sensibilidad de las metanefrinas plasmáticas libres fraccionadas fue del 100%, al igual que la sensibilidad combinada de metanefrinas y catecolaminas totales en orina (los 5 pacientes con feocromocitoma presentaron concentraciones elevadas). La especificidad de las metanefrinas plasmáticas fue del 99,1%. Sin embargo, las especificidades de las catecolaminas y metanefrinas totales en orina fueron, respectivamente, del 89,4 y el 88,5%, significativamente menores ($p < 0,05$) que las metanefrinas plasmáticas. La valoración conjunta de metanefrinas y catecolaminas totales en orina no pudo aumentar la sensibilidad, que en ambos casos ya era del 100%, pero disminuyó la especificidad hasta un 82,3% (tabla 1).

El límite superior del intervalo de referencia, calculado como la media más 2 desviaciones estándar, en la población sin feocromocitoma fue de 40,2 y 84,8 pg/ml, respectivamente, para la metanefrina y la normetanefrina plasmática. Sin embargo, el valor basado

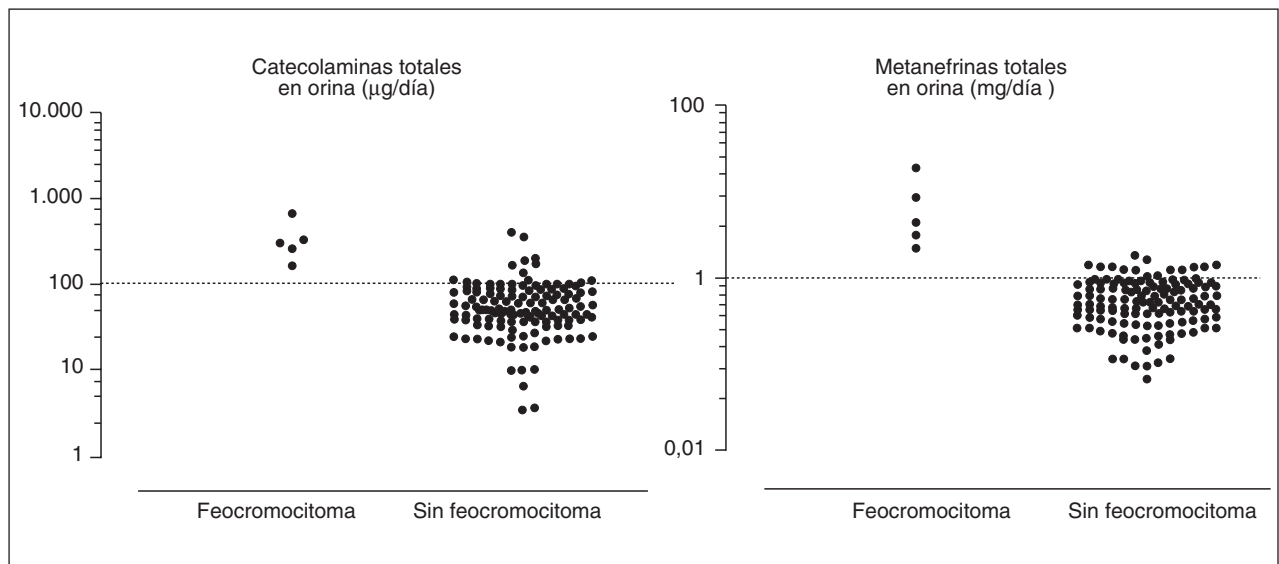


Fig. 2. Valores de catecolaminas y metanefrinas totales en orina en individuos con y sin feocromocitoma. La línea discontinua señala el cut-off diagnóstico.

TABLA 1. Comparación de la eficacia diagnóstica de las pruebas bioquímicas para la detección de feocromocitoma

Prueba bioquímica	Sensibilidad	Especificidad
Metanefrina y normetanefrina fraccionadas	5/5 (100%)	112/113 (99,1%)
Catecolaminas totales en orina	5/5 (100%)	101/113 (89,4%)
Metanefrinas totales en orina	5/5 (100%)	100/113 (88,5%)
Catecolaminas y metanefrinas totales en orina	5/5 (100%)	93/113 (82,3%)

en el 95% del intervalo de referencia poblacional no es adecuado como *cut-off* diagnóstico ya que pacientes con paroxismos o hipertensión mal controlada, pero sin feocromocitoma, con frecuencia superan este límite². El cálculo de la sensibilidad y la especificidad, tomando el límite diagnóstico propuesto por Kudva et al² –igual que el doble del límite superior del intervalo de referencia– mantuvo la misma sensibilidad del 100% y especificidad del 99,1%. Aunque supuso bajar el *cut-off* propuesto por el fabricante desde 90 a 80,5 pg/ml, en la metanefrina, y de 200 a 169,6 pg/ml, en la normetanefrina plasmática, no aumentó el número de falsos positivos.

Los pacientes afectados de feocromocitoma presentaron un aumento medio en la concentración de 7,6 veces para las metanefrinas urinarias y de 6,6 veces para las plasmáticas. El aumento de las metanefrinas urinarias fue superior al de las plasmáticas en 2 de los pacientes con feocromocitoma, mientras que el aumento de metanefrinas plasmáticas fue superior en 3 pacientes.

En los individuos sin feocromocitoma, se encontró una correlación positiva entre la concentración de normetanefrina plasmática y la edad. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos en ninguno de los parámetros estudiados.

DISCUSIÓN

Debido a los inconvenientes con frecuencia asociados con la recogida de orina de 24 h, especialmente en lo referente a la recolección incompleta de la muestra y la incomodidad para el paciente, se ha pretendido de forma insistente encontrar una prueba diagnóstica basada en la obtención de una muestra sanguínea. La posibilidad de utilizar muestras plasmáticas para el diagnóstico de feocromocitoma, sin la necesidad adicional de usar muestras urinarias, representaría un beneficio en muchos centros debido a la posibilidad de prescindir de la recogida de la orina de 24 h. La determinación plasmática en la mayoría de los casos únicamente representaría añadir una solicitud más a la petición de bioquímica general, sin necesidad de efectuar una extracción sanguínea suplementaria, y sería útil en algunos casos de insuficiencia renal. Además, supone un método de elección en pediatría por la dificultad de la recolección completa de orina de 24 h². Es conveniente mantener la obtención de la muestra plasmática en estado de reposo y posición de decúbito supino, condiciones idénticas a las que se utilizan para las catecolaminas plasmáticas, aunque existen estudios que indican que las metanefrinas plasmáticas son menos susceptibles que las catecolaminas a factores externos como el cambio de postura⁴.

Las pruebas bioquímicas actualmente disponibles para la confirmación o la exclusión de feocromocitoma presentan una sensibilidad y una especificidad elevadas. Sin embargo, la aproximación óptima al diagnóstico bioquímico de feocromocitoma es tema de debate. Deben tenerse en cuenta varios factores, como la eficacia diagnóstica de las pruebas, la realización de una o más pruebas y el coste que comportan, las ventajas y los inconvenientes del tipo de muestra (plasma

u orina) o las características de la población que se van a estudiar.

Los estudios se ponen de acuerdo en mostrar las metanefrinas libres en plasma como prueba más sensible. Basándose en el análisis de las curvas ROC, que muestran un mayor poder diagnóstico en las metanefrinas plasmáticas que en las catecolaminas y las metanefrinas en orina, incluso cuando éstas se combinan, varios autores proponen la determinación de las metanefrinas en plasma como única prueba que realizar³⁻⁵.

Sin embargo, a pesar del mayor poder diagnóstico global de las metanefrinas plasmáticas, varios estudios encuentran que su especificidad es ligeramente inferior a la de las metanefrinas en orina, que a su vez presentan una menor sensibilidad que las obliga a combinarse con las catecolaminas para evitar falsos negativos^{2,7}.

De los resultados obtenidos en nuestro estudio, sin embargo, destaca que mientras con las catecolaminas y las metanefrinas urinarias se encontraron, respectivamente, 12 y 13 resultados falsos positivos, sólo se encontró un falso positivo con la determinación mediante inmunoensayo de las metanefrinas plasmáticas, incluso tras situar el límite en el doble del límite superior del intervalo de referencia. Esta aparente contradicción entre nuestros resultados y los previamente descritos podría atribuirse, en parte, a una mayor especificidad analítica del método de inmunoensayo utilizado para la determinación de las metanefrinas plasmáticas respecto a los métodos espectrofotométricos utilizados para la determinación de las metanefrinas y las catecolaminas urinarias. No obstante, el número de pacientes incluidos en nuestro estudio a lo largo de 1 año no es tan elevado como en las grandes series evaluadas en otros estudios, lo que también puede contribuir a explicar las diferencias encontradas.

Por otro lado, varios autores encuentran una correlación significativa entre la edad y la concentración de normetanefrina en pacientes sanos, lo que se ha relacionado con un mayor número de falsos positivos en los pacientes de más edad⁷. En los individuos sin feocromocitoma de nuestra serie hallamos también una correlación positiva entre ambas variables. No encontramos diferencias significativas entre sexos en las concentraciones de ninguno de los parámetros bioquímicos evaluados en los pacientes sin feocromocitoma. Las metanefrinas en orina presentaron una elevación de magnitud proporcional a las plasmáticas en el conjunto de feocromocitomas.

En 3 individuos no fue posible determinar la existencia o no de feocromocitoma. Eran 2 pacientes con antecedentes de feocromocitoma y 1 diagnosticado de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN2), en los que las catecolaminas y/o las metanefrinas urinarias estaban elevadas.

Los estudios con grandes series para la evaluación de las metanefrinas plasmáticas se han realizado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía gas-líquido. En nuestro estudio se utilizó un método de inmunoensayo. Estudios comparativos entre

los inmunoensayos para las metanefrinas en orina y los métodos cromatográficos indican que los primeros son adecuados para establecer el diagnóstico de feocromocitoma⁸. El inmunoensayo es más accesible para la mayoría de laboratorios clínicos y es en este sentido una alternativa a las técnicas cromatográficas, de mayor complejidad. Aunque, desde un punto de vista teórico, la detección de interferencias en el inmunoensayo es más difícil que en la cromatografía, se ha descrito la ausencia de interferencias farmacológicas cuando se determinan las catecolaminas y las metanefrinas urinarias mediante inmunoensayo⁹. La revisión de la historia clínica de los 20 individuos con resultados falsos positivos en las metanefrinas y/o las catecolaminas urinarias en nuestro estudio revela la presencia de fármacos potencialmente interferentes en su determinación en 4 casos. Además, en 2 casos de catecolaminas urinarias elevadas los pacientes presentaban un contexto clínico grave, lo que es compatible con activación simpática no relacionada con la presencia de tumores de células cromafines. En todos estos casos, las concentraciones de metanefrinas plasmáticas no estuvieron elevadas.

En conclusión, la determinación de las metanefrinas plasmáticas libres mediante técnicas de inmunoensayo, supone la incorporación de una prueba de gran eficacia para el diagnóstico de feocromocitoma, asequible para una gran mayoría de laboratorios, con la capacidad de constituir una alternativa válida a las determinaciones urinarias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández-Calvet L, García-Mayor RV. Incidence of pheochromocytoma in South Galicia, Spain. *J Intern Med.* 1994;236:675-7.
2. Kudva YC, Sawka AM, Young WF Jr. The laboratory diagnosis of adrenal pheochromocytoma: the Mayo Clinic experience. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4533-9.
3. Lenders JWM, Keiser HR, Goldstein DS, Willemsen JJ, Friberg P, Jacobs MC, et al. Plasma metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma. *Ann Intern Med.* 1995;123:101-9.
4. Raber W, Raffesberg W, Bischof M, Scheuba C, Niederle B, Gasic S, et al. Diagnostic efficacy of unconjugated plasma metanephrines for the detection of pheochromocytoma. *Arch Intern Med.* 2000;160:2957-63.
5. Lenders JWM, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg HR, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which is the best test? *JAMA.* 2002;287:1427-34.
6. McNemar Q. Note on the sampling error of the differences between correlated proportions or percentages. *Psychometrika.* 1947;12:153-7.
7. Sawka AM, Jaeschke R, Singh RJ, Young WF Jr. A comparison of biochemical for pheochromocytoma: measurement of fractionated plasma metanephrines compared with combination of 24-hour urinary metanephrines and catecholamines. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:553-8.
8. Wolthers BG, Kema IP, Volmer M, Wesemann R, Westermann J, Man B. Evaluation of urinary metanephrine and normetanephrine enzyme immunoassay (ELISA) kits by comparison with isotope dilution mass spectrometry. *Clin Chem.* 1997;43:114-20.
9. Wassell J, Reed P, Kane J, Weinkove C. Freedom from drug interference in new immunoassays for urinary catecholamines and metanephrines. *Clin Chem.* 1999;45:2216-23.