

## **Efecto de las condiciones de conservación de la muestra de orina en el análisis de catecolaminas por HPLC**

### **Effect of the preservation conditions of urine sample in catecholamine analysis by HPLC**

Dayana Álvarez-Mejías <sup>(1)</sup>, Pamela Loaiza-Yee <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratorio Clínico, Hospital San Juan de Dios, CCSS

Artículo recibido el 29/05/2018

Aceptado para su publicación el 05/11/2018

Correspondencia: [dalvame20@gmail.com](mailto:dalvame20@gmail.com)

#### **Resumen**

A nivel de la Caja Costarricense del Seguro Social, la medición de catecolaminas únicamente se realiza en el Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios, por lo que se considera de suma importancia determinar el efecto de las diferentes condiciones de almacenamiento de la muestra sobre la estabilidad de las catecolaminas urinarias, así como verificar la precisión y veracidad de la metodología utilizada. Se utilizaron alícuotas de un pool de orina humana, las cuales se almacenaron bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y exposición a la luz. Las concentraciones de catecolaminas obtenidas se compararon contra una alícuota con las condiciones de almacenamiento recomendadas por el fabricante. La técnica utilizada fue cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico. La verificación de precisión y exactitud se realizó de acuerdo con la guía EP15 A2. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las condiciones de alteración de pH y el sometimiento de la muestra a tres ciclos de descongelado para la noradrenalina y dopamina; el almacenamiento de la muestra en refrigeración afecta los niveles de dopamina medidos. Niveles de pH entre 5.5 y 6.0 no conducen a oxidación de las catecolaminas en la muestra de orina. Los ciclos de descongelamiento provocan pérdida en la recuperación de las catecolaminas. Periodos cortos de exposición de las muestras de orina a la luz no provocan pérdida de estabilidad de las catecolaminas. Aunque existen diferencias estadísticamente significativas, las diferencias porcentuales entre las concentraciones determinadas no se consideran clínicamente significativas, pues no generan una interpretación diagnóstica distinta.

**Palabras clave:** catecolaminas, noradrenalina, adrenalina, dopamina, cromatografía líquida de alta resolución, detector electroquímico HPLC.

#### **Abstract**

In the Caja Costarricense de Seguro Social, the measurement of catecholamine is only carried out in the Clinical Laboratory of Hospital San Juan de Dios, so it's considered very important to determine

the effect of the different storage conditions of the sample on the stability of urinary catecholamine, as well as verify the accuracy and veracity of the methodology used.

Aliquots were used from a pool of human urine, which were stored under different conditions of pH, temperature and exposure to light, the concentrations of catecholamine obtained were compared against an aliquot with the storage conditions recommended by the manufacturer. The technique used was high performance liquid chromatography coupled to an electrochemical detector. The accuracy and accuracy verification were carried out in accordance with the EP15 A2 guide.

Statistically significant differences were found in the conditions of alteration of pH and the subjection of the sample to three thawing cycles for noradrenaline and dopamine; storage of the sample in refrigeration affects the measured dopamine levels. At pH levels between 5.5 and 6.0 there is no oxidation of catecholamine in the urine sample. Thawing cycles cause loss in the recovery of catecholamine. Short periods of exposing urine samples to light do not cause loss of stability of the catecholamine. Although there are statistically significant differences, the percentage differences between the determined concentrations are not considered clinically significant, since they do not generate a different diagnostic interpretation.

**Keywords:** catecholamine, noradrenaline, adrenaline, dopamine, high performance liquid chromatography, electrochemical detector, HPLC.

**Abreviaturas:** CT, catecolaminas; NA, Noradrenalina; AD, Adrenalina; DA, Dopamina; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; IC 95%, intervalo de confianza de 95%.

## Introducción

La noradrenalina (NA), la adrenalina (AD) y la dopamina (DA) son aminas biogénicas sintetizadas en el organismo a partir del aminoácido tirosina. Se les conoce como catecolaminas (CT); su estructura bioquímica consiste en un anillo de benceno con dos grupos hidroxilo y una cadena lateral de etilamina que le aporta especificidad funcional y estructural a cada una de ellas<sup>1</sup>. La síntesis de las CT ocurre de manera diferencial a nivel de sistema nervioso central en las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas, en los nervios del sistema simpático, a nivel de las células cromafines (neuroendocrinas) de la médula adrenal y en paraganglios periféricos<sup>1</sup>.

Las CT tienen un papel biológico importante, funcionan como neurotransmisores y neurohormonas en un amplio rango de procesos fisiológicos; de manera general, mantienen la homeostasis corporal, permiten adaptación al estrés agudo, controlan acciones cardiovasculares al aumentar la frecuencia y la fuerza de contracción del miocardio, generan vasoconstricción en muchos lechos vasculares; también intervienen en funciones metabólicas como la regulación de gluconeogénesis, glucogenólisis, disminución del catabolismo proteico y se relacionan con diversas funciones glandulares y órgano viscerales<sup>1</sup>.

La medición de las CT es importante cuando se sospecha su sobreproducción; en estos casos los signos y síntomas en el paciente reflejan, en la mayoría de los casos, la acción biológica ejercida por el aumento de su liberación; dicha elevación podría ser atribuible a la presencia de tumores neuroendocrinos. Se considera fundamental la medición de catecolaminas y sus metabolitos inactivos en el diagnóstico y seguimiento de feocromocitomas, paragangliomas y neuroblastomas<sup>1,2,3</sup>.

Los niveles detectados de catecolaminas están sujetos a una serie de condiciones preanalíticas de la muestra, ya sean estas sangre u orina. Se puede incurrir a errores que conducen a la obtención de resultados falsos positivos, como la elevación que producen algunos medicamentos, o los precursores de CT aportados por la dieta, también por condiciones fisiológicas como estrés, ejercicio y postura previos a la recolección de la muestra<sup>3</sup>. Por otra parte, se encuentran los errores preanalíticos que conllevan a resultados falsos negativos; los más frecuentes están relacionados con el proceso de recolección de la muestra, como lo es en el caso de una recolección incompleta de orina de 24 horas o una conservación inadecuada de la muestra<sup>1,3</sup>. Algunas de las situaciones mencionadas contemplan errores cometidos por parte del paciente, no obstante, otras están sujetas al manejo de la muestra en el laboratorio clínico. En este sentido, concerniente al manejo de muestras de orina de 24 horas, la recomendación para conservar la integridad de las CT en la muestra es acidificarla, ya que las CT son propensas a sufrir oxidación a pH alcalino, estas se transforman en quinonas<sup>1,4</sup>. Usualmente, se utiliza ácido clorhídrico (HCl), aunque el uso de metabisulfito de sodio y EDTA son otras alternativas estabilizantes<sup>5</sup>. Para periodos prolongados de almacenamiento, la temperatura indicada es una inferior a -18 °C; una vez terminada la recolección y hasta el momento de su procesamiento, se deben evitar los ciclos de congelamiento y descongelamiento de la muestra<sup>1</sup>. Las CT son susceptibles a oxidarse por exposición a la luz<sup>1,6,7</sup>, por lo que los frascos en los que se recolecta y almacena la muestra deben garantizar esta protección.

Se requieren métodos analíticos de gran sensibilidad para la cuantificación de las CT en las muestras biológicas, ya que estas se encuentran en concentraciones muy bajas. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el método de elección para dichos análisis. Estos, por ser compuestos fácilmente oxidables, se utilizan detectores electroquímicos<sup>1,4</sup>. Este tipo de detector mide la señal eléctrica generada por el cambio electroquímico de un analito por la pérdida o absorción de electrones resultante de su oxidación o reducción en la superficie del electrodo; la corriente producida se considera proporcional a la concentración de sustancia que fluye por la celda detectora; esta señal se amplifica y se visualiza como un cromatograma<sup>8,9</sup>.

Son objetivos de este estudio los aspectos preanalíticos concernientes a la preparación y almacenamiento de la muestra previo a su análisis por parte del laboratorio clínico. Actualmente, a nivel de la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS), la medición de CT y sus metabolitos únicamente se realiza en el Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios, por lo que se considera de suma importancia determinar si las diferentes condiciones en las que se reciben las orinas de 24 horas o alícuotas de ellas, provenientes de cualquier parte del país, podrían conducir a un deterioro o pérdida de la estabilidad de las CT en la muestra.

### **Materiales y métodos**

Se realizó un estudio analítico, experimental, con el objetivo principal de determinar el efecto de diferentes condiciones de almacenamiento de la muestra sobre la estabilidad de las CT urinarias; adicionalmente, se realizaron pruebas para verificar la imprecisión y veracidad reportada por el fabricante de la técnica utilizada para la medición de la concentración de las CT.

Como muestra se utilizó un pool de orina humana, preparado a partir de muestras de orinas de 24 horas recibidas en el Departamento de Radioinmunoanálisis del Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios para el análisis de catecolaminas urinarias. Las muestras de orina fueron recolectadas en un recipiente (forrado con papel oscuro y que contenía 10.0 ml de HCl al 32% en su interior) suministrado por el mismo servicio, de manera que se cumplieran con las especificaciones del manual instructivo del kit comercial utilizado para los análisis.

El pool obtenido es dividido en ocho alícuotas, las cuales se manejan bajo diferentes condiciones, previo y durante el almacenamiento (cuadro 1), hasta el día del procesamiento. Una de las alícuotas se mantuvo como muestra de referencia con los requerimientos de conservación indicados en el kit comercial (alícuota A), las demás alícuotas sufrieron variaciones en el pH (alícuota B), variaciones de la temperatura de conservación (alícuotas C1, C2 y C3), exposición directa a la luz previo al almacenamiento (alícuotas D1 y D2) y varias condiciones no apropiadas (alícuota E).

**Cuadro 1**

**Condiciones de almacenamiento de la muestra de orina para el análisis de catecolaminas**

<b>Alícuota A (Referencia)</b>	<b>Alícuota B (Sin ajuste de pH)</b>	<b>Alícuota C (Refrigeración/ciclos descongelado)</b>	<b>Alícuota D (Exposición luz)</b>	<b>Alícuota E (Todas condiciones alteradas)</b>
pH: 1.0-2.0*	pH: 5.5-6.0	pH: 1.0-2.0*	pH: 1.0-2.0*	pH: 5.5-6.0
<-18 °C	<-18 °C	Alícuota C1: Refrigeración  (4 °C-8 °C) x 5 días	<-18 °C	<-18 °C
1 descongelación	1 descongelación	Alícuota C2: 2 descongelaciones	1 descongelación	3 descongelaciones
		Alícuota C3: 3 descongelaciones	Alícuota D1: 3 horas exposición luz	6 horas exposición luz
Protección papel aluminio	Protección papel aluminio	Protección papel aluminio	Alícuota D2: 6 horas exposición luz	

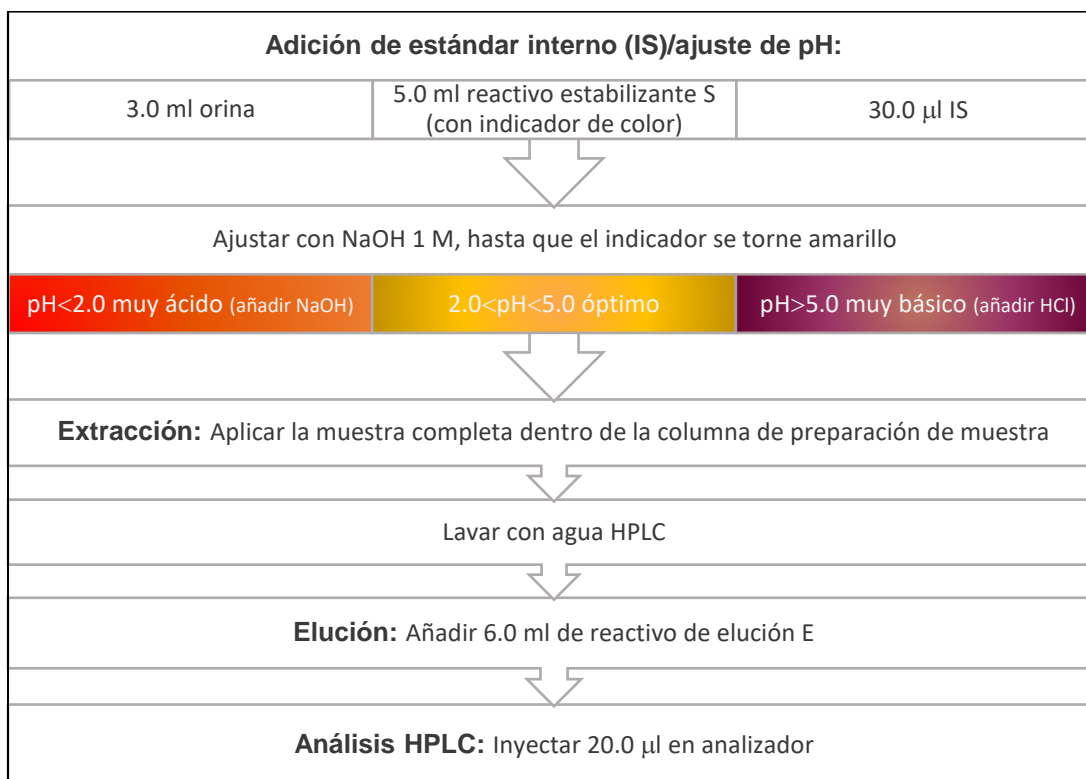
\*pH ajustado con HCl al 32%

Para la medición de las CT urinarias, se requiere un procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) de la muestra (Figura 1), la cual se realizó utilizando el kit comercial de reactivos ClinRep® HPLC Complete Kit Catecholamines in Urine REF 2000. Se utilizó un calibrador de orina ClinCal® REF 2013 RECIPÉ y dos niveles de control de aminas

biogénicas en orina ClinCheck® REF 8820 RECIPE, a los cuales se les realizó una SPE del mismo modo que las muestras en estudio. La alícuota A fue procesada 10 veces con el objetivo de obtener un coeficiente de variación (CV) de la repetibilidad de la técnica de extracción y cromatográfica; las demás alícuotas fueron procesadas por triplicado.

Figura 1

**Procedimiento de preparación y extracción en fase sólida de la muestra para la obtención de catecolaminas urinarias**



Los eluatos, obtenidos a partir de la SPE, fueron inyectados en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia SHIMADZU, modelo Prominence-i LC-2030, acoplado a un detector electroquímico con electrodo de KCl modelo EC6000 RECIPE. Para la separación de las CT se utilizó una columna analítica para catecolaminas en orina C18 (150 mm x 3.9 mm, 5 µm) RECIPE. Las condiciones cromatográficas fueron: flujo isocrático 1.0 ml/min, fase móvil del kit comercial de reactivos ClinRep® HPLC Complete Kit Catecholamines in Urine REF 2000, volumen de inyección de 20.0 µl, temperatura de la columna 30 °C, potencial de 500 mV, 10 nA de sensibilidad y tiempo de corrida de 12 minutos. Para la identificación y determinación de los tiempos de retención de la NA, AD, y DA, se utilizó la solución estándar lista para usar ClinTest® REF 2011 RECIPE.

La concentración de NA, AD y DA en cada alícuota, se calculó mediante la extrapolación de los valores del área de la señal del cromatograma de cada analito en cada muestra, respecto al área obtenida para cada analito en el calibrador ensayado asociado a una concentración determinada; se utilizó un factor de tasa de recuperación (REC) que valida la adecuada

extracción de los analitos presentes en la muestra, que se basa en la recuperación del estándar interno (IS) añadido a cada muestra previo a la SPE; este factor debe ser igual a  $1.00 \pm 0.10$ . Se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$REC = \frac{\text{área IS}_{(\text{calibrador})}}{\text{área IS}_{(\text{muestra})}}$$

$$C_{(\text{analito, muestra})}(\mu\text{g/l}) = \frac{\text{área}_{(\text{analito, muestra})} \times C_{(\text{analito, cal})}(\mu\text{g/l})}{\text{área}_{(\text{analito, cal})} \times REC}$$

Se realizó la comparación de las concentraciones obtenidas de NA, AD y DA a partir de las alícuotas B, C-1, C-2, C-3, D-1, D-2 y E, respecto a las obtenidas para la alícuota A; se calculó la diferencia porcentual entre medias y se aplicó a los datos un análisis de varianza ANOVA de un factor y una comparación de medias mediante la prueba de Dunnett con un nivel de confianza del 95% (IC 95%) y un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , con la finalidad de determinar si existe diferencia estadísticamente significativa y para discriminar entre cuales medias se obtienen las diferencias.

Para la verificación de precisión y veracidad reportada por el fabricante, se realizaron 3 réplicas de dos niveles de control durante 5 días; los resultados obtenidos fueron analizados según lo estipulado en el instrumento EP-15 A2, CLSI.

## Resultados

Los tiempos de retención aproximados para cada analito son: NA 3.33 minutos, AD 4.05 minutos, estándar interno 5.28 minutos y DA 7.69 minutos.

Las concentraciones obtenidas de NA, AD y DA se muestran en el cuadro 2; se excluyen del análisis los datos de la alícuota E-3 por no cumplir con la REC aceptable.

La comparación porcentual de medias (Cuadro 3) entre cada alícuota (B, C-1, C-2, C-3, D-1, D-2 y E) y la muestra de referencia (A), indica que para NA la mayor diferencia se generó en la muestra cuyas condiciones de almacenamiento fueron todas alteradas con un 4.39%, para la AD un 11.8% de diferencia en la alícuota que fue expuesta a la luz por 6 horas y para la DA un 2.14% en la muestra que sufrió 3 ciclos de congelado-descongelado (C-3).

Del ANOVA de un factor ejecutado se obtiene un valor  $p = 0.000$  para NA y DA, por lo que se rechaza la hipótesis nula, existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de NA y DA obtenidas; para la AD se obtuvo un valor  $p = 0.529$ , se acepta la hipótesis nula, es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas de AD en las diferentes muestras. A partir de este análisis, se generan los intervalos de las medias obtenidas (Cuadro 4, Figura 2); las mayores variaciones (%CV) se obtienen en las concentraciones de AD, mientras que para NA y DA se obtienen variaciones menores.

La prueba de Dunnett genera intervalos de confianza (Cuadro 5) para las diferencias entre la media de cada alícuota (B, C-1, C-2, C-3, D-1, D-2 y E) y la media de un grupo de control (alícuota A); en los intervalos que contienen el cero, no existe diferencia significativa entre las dos medias comparadas (Figura 3).

La condición de pH entre 5.5 y 6.0 de la muestra afecta las concentraciones de NA y DA, obteniéndose valores mayores respecto a la muestra de referencia con pH entre 1.0 y 2.0.

El almacenamiento de la muestra a temperatura de refrigeración (entre 4 °C y 8 °C) afectó solamente la determinación de DA.

Tres ciclos de congelado-descongelado influyeron de manera negativa en la recuperación de la concentración de NA y DA, mientras que en la alícuota que se sometió a dos ciclos de congelado-descongelado no varió de manera estadísticamente significativa la concentración de dichos compuestos.

La exposición de las muestras a la luz no afectó la concentración de las CT en ninguno de los dos lapsos de tiempos de exposición ensayados.

La combinación de condiciones inadecuadas de pH, exposición a la luz y descongelado de la muestra parece afectar solamente la concentración de NA.

No se obtiene evidencia estadística que demuestre pérdida de la estabilidad de la AD en las diferentes muestras.

Los resultados de la verificación de precisión y veracidad se resumen en el cuadro 6. Se obtuvo una precisión intraserie (Sr) e intermedia (SI) que se encuentran por debajo de los valores de verificación estimados (VVSDI y VVSDT, respectivamente) por lo que la precisión reportada por el fabricante es verificada. Respecto a la verificación de veracidad, el valor indicado por el fabricante se encuentra dentro del intervalo de sesgo calculado, por lo que se acepta la verificación de la veracidad.

**Cuadro 2**  
**Concentraciones de catecolaminas para cada alícuota procesada y analizada**

Muestra	Noradrenalina	Adrenalina	Dopamina	REC
A-1	44.207	1.775	383.48	1.01
A-2	43.888	1.658	385.511	1.02
A-3	44.006	1.801	383.008	1.01
A-4	44.127	1.701	382.06	0.99
A-5	44.44	1.713	385.635	0.96
A-6	43.69	1.615	386.874	1.01
A-7	42.885	1.644	377.627	1.05
A-8	43.757	1.974	384.038	1.00
A-9	43.814	1.655	388.246	1.02
A-10	44.323	1.413	380.76	1.00
B-1	45.339	1.844	391.88	1.00
B-2	44.701	1.735	392.671	1.01
B-3	45.324	1.641	390.635	0.98
C1-1	44.176	1.858	390.107	0.99
C1-2	44.328	1.939	390.881	0.99
C1-3	44.277	1.629	393.002	0.99
C2-1	44.029	1.621	380.524	0.94
C2-2	44.807	1.778	380.779	0.94

<b>C2-3</b>	44.836	2.067	381.497	0.99
<b>C3-1</b>	43.014	1.576	373.027	0.98
<b>C3-2</b>	43.657	1.836	379.813	0.99
<b>C3-3</b>	42.774	1.732	373.663	1.00
<b>D1-1</b>	43.783	1.757	382.052	1.03
<b>D1-2</b>	44.169	1.602	388.724	0.97
<b>D1-3</b>	44.161	1.719	382.092	0.99
<b>D2-1</b>	44.116	1.708	382.795	0.96
<b>D2-2</b>	44.541	2.218	385.56	0.99
<b>D2-3</b>	44.508	1.759	390.919	0.98
<b>E-1</b>	46.097	1.877	389.615	0.97
<b>E-2</b>	45.589	1.865	388.918	0.98
<b>E-3</b>	22.832	0.9	194.015	1.95

**Cuadro 3**

**Diferencia porcentual entre medias**

<b>Alícuotas comparadas</b>	Noradrenalina	Adrenalina	Dopamina
A-B	2.75	2.65	2.09
A-C_1	0.79	6.71	1.98
A-C_2	1.46	7.49	0.73
A-C_3	1.74	1.16	2.14
A-D_1	0.28	0.14	0.15
A-D_2	1.08	11.80	0.70
A-E	4.39	10.38	1.44

**Cuadro 4**

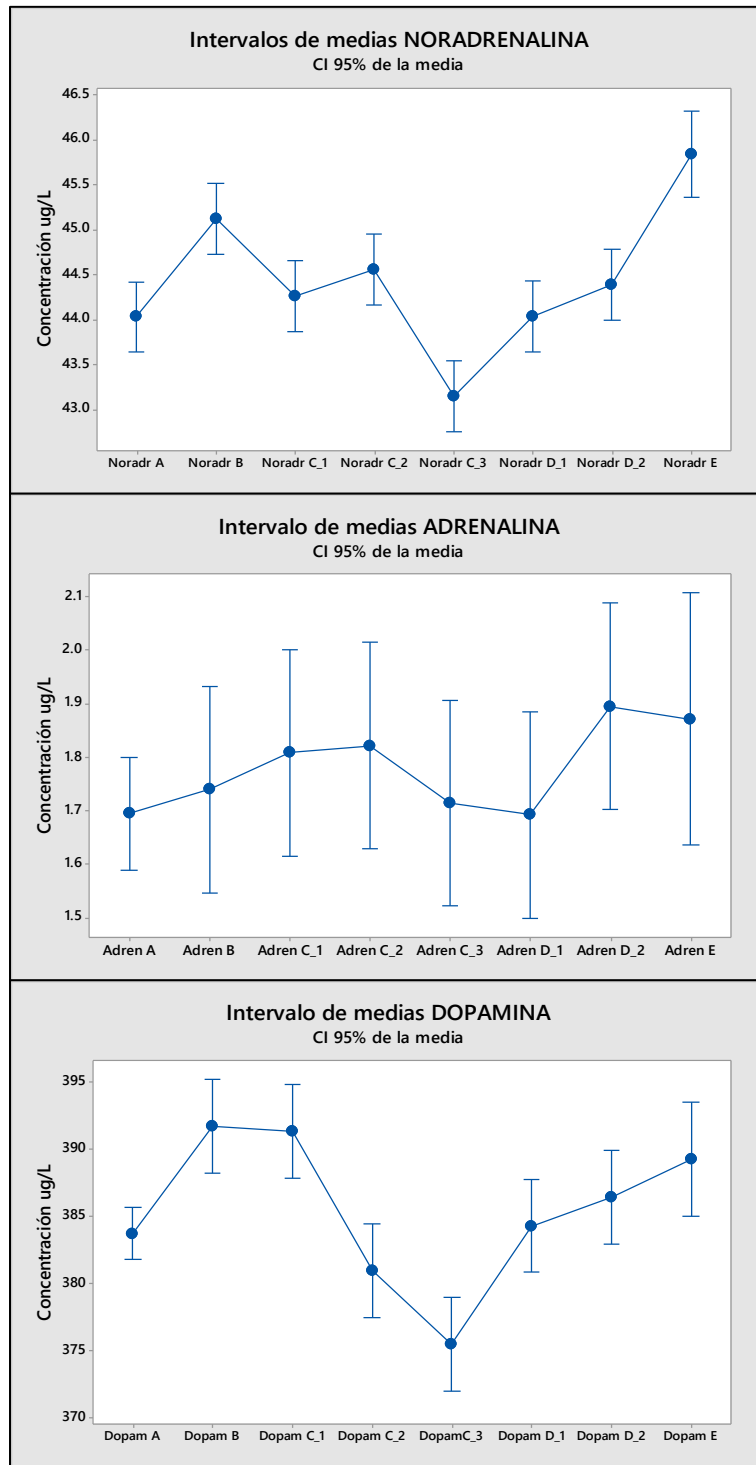


**Intervalos de medias de noradrenalina, adrenalina y dopamina para cada muestra**

Catecolamina- alícuota		PROMEDIO	DE	% CV	95% CI (µg/l)
Noradr A	10	43.914	0.438	1.0	(43.664, 44.163)
Noradr B	3	45.121	0.364	0.8	(44.666, 45.577)
Noradr C_1	3	44.2603	0.0774	0.2	(43.8052, 44.7155)
Noradr C_2	3	44.557	0.458	1.0	(44.102, 45.013)
Noradr C_3	3	43.148	0.457	1.1	(42.693, 43.604)
Noradr D_1	3	44.038	0.221	0.5	(43.582, 44.493)
Noradr D_2	3	44.388	0.236	0.5	(43.933, 44.844)
Noradr E	2	45.843	0.359	0.8	(45.286, 46.400)
Adren A	10	1.6949	0.1443	8.5	(1.5896, 1.8002)
Adren B	3	1.74	0.1016	5.8	(1.5477, 1.9323)
Adren C_1	3	1.8087	0.1608	8.9	(1.6164, 2.0009)
Adren C_2	3	1.822	0.226	12.4	(1.630, 2.014)
Adren C_3	3	1.7147	0.1309	7.6	(1.5224, 1.9069)
Adren D_1	3	1.6927	0.0808	4.8	(1.5004, 1.8849)
Adren D_2	3	1.895	0.281	14.8	(1.703, 2.087)
Adren E	2	1.871	0.00849	0.5	(1.63554, 2.10646)
Dopam A	10	383.724	3.102	0.8	(381.819, 385.629)
Dopam B	3	391.729	1.026	0.3	(388.250, 395.207)
Dopam C_1	3	391.33	1.499	0.4	(387.851, 394.809)
Dopam C_2	3	380.933	0.505	0.1	(377.455, 384.412)
DopamC_3	3	375.5	3.75	1.0	(372.02, 378.98)
Dopam D_1	3	384.29	3.84	1.0	(380.81, 387.77)
Dopam D_2	3	386.42	4.13	1.1	(382.95, 389.90)
Dopam E	2	389.267	0.493	0.1	(385.006, 393.527)

Figura 2

Gráficos de intervalos de medias para cada analito



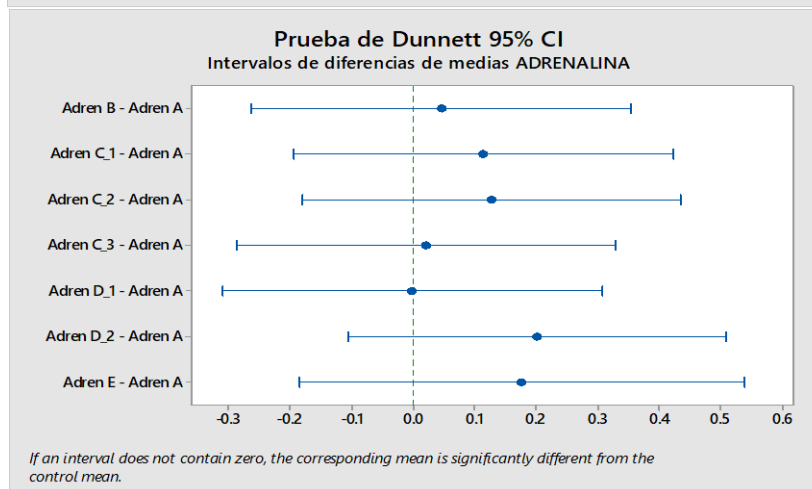
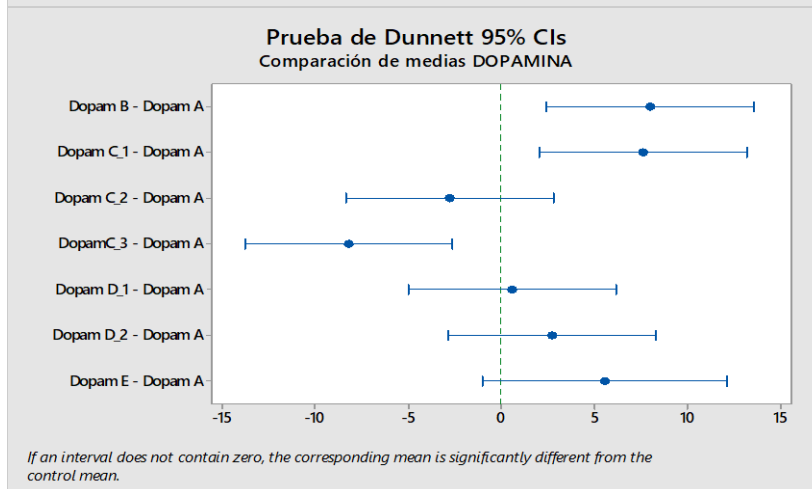
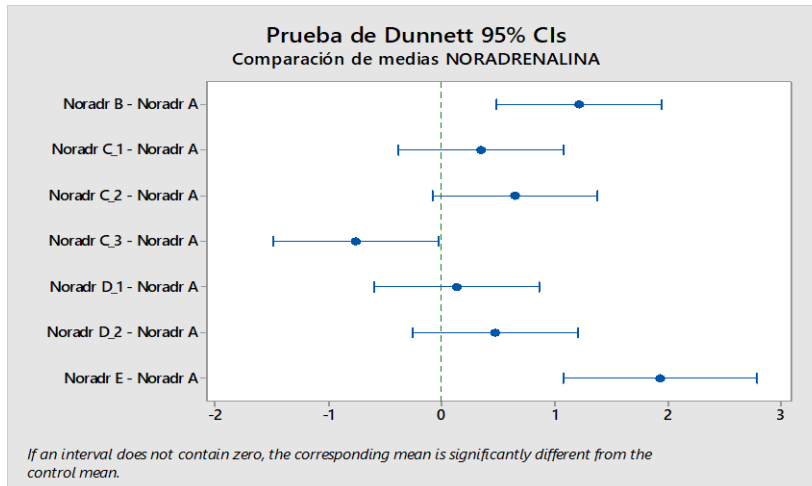
Cuadro 5

Prueba de Dunnett para comparación de medias

<b>Alícuotas comparadas</b>	<b>Diferencia entre medias (µg/L)</b>	<b>95% CI de la diferencia entre medias</b>	<b>Valor P</b>
NA B - NA A	1.208	(0.478, 1.938)	0.001
NA C_1 - NA A	0.347	(-0.383, 1.077)	0.693
NA C_2 - NA A	0.644	(-0.086, 1.374)	0.104
NA C_3 - NA A	-0.765	(-1.495, -0.035)	0.037
NA D_1 - NA A	0.124	(-0.606, 0.854)	0.998
NA D_2 - NA A	0.475	(-0.255, 1.205)	0.358
NA E - NA A	1.929	(1.070, 2.788)	0.000
AD B - AD A	0.045	(-0.263, 0.353)	0.999
AD C_1 - AD A	0.114	(-0.195, 0.422)	0.876
AD C_2 - AD A	0.127	(-0.181, 0.435)	0.809
AD C_3 - AD A	0.020	(-0.289, 0.328)	1.000
AD D_1 - AD A	-0.002	(-0.311, 0.306)	1.000
AD D_2 - AD A	0.200	(-0.108, 0.508)	0.360
AD E - AD A	0.176	(-0.187, 0.539)	0.672
DA B - DA A	8.000	(2.43, 13.58)	0.003
DA C_1 - DA A	7.610	(2.03, 13.18)	0.004
DA C_2 - DA A	-2.790	(-8.37, 2.79)	0.642
DAC_3 - DA A	-8.220	(-13.80, -2.64)	0.002
DA D_1 - DA A	0.570	(-5.01, 6.14)	1.000
DA D_2 - DA A	2.700	(-2.88, 8.28)	0.674
DA E - DA A	5.540	(-1.02,12.11)	0.129

**Figura 3**

**Intervalos de las diferencias de medias para cada analito**



**Cuadro 6**

**Verificación por EP15 A2 de precisión y veracidad**

		Precisión			Veracidad			
		NA	AD	DA	NA	AD	DA	
Nivel 1	S <sub>r</sub>	0.599	2.222	1.070	<b>Valor obtenido</b>	61.8	19.2	190.3
	S <sub>i</sub>	0.96	0.39	1.65	<b>Intervalo inferior</b>	59.34	18.17	185.40
	VVSDI	0.771	0.429	3.573	<b>Intervalo superior</b>	62.34	20.23	195.21
	VVSDT	2.81	0.88	2.62				
Nivel 2	S <sub>r</sub>	0.930	0.269	2.308	<b>Valor obtenido</b>	173.1	38.6	274.6
	S <sub>i</sub>	2.99	0.48	3.39	<b>Intervalo inferior</b>	165.34	37.26	265.20
	VVSDI	1.696	0.587	6.451	<b>Intervalo superior</b>	180.87	39.95	284.03
	VVSDT	4.37	1.33	10.64				

## Discusión

Si bien existe una afectación estadísticamente significativa respecto a la condición de ajuste de pH ensayada sobre las concentraciones de CT, no se puede afirmar que ocurriera pérdida de su estabilidad en la muestra debido a la oxidación de los grupos catecol, ya que, de haber sufrido oxidación por no estar en un pH entre 1.0 y 2.0 previo al procedimiento de análisis como lo indica la técnica, no habrían sido recuperadas en el procedimiento de SPE y, además, la señal generada por oxidación a nivel del electrodo del detector electroquímico hubiera sido significativamente menor respecto a la muestra de referencia. Aunque no hay un consenso en cuanto al pH óptimo para conservar la estabilidad de las catecolaminas en muestras biológicas, esta interpretación concuerda con lo expuesto por Miki y Sudo<sup>10</sup> y Boomsma *et al.*<sup>11</sup>, que indican que la pérdida de estabilidad de las CT ocurre a pH superiores a 7.0, y que incluso orinas sin ninguna adición de preservante ácido pueden mantenerse apropiadamente conservadas a temperaturas menores a -18 °C hasta por un mes.

De las condiciones de temperatura para almacenamiento de las muestras de orina, cuando el pH se mantiene ácido, algunos estudios como el Peaston y Weinkove<sup>12</sup>, también concluyen que la estabilidad de la muestra se mantiene durante al menos 5 días a temperatura ambiente y por varios meses a -20 °C. En el caso de este estudio, tal condición se cumple para las concentraciones de NA y AD. Es sabido que continuos ciclos de congelado-descongelado afectan de manera general la integridad de una muestra biológica para el análisis de CT<sup>1</sup>. Si bien tres ciclos parecen influir de manera negativa en la recuperación de la concentración de las catecolaminas en las muestras, la estabilidad que estadísticamente se demuestra con dos ciclos de congelado-descongelado, constituye un hallazgo de utilidad en los casos que se necesita repetir la extracción de una muestra, ya sea porque su resultado se desea corroborar y no se cuenta con una alícuota de respaldo, o porque por motivos de transporte la alícuota se descongeló y debe ser nuevamente congelada para su procesamiento posterior; ambas situaciones son relativamente frecuentes en el laboratorio clínico, sobre todo si se trata de alícuotas enviadas de otros centros de atención de la CCSS. En el mismo sentido, tranquiliza saber que se cuenta con una ventana de al menos 5 días de almacenamiento de muestra en refrigeración antes del análisis de la muestra, ya que para muchos laboratorios no es posible

el congelamiento de las muestras que deben enviar, aunado al hecho que la coordinación para los envíos no se realizan de manera diaria.

Es poco probable que la exposición a la luz de las muestras de orina por periodos cortos de tiempo (menos de 6 horas), afecte la estabilidad de las CT en la muestra; esta determinación permite flexibilidad de manejo de la muestra en el laboratorio, ya sea para la medición del volumen de la orina de 24 horas, durante la preparación de las alícuotas y durante el análisis propiamente de la muestra.

Adicionalmente, es necesario aclarar que, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de AD, no es correcto sacar conclusiones sobre estos datos, ya que estas concentraciones se encuentran por debajo del límite de determinación del método utilizado, el cual está establecido en  $2.61 \mu\text{g/l}^9$ . Además, a pesar de las diferencias estadísticamente significativas indicadas anteriormente, dado los rangos de referencia de las CT (NA: 23 – 105  $\mu\text{g/orina 24 h}$ , AD: 4 – 20  $\mu\text{g/orina 24 h}$  y DA: 62 – 446  $\mu\text{g/orina 24 h}$ ) que se utilizan para evaluación del estado del paciente, se considera que esas diferencias no son clínicamente significativas, ya que según las diferencias porcentuales calculadas, el valor reportado no induciría a una interpretación diagnóstica equivocada respecto al valor real, a no ser, claro, que los valores obtenidos en una muestra se encuentren cercanos a los límites de referencia, en cuyo caso, de todos modos, llamaría la atención del médico tratante, quien apegado al algoritmo diagnóstico para tumores neuroendocrinos, debe solicitar una repetición del análisis y además pruebas adicionales complementarias para la toma de cualquier decisión sobre el paciente<sup>2</sup>.

Para posteriores estudios, se sugiere enriquecer las muestras de orina con AD con el objetivo de evaluar la variación de la concentración de esta bajo las condiciones críticas de almacenamiento de la muestra; esto dado que las concentraciones de AD en las muestras de orina en personas sin patología asociada, normalmente, van a ser bajas<sup>7</sup>. Se sugiere ensayar muestras individuales (no en pool) con el fin de apegarse a las condiciones reales que sufriría cada muestra por separado. Se considera muy importante el trabajar con muestras recolectadas sin HCl añadido al recipiente de previo a la recolección, así como la utilización de recipientes convencionales (no oscuros), con el fin de descartar el posible efecto protector generado durante la recolección de la muestra.

Por otra parte, la verificación de los parámetros de precisión y veracidad asegura que el método utilizado para el análisis de CT requeridos por los pacientes que acuden al laboratorio, se desempeña de forma aceptable y provee la calidad analítica requerida para generar resultados correctos que favorezcan el cuidado del paciente. Se demuestra, además, que el método empleado es sumamente preciso, desde el procedimiento de SPE hasta la reproducibilidad de sus corridas cromatográficas, por lo que muy pequeñas variaciones de concentración obtenidas a partir de cada muestra pudieron generar las diferencias estadísticamente significativas obtenidas, aunque a nivel clínico no se consideren relevantes.

## Referencias

1. Eisenhofer G, Whitley R, Rosano T. Catecholamines and Serotonin. In: Burtis C, Ashwood E, Bruns D. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 5th edition. Missouri: Elsevier Saunders, 2012: 851-894.
2. Neumann H. Feocromocitoma. En: Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson L, Loscalzo J. Harrison Principios de Medicina Interna. 19va edición. México: Mc Graw Hill, 2015: 2329-2335.
3. Grouzmann E, Lamine F. Determination of catecholamines in plasma and urine. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2013; 27: 713-723.
4. Bicker J, Fortuna A, Alves G, Falcão A. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples – A review. Analytica Chimica Acta 2013; 768: 12-34.
5. Willemsen J, Ross H, Lenders J, Sweep F. Stability of Urinary Fractioned Metanephrines and Catecholamines during Collection, Shipment, and Storage of Samples. Clinical Chemistry 2007; 53 (2): 268-272.
6. Peitzsch M, Pelzel D, Glöckner S, Prejbisz A, Fassnacht M, Beuschlein F, Januszewicz A, Siegert G, Eisenhofer G. Simultaneous liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of urinary free metanephrines and catecholamines, with comparisons of free and deconjugated metabolites. Clinica Chimica Acta 2013; 418: 50-58.
7. Chan EC, Wee PY, Ho PC. Evaluation of degradation of urinary catecholamines and metanephrines and deconjugation of their sulfoconjugates using stability-indicating reversed-phase ion-pair HPLC with electrochemical detection. Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2000; 22: 515 - 526.
8. García De Marina A, Yusa D. HPLC Instrumental. Editorial Universitat Politècnica de València, 2016.
9. Instruction Manual ClinRep® HPLC Complete Kit Catecholamines in Urine REF 2000. Munich: Recipe Chemicals and Instrument GmbH, 2013.
10. Miki K, Sudo A. Effect of urine pH, storage time, and temperature on stability of catecholamines, cortisol, and creatinine. Clin Chem 1998; 44: 1759-1762.
11. Boomsma F, Alberts G, van Eijk L, Man in 't Veld A, Schalekamp M. Optimal collection and storage conditions for catecholamine measurements in human plasma and urine. Clinical Chemistry 1993; 39: 2503-2508.
12. Peaston R, Weinkove C. Measurement of catecholamines and their metabolites. Annals of Clinical Biochemistry 2004; 41: 17-38.