

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

NUEVA METODOLOGIA PARA LA DETERMINACION
DE ACIDO 3 - METOXI - 4 - HIDROXIMANDELICO
EN ORINA

Andreas Rothstein M.

Bogotá, 1982

Quiero dedicarle este trabajo a una persona maravillosa, pero que por modestia no quiere aparecer con nombre. Para ella, con todo mi agradecimiento y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor CESAR MENDOZA POSADA, Jefe de la Sección de Atención Médica del Instituto Nacional de Cancerología, cuyo ejemplo y consejos me ayudaron para sacar adelante el trabajo.

Al Doctor LUIS EDUARDO HENAO, Profesor de la Universidad Nacional de Colombia, por la ayuda en la consecución de reactivos.

A RAFAEL GUBEREK, de Basic 2.000, por la ayuda en la Edición de figuras y tablas.

A todos los miembros del Laboratorio de Hematología del Instituto Nacional de Cancerología sin cuya colaboración y apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

INDICE		<u>Pág.</u>
1.	INTRODUCCION	1
2.	MATERIAL Y METODOS	4
2.1.	PACIENTES Y MUESTRAS	4
2.1.1	Pacientes	4
2.1.2	Muestras	5
2.2.	REACTIVOS Y SOLUCIONES	5
2.2.1.	Prueba Semicuantitativa	5
2.2.2.	Determinación cuantitativa	6
2.3.	EQUIPO	6
2.4.	METODOS	7
2.4.1	Prueba Semicuantitativa	7
2.4.2	Determinación cuantitativa	8
2.4.2.1.	Extracción	8
2.4.2.2.	Separación cromatográfica	9
2.4.2.3.	Visualización	10
2.4.2.4.	Cuantificación	11

	<u>Pag.</u>	
3.	RESULTADOS	13
4.	DISCUSION DE RESULTADOS	21
4.1.	PRUEBA SEMICUANTITATIVA	21
4.1.1	Determinación del volumen óptico de reactivo de color	23
4.1.2	Determinación del valor límite de R	24
4.1.3	Análisis del efecto de la dieta sobre el valor de R	26
4.1.4	Efecto de la coloración de la orina o de sustancias interferentes	27
4.1.5	Base química de la reacción	28
4.1.6	Correlación clínica de la prueba	29
4.2.	DETERMINACION CUANTITATIVA	30
4.2.1.	Estandarización de la prueba	30
4.2.2	Base química de la reacción	34
4.3.	CONFRONTACION DE LOS METODOS PROPUESTOS CON UN METODO YA ESTABLECIDO	36
4.3.1	Deducción de la fórmula para calcu- lar los resultados	36

	<u>pág.</u>
5. CONCLUSIONES	38
6. RESUMEN	41
APENDICES	
Apéndice 1	43
Apéndice 2	44
BIBLIOGRAFIA	46

1. INTRODUCCION

La determinación de la excreción urinaria del ácido 3-metoxi - 4 hidroximandélico (Acido vanilmandélico o VMA) es un parámetro util en el diagnóstico de tumores como el neuroblastoma o el feocromocitoma.

El metabolismo de la Dopa se hace a través de la formación de norepinefrina, epinefrina, normetanefrina, metanefrina, 3 metoxi - 4 hidroxifenilglicol y finalmente VMA ⁽¹⁾. (Fig. 1). A pesar de que algunos autores reportan que la dosificación de uno sólo de esos metabolitos no es criterio suficiente para el diagnóstico de enfermedades como el neuroblastoma y el feocromocitoma ⁽²⁾ hay otros criterios que sugieren que una dosificación adecuada de uno de esos metabolitos en particular el VMA es criterio suficiente ^(3, 4).

Una dosificación del contenido sérico de VMA no es un método adecuado pues Sunderman y col, ⁽⁵⁾ determinaron que

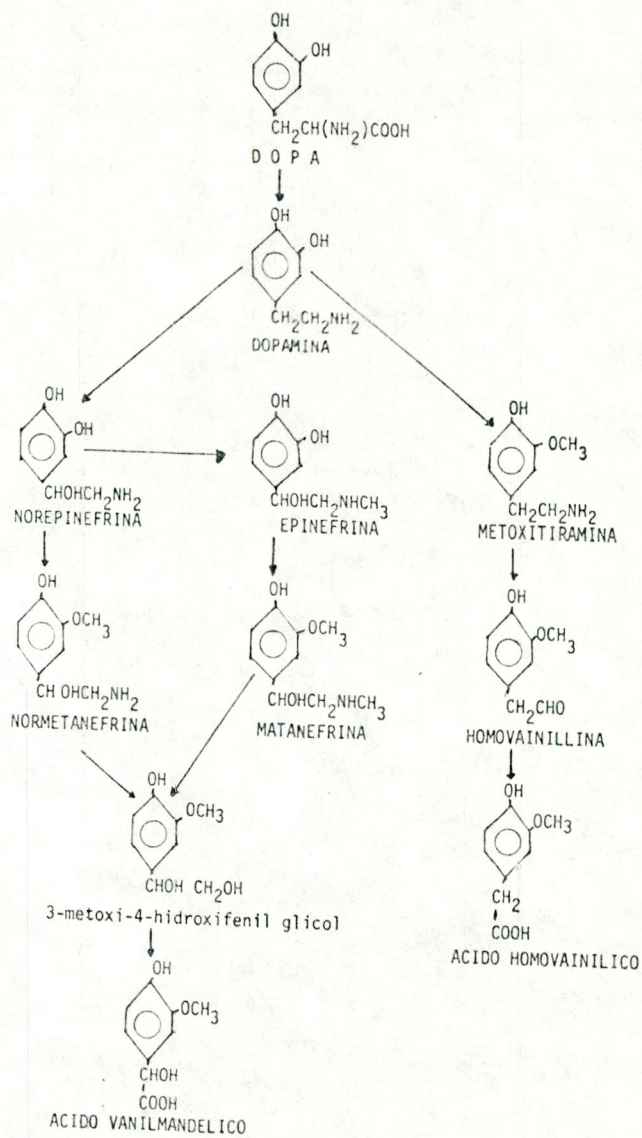


Fig. 1. Caminos metabólicos para la DOPA.

los pacientes normales ~~que~~ tenían concentraciones detectables de VMA y que los pacientes con feocromocitoma tenían un rango de valores (18 a 47 ug/100 ml suero) dependiente del sitio de la toma de la muestra por cateterismo. *venoso?* Se requiere pues de un método apropiado que permita dosificar el VMA en orina, con una alta precisión y exactitud. En el presente trabajo, se describen tanto una prueba semicuantitativa, que permite determinar si el contenido de VMA en la orina está elevado o no, y una determinación cuantitativa que permite dosificar el VMA en aquellas orinas en las que se ha determinado previamente que el contenido del metabolito está aumentado.

La mayoría de las pruebas de sondeo utilizan la reacción de color del VMA y sus compuestos relacionados con la p-nitroanilina diazotada en medio alcalino^(4, 6, 7). Estas pruebas se pueden hacer ya sea en tubo de ensayo o como "spot test" sobre papel de filtro. Existen sin embargo, otras pruebas que utilizan reacciones del ácido vamilmandélico con otros colorantes, como es el caso de la 2,4 dinitrofenilhidracina acoplada al metaperyodato de sodio. (1)

Las determinaciones cuantitativas del VMA y otros metabo-

litos de las catecolaminas incluyen diversas técnicas. Entre éstas están, la electroforesis de alto voltaje ⁽⁸⁾, la electroforesis en acetato de celulosa ⁽⁹⁾, la cromatografía de gases ⁽¹⁰⁾ y las técnicas colorimétricas ⁽¹¹⁾. Sin embargo, la mayoría de estos procedimientos requieren equipo especializado del cual no disponen la mayoría de los laboratorios clínicos. Un caso aparte, es el de la electroforesis donde a pesar de que la mayoría de los laboratorios disponen del equipo, la determinación requiere restricciones dietéticas y farmacéuticas, que no son fáciles de implantar en todos los casos. ⁽⁹⁾

El uso de la cromatografía ^{en} de capa delgada para la separación de VMA a partir de extractos de orina, tiene la versatilidad, el costo moderado y la facilidad de operación requeridas para una técnica de uso rutinario en el laboratorio clínico. Por consiguiente, la cromatografía ^{en} de capa delgada usada durante mucho tiempo como herramienta investigativa, tiene otra aplicación en el laboratorio clínico y puede ser utilizada adecuadamente para el análisis clínico de rutina del VMA.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 PACIENTES Y MUESTRAS

2.1.1 Pacientes

Las orinas con contenido elevado de VMA se obtuvieron de pacientes con diagnóstico confirmado de neuroblastoma. Estas muestras fueron utilizadas tanto para la estandarización del método semicuantitativo, como para una cuantificación posterior.

Las muestras de individuos con una excreción normal de VMA, se obtuvieron a partir de 60 personas en buen estado de salud, y cuyas edades oscilaban entre 1 y 22 años.

Finalmente, para confirmar los resultados de la prueba semicuantitativa, se analizaron 44 orinas de pacientes pediátricos y cuyo diagnóstico estaba completamente apartado de tumores de cresta neural.

2.1.2. Muestras

Se tomaron muestras de orina casuales en todos los pacientes sin restricciones de dieta o drogas. Para las muestras que requirieron cuantificación, se recogió una muestra de orina de 24 horas sobre 10 ml de ácido clorhídrico concentrado como preservativo. (12)

2.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos de grado analítico y agua destilada a menos que se especifique lo contrario.

2.2.1. Prueba semicuantitativa

- a) Solución de carbonato de potasio 10%.
- b) Solución de 4-nitroanilina al 0.1% preparada con 1g. de 4-nitroanilina disuelta en 20 ml de ácido clorhídrico concentrado y completando con agua destilada hasta un litro.
- c) Solución de nitrito de sodio 0.2%.
- d) Alcohol isoamílico.

2.2.2. Determinación cuantitativa

- a) Solución de ácido clorhídrico 6N.
- b) Solución extractiva (Acetato de etilo-Metanol 8:2)
- c) Eluyente I (Butanol-Acido Acético-Agua 60:15:25)
- d) Eluyente II (Benceno-Metanol-Acido acético 92:4:4)
- e) 2,6 dicloroquinonaclorimida al 0.1% en metanol.
- f) Solución de ácido vanilmandélico 25 mg% en solución extractiva.
- g) Acetato de Etilo
- h) Sulfato de sodio
- i) Amoníaco
- j) Cloruro de sodio

2.3. EQUIPO

- Espectrofotómetro
- Centrífuga
- Secador de aire frío
- Atomizador
- Cromatoplasmas de Silicagel de 10 x 20 cms.
- Cámaras de cromatografía de 25 cm. x 12 cm. x 8 cm.
- Cámara de revelado con doble fondo de 22 cm. x 13 cms.

x 4 cms. El doble fondo estaba a 1 cm. de la base.

2.4. METODOS

2.4.1. Prueba semicuantitativa

El método usado, es una modificación del método propuesto por Gitlow y col ⁽⁴⁾. La razón para las modificaciones, se explicarán en la sección de Discusión, siendo esta la razón principal del trabajo. La técnica usada fue la siguiente :

En un tubo de ensayo, se toman 0.4 ml de orina y se le agregan 5.6 ml de $K_2 CO_3$ al 10%. Se prepara inmediatamente el reactivo de color, mezclando partes iguales de la solución de 4-nitroanilina al 0.1% y de la solución de nitrito de sodio al 0.2%. De este reactivo de color se añaden sobre el tubo de reacción 1,2 ml y se mezcla inmediatamente. Todos los reactivos deben estar refrigerados hasta el momento de usarse. Después se añaden 2.6 ml de alcohol isoamílico, se tapa el tubo con un tapón de caucho limpio y se agita fuertemente por treinta veces. Se deja efectuar la separación de las capas (Fig. 2) y se extrae

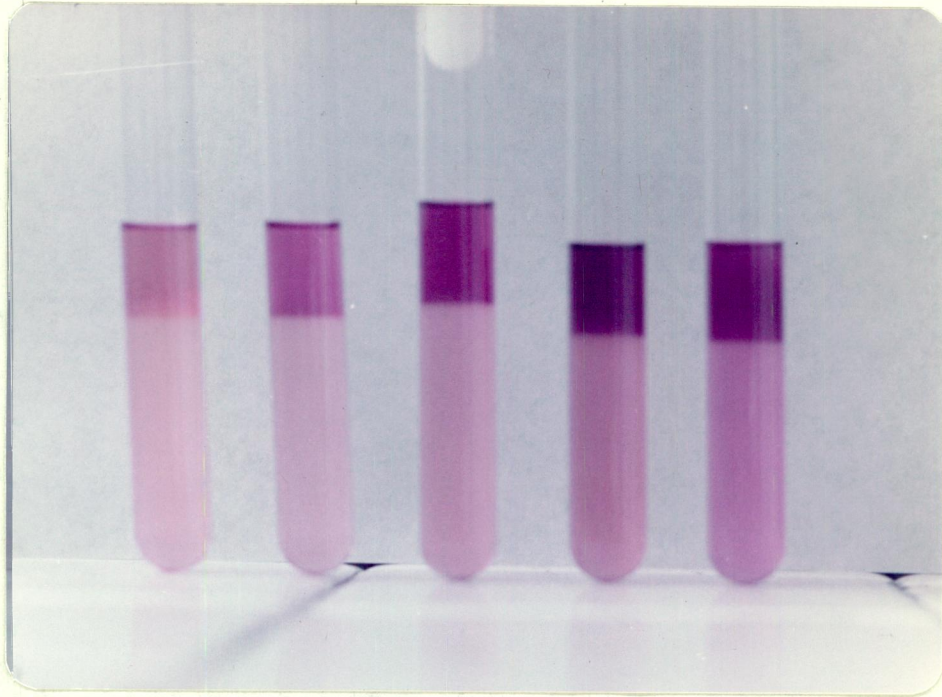


Fig.: 2: Prueba semicuantitativa de VMA. El tubo a la izquierda corresponde a una muestra negativa. Los otros cuatro tubos corresponden en orden ascendente, a concentraciones variables de VMA en orina.

la capa superior de alcohol isoamílico con una pipeta Pasteur transfiriéndola a un tubo de Kahn (10 mm x 75 mm) seco. Se centrifuga este tubo por 5-10 minutos a 2500 rpm y se leen las absorbancias (densidades ópticas) de la muestra a 450 y 550 nm, ^eContra un blanco de alcohol isoamílico. Se calcula la relación (R) ^{entre} de las absorbancias a 450 y 550 nm. Una relación mayor a 2.1 se considera como negativa, mientras que una relación menor indica que la excreción de VMA urinario está aumentada.

Si se desea se puede realizar un control positivo tomando un tubo de ensayo y agregando primero 0.4 ml de orina y después 0.6 ml de una solución acuosa de ácido vanilmanílico que contiene 20 mg/l~~l~~. Se agregan 5.0 ml~~l~~ de la solución de K_2CO_3 al 10% y el resto del procedimiento es igual al de la muestra desconocida.

2.4.2. Determinación cuantitativa

2.4.2.1. Extracción

Se usa una modificación de los métodos de Pisano y col ⁽¹¹⁾, Mc Gregor y col ⁽¹²⁾ y Merck ⁽¹³⁾

efectuándose la determinación por cromatografía ^{en} de capa del gada. La metodología usada fué la siguiente :

En un embudo de decantación se mezclan 10 ml. orina, 1 ml. de agua destilada, 1 ml. de HCl. 6 N, 6g de cloruro de sodio y 30 ml de acetato de etilo. Se agita el embudo de decantación durante 5 minutos. Si se forma emulsión, se centrifuga por 5 minutos a 1500 rpm. y se recupera la mayor cantidad posible de la capa orgánica (superior). Si no se forma emulsión se descarta la fase acuosa. Una vez que se tiene la capa orgánica sola, ya sea que se haya tenido que centrifugar o no, se le agregan aproximadamente 0.5g de sulfato de sodio anhidro. Se agita bien y se filtra reco-giendo sobre un vaso de precipitados de 50 ml. Se lava tanto el embudo de decantación como el filtro con aproximadamente 5 ml de acetato de etilo y se agregan al filtrado en el vaso de precipitados. Se evapora a sequedad en un ba-ño de maría. Una vez frío, se redisuelve el residuo con 2 ml de solución extractiva.

2.4.2.2. Separación cromatográfica

La siembra de las muestras se hace de

acuerdo al esquema mostrado en la Fig. 3. Usando una pipeta de 0,1 ml. se aplican 0.1 ml. del patrón y de cada una de las muestras por duplicado, deslizando suavemente la punta de la pipeta sobre la superficie de la cromatopla-
ca, de límite a límite de la banda; esta operación se debe hacer varias veces, pues la cantidad de líquido así lo requiere. De esta manera se evitará la formación de bandas demasiado gruesas. Se puede acelerar el secado de las bandas soplando aire frío durante la aplicación de la muestra.

Se hacen dos eluciones: la primera con el eluyente I con un recorrido de 3 cm. contados a partir del punto de aplicación y, una segunda, con el eluyente II hasta el borde superior; después de cada elución se seca completamente la placa con corriente de aire.

2.4.2.3. Visualización

Se asperja la cromatoplaca con el reactivo de color (2,6 dicloroquinonaclorimida al 0.1% en metanol) hasta que quede transparente. Se seca con corriente de aire y se deja la placa en reposo durante por lo menos una hora. Luego se coloca la placa en una cámara cerra-

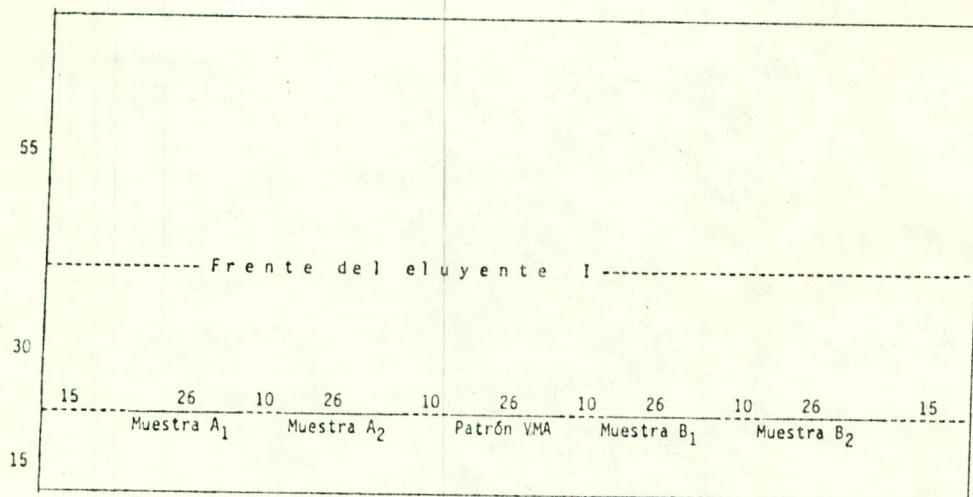


Fig. 3. Esquema de la siembra de las muestras en la cromatoplaaca. Las distancias indicadas son en mm.

da que contenga vapores de amoníaco. La solución de amoníaco no debe tocar la placa (Fig. No.4).

2.4.2.4. Cuantificación

Raspar zonas correspondientes al blanco, las muestras y el patrón de una superficie lo más similar posible, para el blanco se escoge una zona sin muestra. Llevar los raspados a sendos tubos de centrífuga, agregar 3 ml. de agua a cada uno y centrifugar durante 10 minutos a baja velocidad (más o menos 500 rpm). Se lee el sobrenadante a una longitud de onda de 590 nm, ajustando el 100% de transmitancia con el blanco.

2.4.2.5. Cálculos

$$X = \frac{A_m}{A_p} \times \frac{0,5}{V_o} \times \frac{V_t}{x}$$

$$X = \text{mg de VMA/24 horas}$$

donde :

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del patrón.



Fig.: 4 : Determinación cuantitativa de VMA. Aspecto de las cromatopla-
cas después de reveladas. La siembra
de las muestras se hizo de acuerdo al
esquema de aplicación mostrado en la
Fig. 3.

- 0.5: El patrón corresponde 0.5 mg de VMA. recuperables en 2 ml. de solución extractiva.
- V_T : Es el volumen total de orina eliminado por el paciente en 24 horas.
- $V_o =$ Es el volumen de orina tomado para efectuar la determinación (10 ml).

3. RESULTADOS

A continuación se presentan las tablas de datos y gráficas recopiladas en este trabajo. En primer lugar aparecen, para ambos métodos, las curvas espectrales (Figs. 5*6 y 11). En seguida, la optimización del volumen óptimo del reactivo de color para la prueba semicuantitativa (Figs. 7-10) y la determinación del valor de R (Tablas 1-3). Con respecto al método cuantitativo, se presentan los ajustes a la ley de Beer del compuesto coloreado (Tabla 4, Fig. 12) y la optimización de la técnica de extracción y volumen de muestra (Tablas Nos. 5 y 6).

* Nota: En algunas gráficas puede aparecer en la ordenada la notación 1E-3; esto significa que los valores colocados en ese eje deben multiplicarse por 1×10^{-3} .

FIG. 5. CURVA ESPECT. UNA EN SOL. AC.

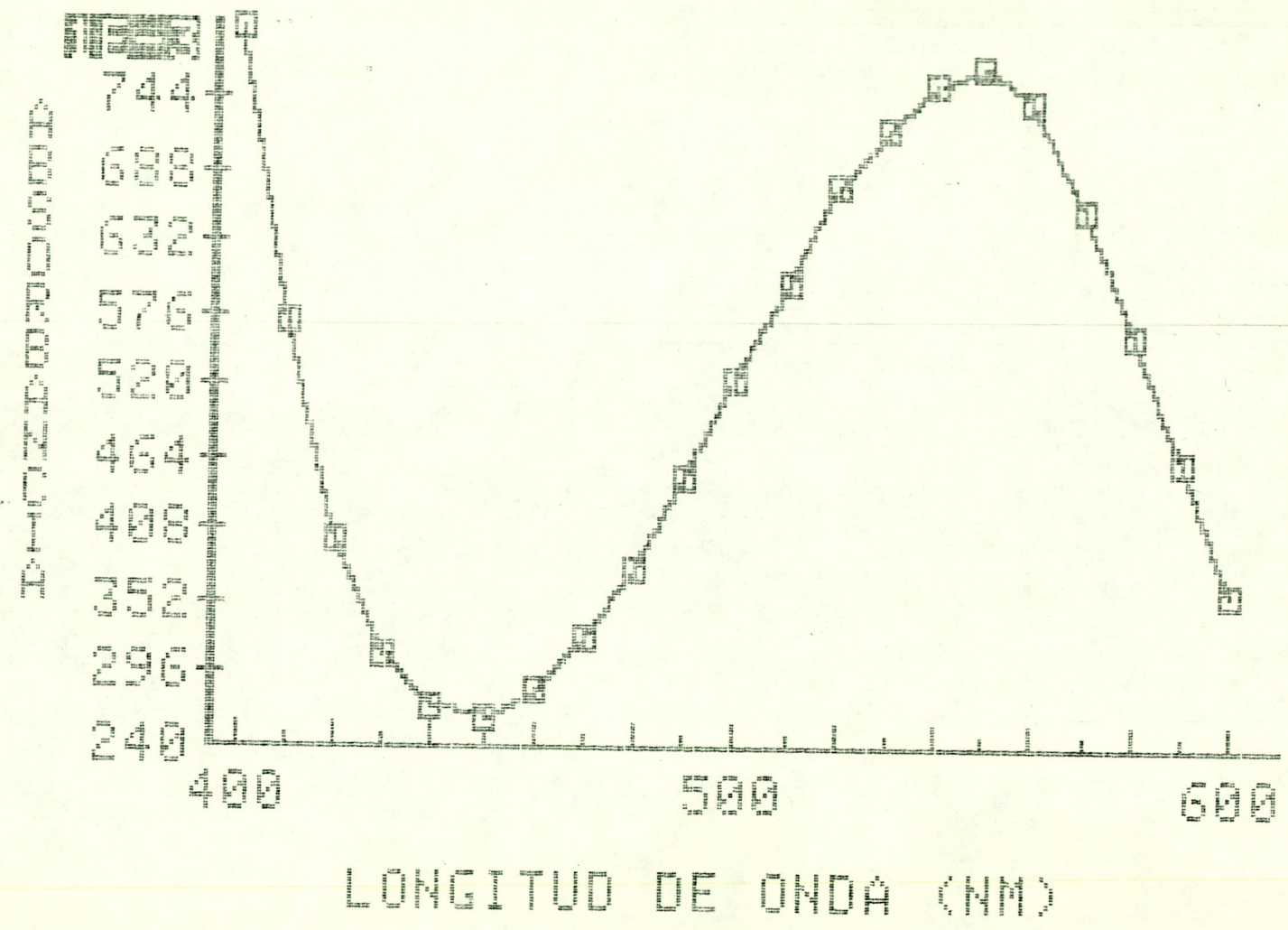


FIG. 6. CURVA ESPECT. DE UVA EN URINA

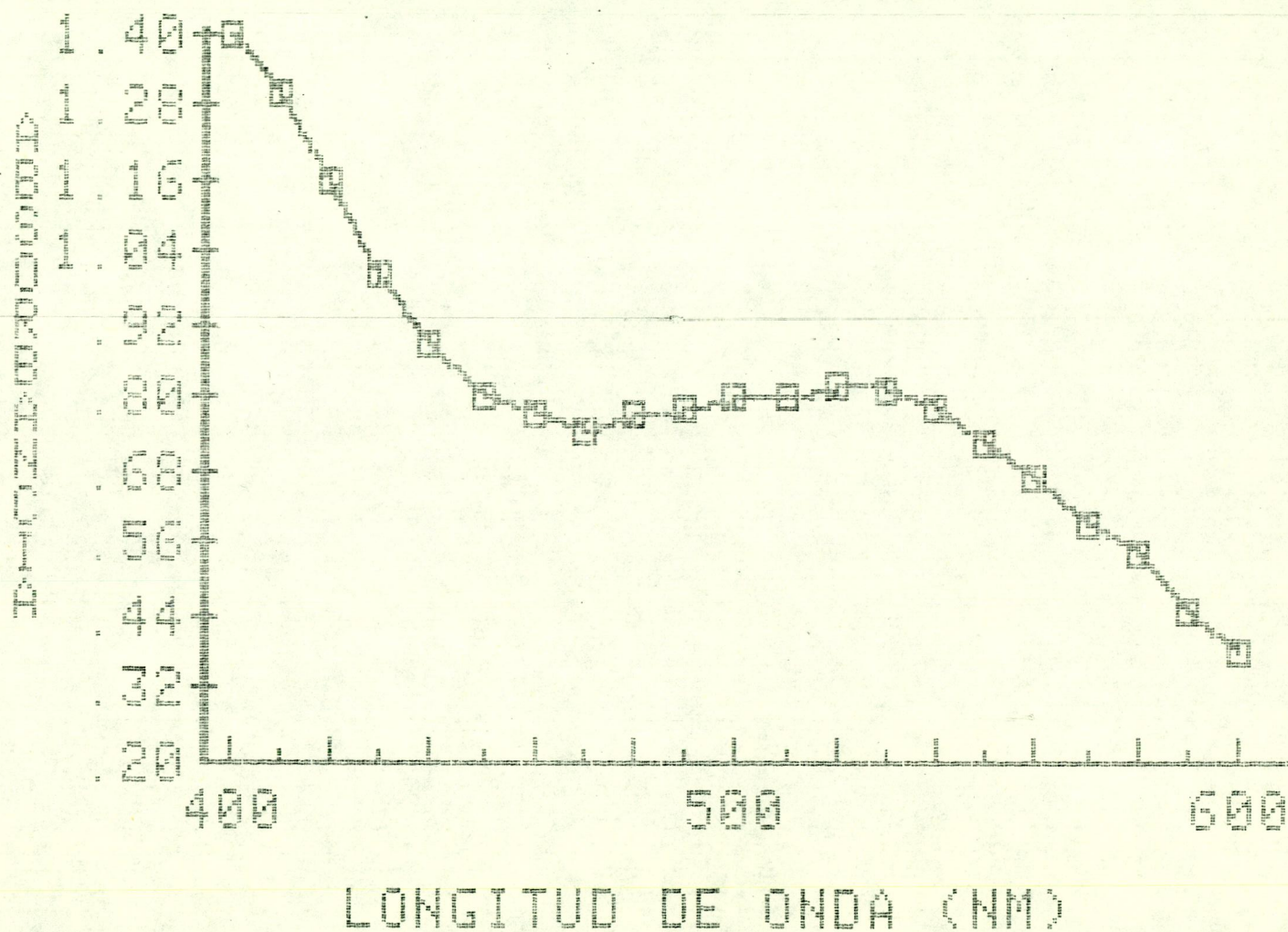


FIG. 11. CURVA ESPECTRAL DET. CUANT.

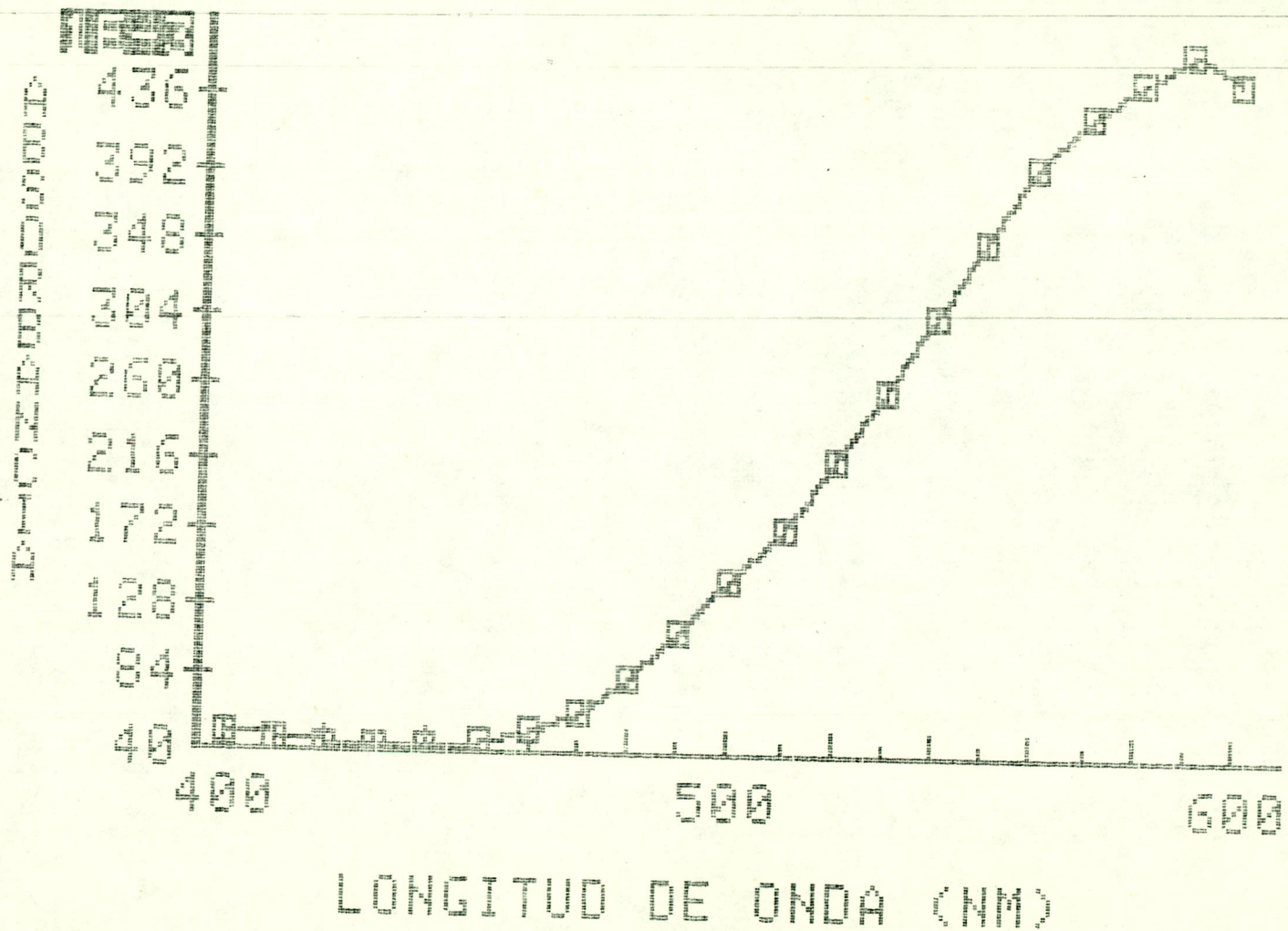
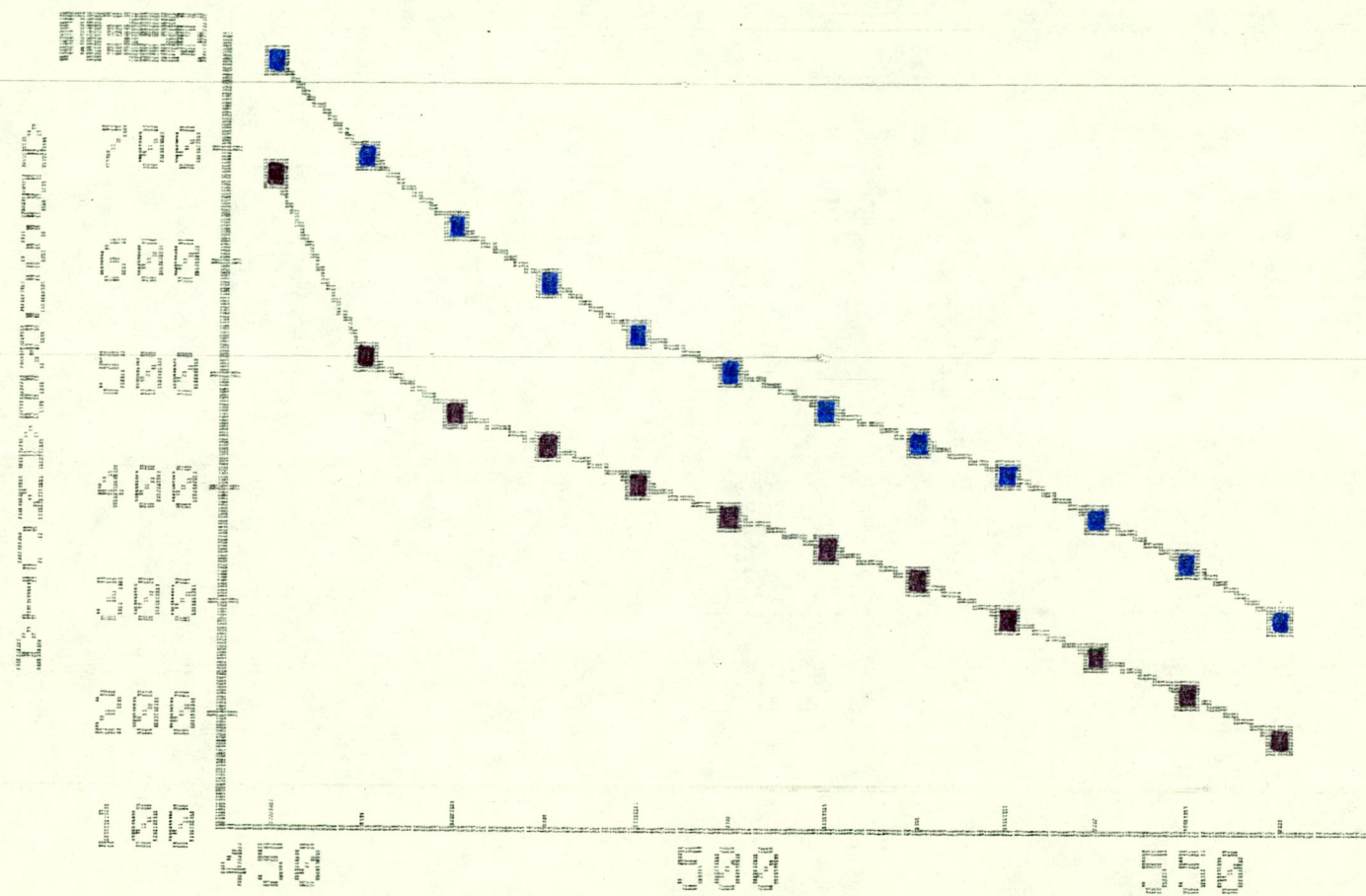


FIG. 7. CURVAS ESP. VOL. REACT: 0.4 ML



LONGITUD DE ONDA (NM)
 ■ = MUESTRA CON VINO
 ■ = MUESTRA SIN VINO

FIG. 8. CURVAS ESP. VOL. REACT. 0.0 NL

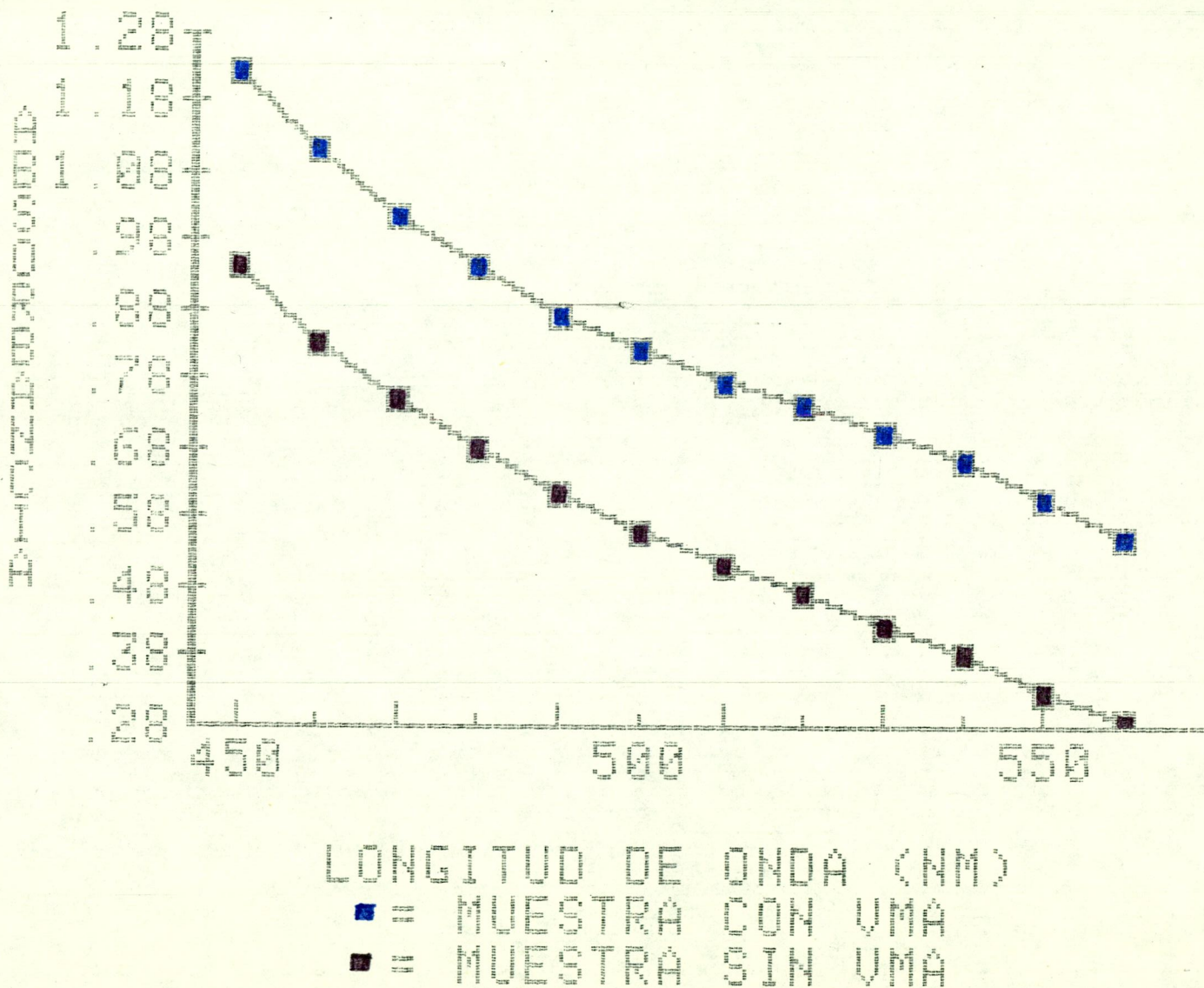
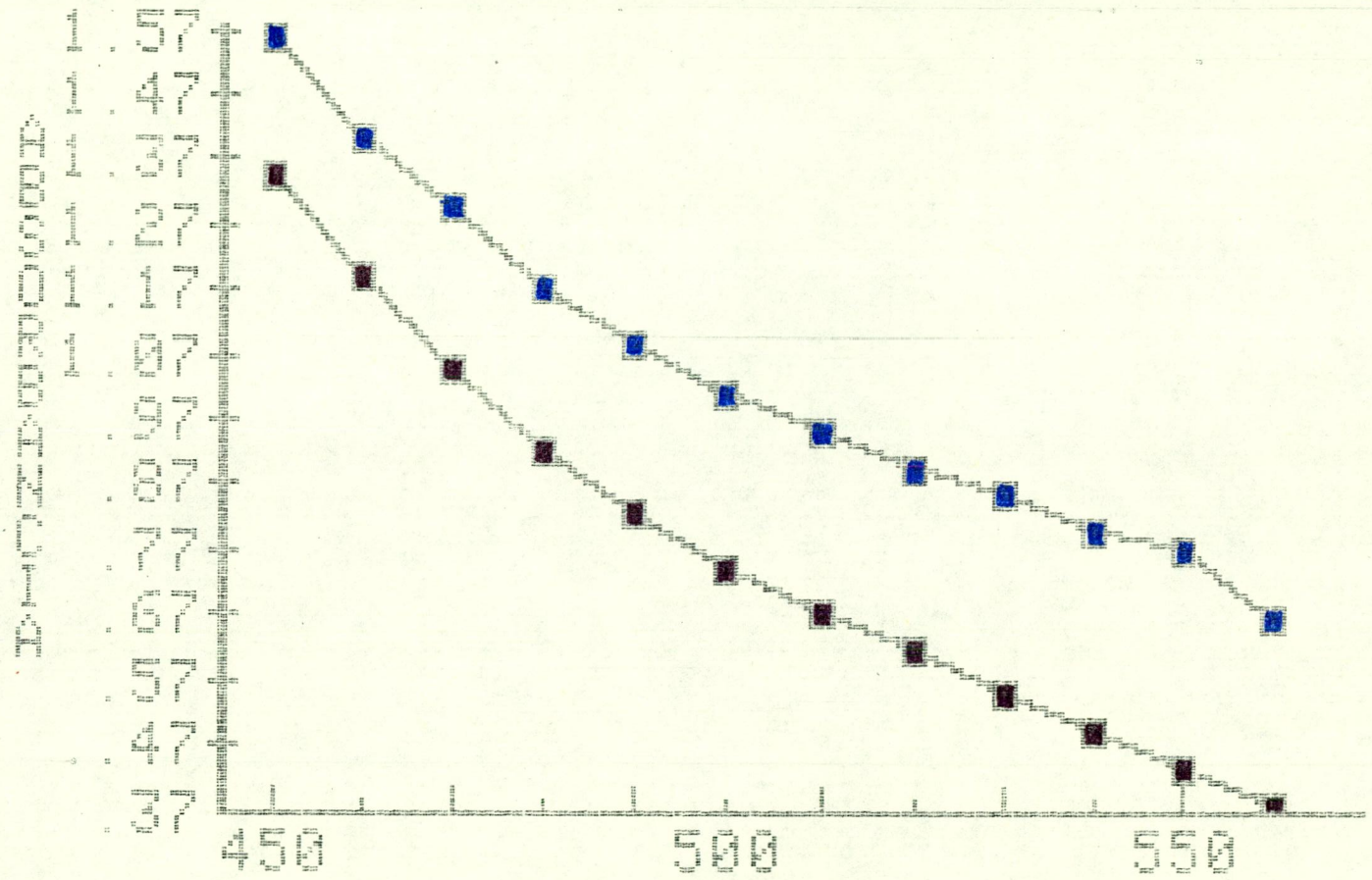
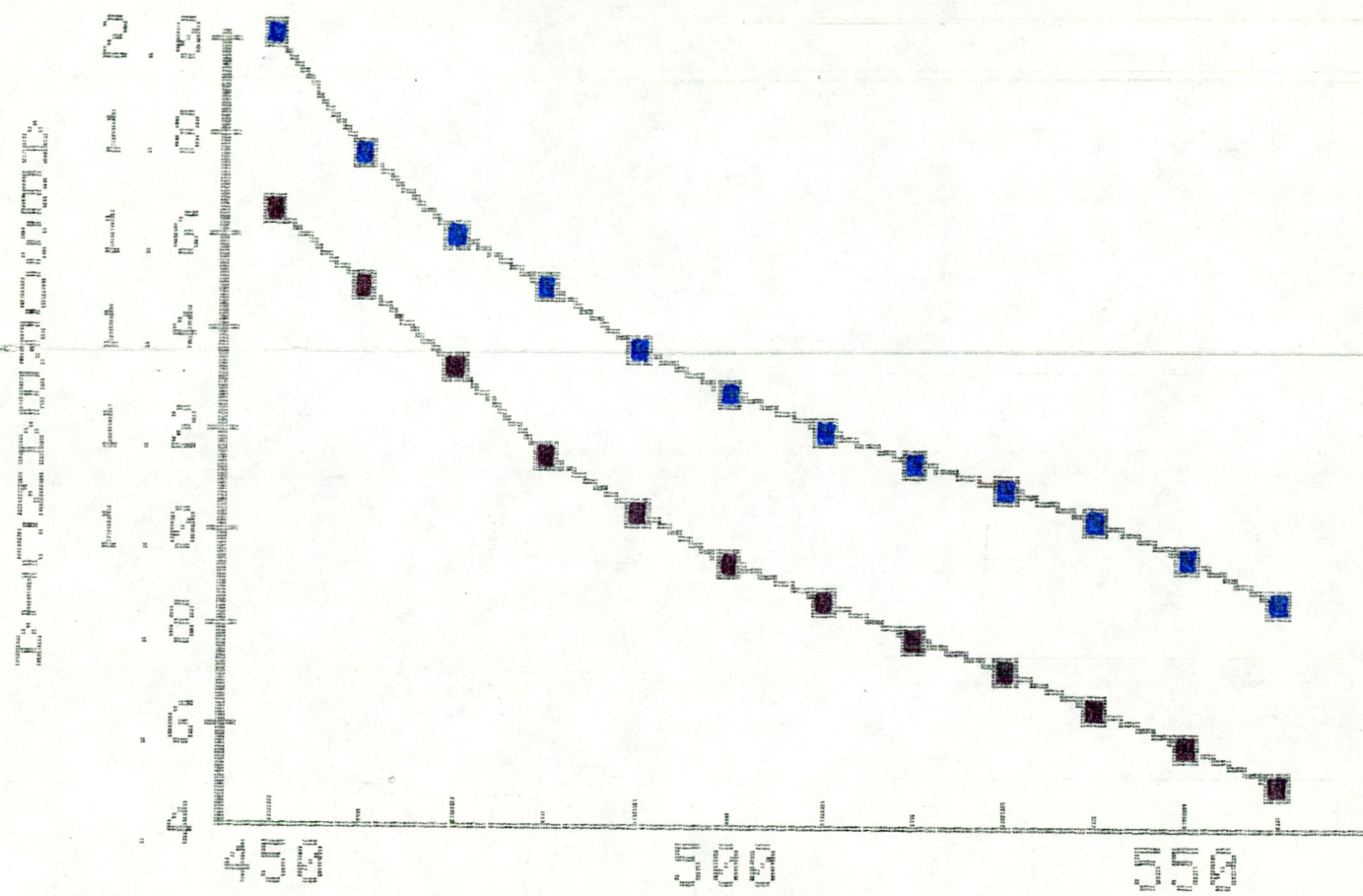


FIG. 9. CURVAS ESP. VOL. REACT. 1.2 NL



LONGITUD DE ONDA (NM)
 ■ = SPECTRA CON VMA
 ■ = SPECTRA SIN VMA

FIG. 10. CURVAS ESP. VOL. REACT: 1.6 ML



LONGITUD DE ONDA (NM)
■ = MUESTRA CON VMA
■ = MUESTRA SIN VMA

TABLA # 1

DETERMINACION DE LOS VALORES NORMALES PARA R (EXCRECION
DE VMA: 6 MG/24 HR)

Muestra	Valor de R (x)	$(x-\bar{x})^2$
1	3.0	0.00
2	3.4	0.16
3	3.4	0.16
4	4.5	2.25
5	3.2	0.04
6	3.3	0.09
7	2.7	0.09
8	3.0	0.00
9	3.1	0.01
10	4.1	1.21
11	3.9	0.81
12	4.1	1.21
13	2.5	0.25
14	3.2	0.04
15	3.0	0.00
16	2.8	0.04
17	3.5	0.25
18	2.3	0.49
19	3.4	0.16
20	4.4	1.96
21	2.8	0.04
22	2.9	0.01
23	2.6	0.16
24	2.6	0.16
25	3.4	0.16
26	2.3	0.49
27	3.0	0.00
28	2.7	0.09
29	3.1	0.01
30	2.9	0.01
31	2.7	0.09
32	3.4	0.16
33	3.5	0.25
34	3.1	0.01
35	2.0	1.00
36	3.2	0.04
37	2.8	0.04
38	2.4	0.36
39	2.9	0.01
40	3.5	0.25
41	2.1	0.81
42	3.0	0.00
43	2.6	0.16
44	2.7	0.09
45	2.8	0.04

Muestra	Valor de R (x)	(x-x)
46	3.2	0.04
47	3.0	0.00
48	2.5	0.25
49	2.5	0.25
50	2.7	0.09
51	2.6	0.16
52	2.8	0.04
53	3.3	0.09
54	2.5	0.25
55	2.4	0.36
56	2.8	0.04
57	2.4	0.36
58	2.6	0.04
59	2.6	0.04
60	3.0	0.00
	-----	-----
	178.7	15.67

$$R = 3.0$$

$$s = 0.5$$

$$2s = 1.0$$

Valores Normales: 3.0 \pm 1.0

TABLA # 2

VALORES DE R PARA ORINAS PATRON CUYA EXCRECION DE VMA
CORRESPONDE A 10 MG/24 HR.

Muestra	R(x)	(x-x)
1	2.0	0.09
2	2.0	0.09
3	1.9	0.04
4	1.7	0.00
5	1.7	0.00
6	1.5	0.04
7	1.6	0.01
8	1.5	0.04
9	1.9	0.04
10	1.6	0.01
	-----	-----
	17.4	0.36

$$R = 1.7$$

$$s = 0.2$$

$$2s = 0.4$$

Valores para excreciones de 10 mg/24 hr: 1.7 ± 0.4

TABLA # 3

COMPARACION DE LOS VALORES DE R EN ALGUNOS INDIVIDUOS QUE
PRESENTARON VALORES BAJOS DE ESTE, ANTES Y DESPUES DE
EFECTUAR UN CONTROL DE DIETA

Edad de los Pacientes: 17 a 22 anos

Muestra	R antes	R despues
7	2.7	4.1
13	2.5	2.6
18	2.3	3.0
23	2.6	3.6
26	2.3	3.6
31	2.7	4.6
38	2.4	3.3
41	2.1	4.7
43	2.6	3.4

TABLA # 4

ESTUDIO DE LA CORRELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE VMA Y
LA ABSORBANCIA DEL COMPUESTO COLOREADO.

Concentracion de VMA (mg%)	absorbancia real	absorbancia corregida*
00	0.0000	0.0010
10	0.1220	0.1110
20	0.1993	0.2210
30	0.3420	0.3310
40	0.4413	0.4410
50	0.5498	0.5510

* Correccion efectuada por el metodo de los minimos
cuadrados, obteniendose para estos datos una pendiente
(m) de 0.011 y un intercepto (b) de 0.001.

FIG. 12. AJUSTE A LA LEY DE BEER

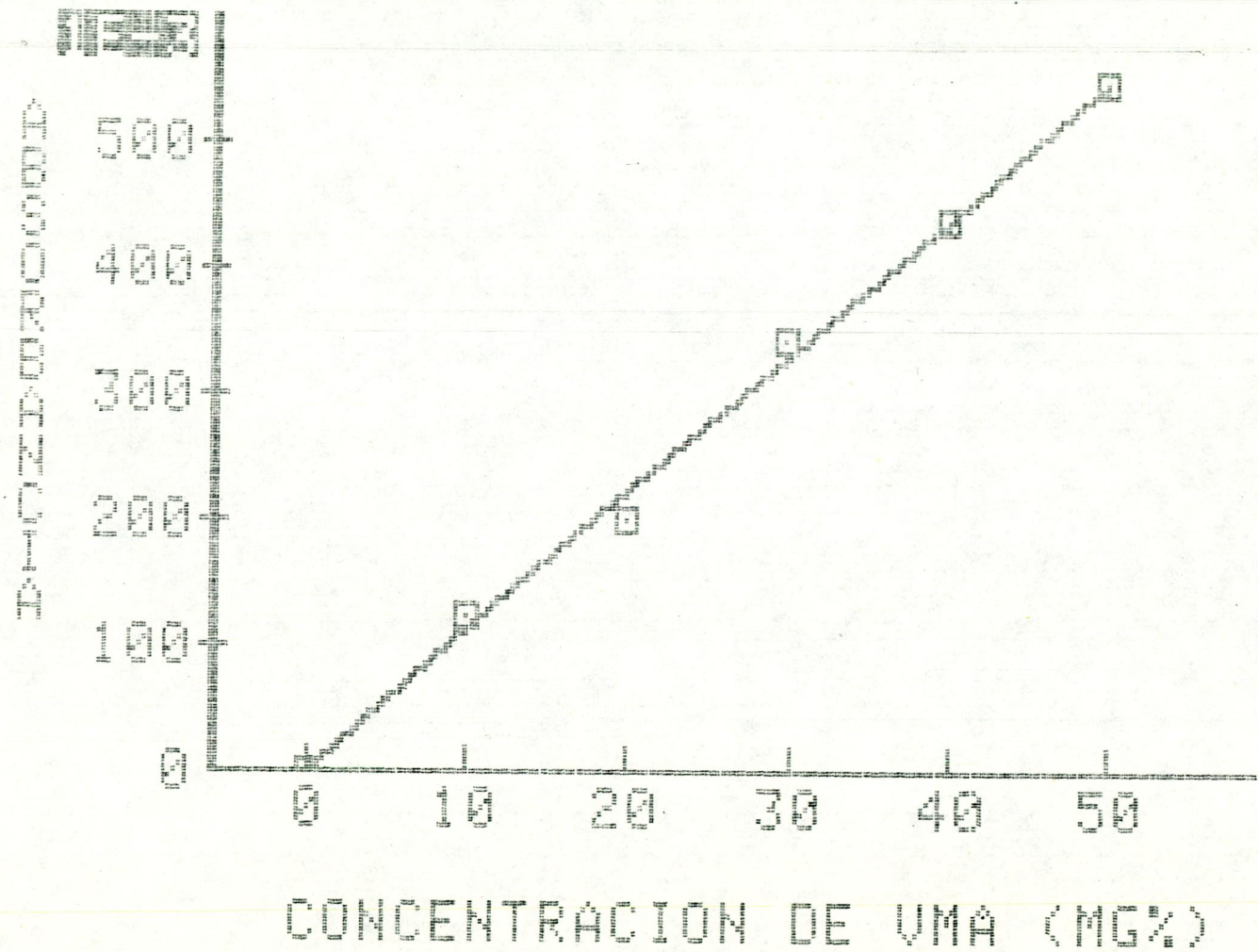


TABLA # 5

COMPARACION ENTRE LA RECUPERACION DE VMA A PARTIR DE LA EXTRACCION CON ETHER Y LA EXTRACCION DE ACUERDO AL METODO DE PISANO (11).

Concentracion del patron de VMA: 100 mg/lt.

Extracto Etereo

Extracto segun Pisano

Absorbancia patron: 0.2596
Volumen orina: 40 ml
F. Dilucion: 5

Absorbancia patron: 0.2757
Volumen orina: 5 ml

Muestra	Absorb.	mgVMA/lt	Absorb.	mg VMA/lt
1	0.2636	63.5	0.2692	97.6
2	0.6676	160.7	0.2924	106.1
3	0.3872	93.2	0.2596	94.2
4	0.3487	84.0	0.2840	103.0

\bar{x} = 100.4mg/lt

s = 41.8mg/lt

Int. Confianza: \pm 51.9mg/lt

Coef. Variacion: 41.6%

\bar{x} = 100.2mg/lt

s = 5.1mg/lt

Int. Confianza: \pm 6.3mg/lt

Coef. Variacion: 5.1%

TABLA # 6

ESTUDIO DE LA VARIACION DE LA RECUPERACION DE VMA CON
RESPECTO AL VOLUMEN DE MUESTRA USADA.

Concentracion de VMA en la orina: 15 mg/lt

Volumen de orina: 5ml

Absorbancia patron: 0.3546
0.3525

Volumen de orina: 10 ml

Absorbancia patron:

Muestra mgVMA/lt

1	15.6
2	16.8
3	14.9
4	14.3

Muestra

mgVMA/lt

1	15.8
2	15.9
3	14.5
4	15.1

x = 15.4 mg/lt

s = 1.1 mg/lt

Int. Confianza: \pm 1.5 mg/lt

Coef. Variacion: 7.1%

x = 15.3 mg/lt

s = 0.6 mg/lt

Int. Confianza: \pm 0.8 mg/lt

Coef. Variacion: 3.9%

4. DISCUSION DE RESULTADOS

4.1. PRUEBA SEMICUANTITATIVA

El método propuesto por Gitlow y col ⁽⁴⁾ utiliza 4 gotas de orina, carbonato de potasio al 10% hasta completar 3 ml. agregación posterior de 4 gotas de una mezcla en volúmenes iguales de 4-nitroanilina al 0.1% y nitrito de sodio al 0.2%, agitación inmediata y finalmente la adición de alcohol isoamílico hasta completar 4.5 ml. La lectura se hace por comparación con un control preparado con 4 gotas de orina y 5 gotas de patrón de VMA de concentración 20 mg/lt.

El primer problema que se presentó fué el referente a las cantidades usadas, ya que a pesar de que 4 gotas pueden corresponder a "grosso modo" a 0.2 ml. esta medida depende fundamentalmente del tamaño del orificio del gotero usado. Se resolvió, pues, como paso preliminar modificar la téc-

nica en este aspecto reemplazando la cantidad 4 gotas por una medida más exacta: 0.2 ml, lo cual garantizaba también una mayor reproducibilidad de resultados. Sin embargo, aparecieron problemas en la evaluación de resultados. Algunas muestras con excreciones ligeramente elevadas daban colores no muy definidos y que por consiguiente se tenían que reportar como dudosos.

Por consiguiente, era imperativo encontrar un método para la evaluación objetiva de los resultados. El mismo Gitlow en una publicación anterior ⁽¹⁴⁾ propone el uso de la determinación de relaciones (R) de las absorbancias a 450 nm, con respecto a las absorbancias a 550 nm. Estos datos tuvieron una confirmación en la curva espectral del compuesto coloreado, efectuada mediante la duplicación del volumen de reactivos, para que hubiera un volumen suficiente de lectura, en la cual se observa un mínimo de absorbancia a 450 nm y un máximo a 550 nm (Fig. 5) Gitlow ⁽¹⁴⁾ reporta, sin embargo, el valor límite en 1.3. Este valor no correspondió al resultado obtenido en este trabajo, ya que al observar la curva espectral del compuesto coloreado del VMA en orina (Fig. 6) se ve que el mínimo determinado para el compuesto puro, a 450 nm. está enmascarado,

ya sea por otros compuestos que también reaccionan con el reactivo de color o por cromógenos presentes en la orina por lo cual los valores tienden a elevarse. En la misma curva se observa también que el máximo ha sido desplazado de 550 nm hacia 525 nm. Era, por consiguiente, lógico considerar más adecuada la relación A_{450}/A_{525} ; pero, ensayos realizados demostraron que los valores de R determinados con respecto a A_{525} variaban muy poco con los obtenidos a A_{550} y se resolvió, por consiguiente, mantenerse con este último valor que era el correspondiente al valor máximo de absorbancia del compuesto en estudio, además de que a 525 nm. la sustancia coloreada no sigue la ley de Beer.

4.1.1. Determinación del volumen óptimo de reactivo de color

Se prepararon patrones con una concentración aproximada de 11 mg VMA/lit y se les determinaron las curvas espectrales con respecto a la orina utilizada, sin adición de patron. (Figs. 7-10) y variando el volumen de reactivo de color. Como se puede ver, la mayor diferencia de absorbancias a 550 nm, sin que las lecturas individua-

les fueran demasiado altas. Se obtuvo con 1.2 ml. de reactivo de color. Con volúmenes superiores la lectura es tan alta, para un valor tan bajo de VMA que el método perdería mucha especificidad. Otra situación interesante de observar es que la mayor diferencia de absorbancia con 1.2 ml. de reactivo de color, se ha presentado a 550 nm. y nó a 525 nm, lo cual sigue justificando el uso de 550 nm. como longitud de onda para determinar el valor de R.

4.1.2. Determinación del valor límite de R

Una vez establecida la técnica de rutina, la cual se expuso en la sección 2.4.1. se procedió a determinar el valor de R para los individuos con excreción normal de VMA. Con ese fin, se tomaron las orinas de 60 individuos aparentemente sanos y cuyas edades variaban entre 1 y 22 años. A los individuos no se les impuso ningún tipo de restricciones dietéticas o farmacológicas para el examen. La muestra utilizada fue la primera eliminación urinaria del día y con éstas, se determinó el valor promedio y la desviación standard para R. El valor obtenido para $\bar{X} \pm 2S$ fué de 3.0 ± 1.0 (Tabla No. 1).

El valor superior (4,0) se descartó debido a que para efectos

diagnósticos lo importante es la excreción elevada de VMA, y no la disminuída. Por consiguiente, de acuerdo a estos datos, se puede establecer el límite de R para la excreción normal de VMA en 2.0.

Además de esto, se corrieron 10 muestras con un contenido de VMA correspondiente a una excreción de 10 mg/24 hr. obteniendo valores de $\bar{X} \pm 2S$ para estas muestras de 1.7 ± 0.4 . (Tabla No. 7).

Se puede observar una sobreposición de valores en estos resultados. Mientras que los valores normales van hasta valores de R de 2.0. Los resultados para excreciones de 10 mg/24 hr. van entre 2.1 y 1.7. Se resolvió, por consiguiente, considerar el valor límite en 2.1, basado en el criterio de que es preferible cuantificar el VMA en una orina normal a no determinar la excreción ligeramente elevada de VMA por considerarla normal.

Conviene anotar, el efecto que pudo tener la inclusión de las orinas de los niños en la evaluación del valor de R, pues se han podido determinar variaciones en la excreción de VMA con respecto a la edad. (Apéndice I). Sin embargo, los valores obtenidos para R en las orinas de los niños no difieren sustancialmente de los encontrados en las muestras de individuos de edad mayor. Todo esto confirma la validez del valor determinado para R.

4.1.3. Análisis del efecto de la dieta sobre el valor de R

De las 60 muestras utilizadas para determinar el valor de R, las primeras 48 correspondían a individuos entre 17 y 22 años (Tabla No. 1). De estas personas se tomaron muestras nuevas en aquellos individuos (nueve) que presentaron valores bastante bajos, sometiéndolos desde 48 horas antes de la toma de la muestra a restricciones de Café, frutas cítricas, bananos, alimentos con vainilla y cualquier tipo de drogas, ya que estos elementos han sido reportados como interferentes en la prueba. Con la nueva muestra se determinó otra vez el valor de R (Tabla No. 9) observándose en todos los casos un aumento, lo cual aparentemente indica una correlación entre la dieta y el valor de R. Sin embargo, al analizar las dietas, sin control, de los individuos en el primer análisis, se observa que individuos que tomaron alimentos que podían alterar el resultado de la prueba, en una cantidad mucho mayor que los nueve estudiados, mostraban valores de R menores. Esto pone en duda la validez de las restricciones dietéticas para la determinación del valor de R.

De todas maneras este aspecto se puede dejar a discreción del laboratorio, requiriéndose únicamente una determinación

del nuevo valor límite de R.

4.1.4. Efecto de la coloración de la orina o de sustancias interferentes.

Las únicas sustancias que pueden producir interferencia en la determinación son aquellos compuestos que eventualmente pudieran reaccionar con el reactivo de color, producir una coloración roja de suficiente intensidad como para provocar una prueba falsamente positiva y además ser extraíbles por el alcohol isoamílico.

Este tipo de sustancias no es común y el tener que cumplir las tres condiciones anteriormente anotadas hace que prácticamente no haya productos interferentes en la prueba.

Más aún, se ha practicado la prueba a 44 muestras control sin que hasta el momento se haya presentado una prueba falsamente positiva.

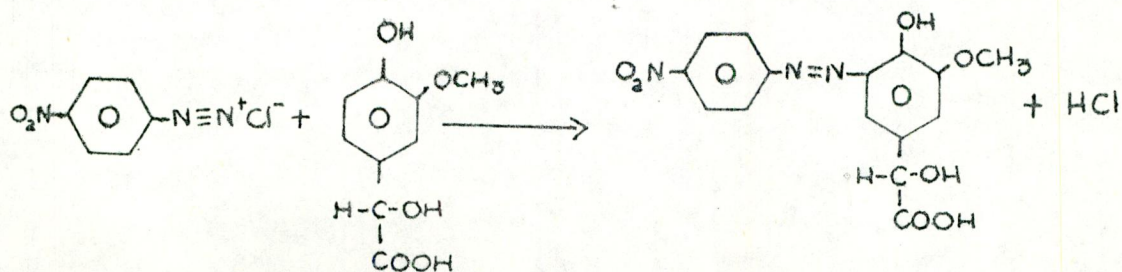
Con respecto a orinas intensamente coloreadas, ya sea por drogas o hemoglobinuria, se debe tener en cuenta que al agregar el carbonato de potasio, el cual es incoloro, el colorante se diluye 15 veces. Por lo cual el aporte de color por la orina se vuelve despreciable. Nuevamente, las

pruebas realizadas han confirmado la suposición.

Las orinas excesivamente turbias por cristales o albuminuria pueden presentar inconvenientes durante la separación de la capa de alcohol isoamílico, por tendencia a formar emulsiones. Esta situación no se corrige por el hecho de filtrar la orina antes de realizar la prueba, lo cual hace inútil la práctica. El problema se resuelve tomando la mayor cantidad posible de emulsión como fase orgánica y centrifugando posteriormente. La velocidad y el tiempo de centrifugación sugeridos permiten la separación, ahora si clara, de las dos capas, en la cual la fase acuosa queda en el fondo del tubo y la fase orgánica queda traslúcida y preparada para ser leída en el espectrofotómetro.

4.1.5. Base Química de la reacción

La reacción química que sucede es una reacción de copulación entre la 4-nitroanilina diazotada y el ácido vanilmandélico tal como se describe a continuación para formar el ácido 3-p-nitrofenilazo-4-hidroxi-5-metoximandélico.



La copulación con el catión diazonio es una sustitución aromática electrófila típica. Sin embargo, el ion diazonio es un electrófilo muy débil y de ordinario sólo ocurre la copulación cuando el núcleo aromático con el cual va a reaccionar lleva sustituyentes muy activos como el -OH. (este grupo es un orientador a posición para, y si ya está ocupada es un orientador a orto). No obstante, los iones diazonio llegan a poseer una reactividad electrófila mayor cuando tienen sustituyentes que extraen electrones tales como -NO₂ en las posiciones orto o para de su anillo aromático. Se puede ver como todas estas condiciones son cumplidas por la 4-nitroanilina diazotada.

El carbonato de potasio cumple una doble función. Por un lado impide que se acidifique el medio por la producción de ácido clorhídrico y por otro lado tiende a estabilizar el compuesto coloreado por resonancia.

4.1.6. Correlación clínica de la prueba

Hasta el momento, la prueba ha presentado un 100% de validez con las impresiones diagnósticas, lo cual contrasta con los resultados obtenidos por Gitlow y col (4) el cual reporta una correlación para su prueba de 91%. Sin

embargo los resultados obtenidos en este trabajo requieren una revisión de pacientes con neuroblastoma más amplia, ya que debido a la dificultad de trabajar en este medio con grupos cooperativos, los pacientes con neuroblastomas con firmados son muy escasos. Ante esta dificultad, se ha op tado por chequear la validez de la prueba, a través del se- guimiento de los pacientes con diagnóstico establecido. En los tres casos escogidos, la normalización de la excreción de VMA como se detecta en esta técnica ha coincidido con la disminución progresiva del tamaño de la masa tumoral inicial, y la mejoría clínica del paciente después del tratamiento con quimioterapia.

4.2. DETERMINACION CUANTITATIVA

4.2.1. Estandarización de la prueba

Las determinaciones de VMA por cromatografía de capa delgada, han sido hasta el momento deter^u minaciones semicuantitativas o cuantitativas, que han usado la comparación de los colores producidos por el VMA en las muestras, con el color producido por patrones de diver^u sas concentraciones^(13, 15), o la cuantificación directa por densitometría⁽¹²⁾. La mayoría de estas técnicas usan la

4-nitroanilina diazotada en medio básico, como reactivo de color con el inconveniente, en comparación a la prueba en tubo, de la inestabilidad del diazoreactivo en medio alcalino, situación que no se puede eliminar debido a la necesidad de mezclar el diazoreactivo con el carbonato para asperjar la placa. Si la aspersion no se hace dentro del minuto siguiente a la preparación del reactivo el compuesto se descompone y pierde su reactividad. La 2.6 dicloroquinonaclorimida es mucho más estable, no presenta problemas de consecución y es, por consiguiente, mucho más adecuada como reactivo de coloración.

Los problemas que planteaba este reactivo, más usado para la determinación de vitamina B₆, que para la determinación de VMA, eran los siguientes: ¿Cuál es la apariencia de la curva espectral y qué tan estrecho es el máximo de absorbancia ?. Y, en segundo lugar, ¿ sigue el compuesto coloreado la ley de Beer ?. Ambos problemas tenían una fácil elucidación experimental. Se procedió por consiguiente a la determinación de la curva espectral del compuesto coloreado, observando un máximo claro y definido de absorbancia a 590 nm. (Fig. 11). Inmediatamente después, se procedió a determinar si el compuesto seguía la ley de Beer. Se preparó un patrón de VMA de 100 mg% en solu-

ción extractiva y a partir de éste se prepararon patrones de 50, 40, 30, 20 y 10 mg% disolviendo la solución madre en solución extractiva. Se sembraron estos cinco patrones en la cromatoplaça y se les practicó el procedimiento rutinario para las muestras. Se revelaron, rasparon y eluyeron adecuadamente y finalmente se les determinó la absorbancia. (Tabla No. 4, Figura 12).

El siguiente paso a confirmar era la extracción del VMA a partir de las muestras. La técnica de determinación empleando como revelador la 2.6 dicloroquinonaclorimida ⁽¹³⁾, recomienda el uso de tres extracciones con éter etílico a partir de 1/25 del volumen de orina eliminado en 24 horas. Se hizo el ensayo de la extracción con éter, observándose que la extracción no era siempre proporcional al contenido de VMA en la orina, además de presentar los inconvenientes de un volumen grande de muestra a procesar y la formación continua de emulsiones al agitar.

Se procedió, por consiguiente, a reemplazar el método de extracción por el método descrito por Pisano ⁽¹¹⁾ empleando acetato de etilo como extractante a partir de orinas aciduladas con ácido clorhídrico y saturadas con cloruro de

sodio. Este método de extracción ha sido descrito como efectivo por Kasser y von Studnitz⁽¹⁶⁾ y además se ha reportado un 95% de recuperación con esta técnica⁽¹²⁾. Se preparó en consecuencia un patrón que tuviera 100 mg VMA/lit en orina, se procesó por cuadruplicado y se compararon los dos métodos de extracción. Los resultados se pueden observar en la Tabla 5. En ésta, se ve como a pesar de que el promedio obtenido según los dos métodos no varía significativamente la desviación standard si lo hace y, por lo tanto, el coeficiente de variación disminuye notablemente dándole mayor confiabilidad al método.

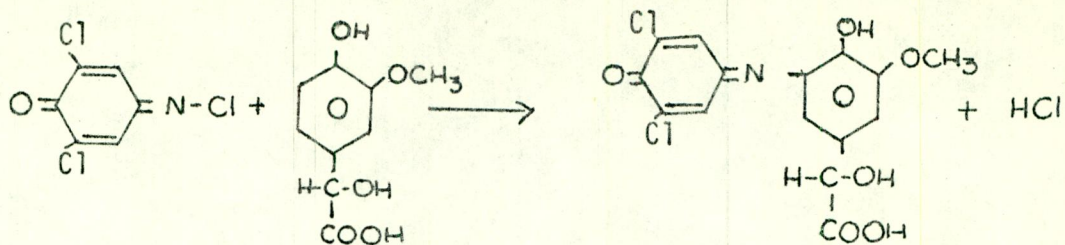
Sin embargo, se presentó en este caso el inconveniente del volumen tan reducido de muestra que para orinas con una excreción de VMA apenas superior a la normal no darían cantidades cuantificables después de realizar la cromatografía. En base a los datos de absorbancia de la Tabla 5, se calculó el máximo de VMA cuantificable, correspondiendo a un porcentaje de transmitancia del 90%. De esta manera se determinó que para orinas con un contenido ligeramente elevado de VMA, el volumen requerido era de 10 ml. Esto implicaba duplicar todas las cantidades según el método, incluyendo el acetato de etilo, lo cual prolongaba el tiempo de evaporación.

Se ensayó, entonces, la extracción de un mismo patrón de orina de 15 mg/lt. a partir de 5 y 10 ml. de orina, manteniendo constante el volumen de acetato de etilo en 30 ml. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla No. 6. En esta tabla se vé, que la extracción con 10 ml. fué tan efectiva como con 5 ml. obteniendo inclusive una dispersión menor de los datos. La confirmación de extracción del VMA se hizo realizando la prueba semicuantitativa en las muestras tratadas obteniéndose cambios en los valores de R de por ejemplo 1.9 a 3.5 ó de 2.0 a 4.7. De esta manera, se completó el método tal como se describe en la sección 2.4.2.

La confirmación de la identidad del VMA, se hizo por comparación de la distancia de recorrido ($R_f=0.21$) con la del patrón que se corre simultáneamente.

4.2.2. Base Química de la reacción

La reacción que sucede entre el VMA y la 2.6 dicloroquinonaclorimida, es la siguiente :



En este caso, a diferencia de la situación anterior, no ocurre una reacción de copulación, pero de todas maneras una reacción de sustitución electrofílica con formación del ácido 3-(3.5 dicloro-4 quinonimidil)-4-hidroxi-5-metoximandélico.

La 2.6 dicloroquinonaclorimida entra al anillo fenilo orientado hacia la posición orto por el grupo hidroxilo ya que de los tres sustituyentes en el ácido vanilmandélico este es el orientador más fuerte. Como el grupo hidroxilo es un orientador a posiciones orto y para, pero en este caso la posición para está ocupada por el grupo -CHOH-COOH, la única posición disponible para el acoplamiento del reactivo es la posición orto.

Vale la pena aclarar finalmente, que el amoníaco, al igual que el carbonato de potasio, estabiliza el compuesto formado por resonancia contribuyendo de esta manera a la aparición de un color azul fácilmente identificable y cuantificable.

4.3. CONFRONTACION DE LOS METODOS PROPUESTOS CON UN METODO YA ESTABLECIDO

Durante el proceso de estandarización tanto de la prueba semicuantitativa, como cuantitativa, las muestras fueron analizadas simultáneamente por el método de Pisano (11). En el caso de la prueba semicuantitativa, los resultados coincidieron con respecto a la elevación o no, de la excreción de VMA. Aquellas orinas que tenían una excreción normal de VMA dieron valores de R correspondientes a esta situación. En cuanto a la determinación cuantitativa los resultados coincidieron completamente. Todos los datos tienden a confirmar la bondad de las técnicas utilizadas.

4.3.1. Deducción de la fórmula para calcular los resultados

Se tiene un patrón de concentración 25 mg%, de este patrón se siembran 0.1 ml. por consiguiente se siembran $2,5 \times 10^{-2}$ mg de VMA.

$$\frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs patrón}} \times 2,5 \times 10^{-2} = X \quad (\text{A})$$

donde X corresponde a los mg de VMA sembrados a partir de la muestra.

Como estos mg estaban contenidos en 0.1 ml. que provienen de 2.0 ml. de disolución total, entonces la expresión (A) se debe multiplicar por 20 para conocer el contenido de VMA en la muestra tomada.

$$\frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs patrón}} \times 0.5 = Y \quad (\text{B})$$

Donde Y representa los mg de VMA en la muestra tomada para efectuar la extracción.

Efectuando la corrección para el volumen de orina en 24 horas, la ecuación (B), queda :

$$\frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs patrón}} \times 0.5 \text{ mg VMA} \times \frac{V_T}{V_O} = Z \quad (\text{C})$$

Donde Z representa los mg de VMA eliminados por la orina en 24 horas.

5. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado en el presente trabajo una nueva metodología para la determinación semicuantitativa y cuantitativa de la excreción de VMA en la orina, con aplicación al diagnóstico de pacientes que padecen neuroblastoma y feocromocitoma.

Con respecto a la determinación semicuantitativa, se puede decir, que se ha presentado un método fácil, económico, rápido y objetivo que permite discriminar entre aquellas orinas que requieren cuantificación de su contenido de VMA por encontrarse este elevado, y aquellas orinas cuyo contenido de VMA es normal.

Para poder aplicar la técnica semicuantitativa, no se requieren restricciones de dieta o drogas en el paciente.

El método semicuantitativo no ha presentado deficiencias hasta el momento, aunque esto se puede deber al número redu-

cido de pacientes con neuroblastoma que han sido examinados por esta técnica.

Con respecto al método cuantitativo se presenta una metodología nueva que permite la cuantificación adecuada de VMA empleando un reactivo de color más estable que los descritos hasta el momento, y un método de extracción conveniente.

Se ha descrito⁽¹³⁾ la posibilidad de determinar otros metabolitos de las catecolaminas como son el ácido homovainílico (HVA) y el ácido vainílico (VA), así como el metabolito de la serotonina, el ácido 5-hidroxiindol acético, (5 HIAA) el cual se encuentra elevado en el caso de los tumores carcinoides, con lo cual la utilidad y ventajas del método quedan confirmadas. Sin embargo, ensayos preliminares han mostrado que a pesar de que el VA y el 5HIAA se revelan bien, el HVA no produce un compuesto coloreado con la 4-nitroanilina diazotada y que el color producido por el HVA con la 2.6 dicloroquinonaclorimida es demasiado tenue y por consiguiente, tiende a quedar enmascarado por algunos cromógenos extraídos de la orina. Se requieren por consiguiente, ensayos posteriores tendientes a investigar el grado de recuperación del VA, HVA y el 5HIAA al efectuar la extracción con el mé-

todo descrito en este trabajo, y encontrar un revelador adecuado para el HVA. Posiblemente, el ácido 2-nitroso-1-naftol sulfónico descrito por Knight y Haymond ⁽¹⁸⁾ para efectuar un doble revelado en la placa. De esta manera, se tendría un mejor control sobre la excreción de los metabolitos de las catecolaminas con el fin de contribuir más eficazmente al diagnóstico y seguimiento en los pacientes afectados con neuroblastoma y feocromocitoma.

2/25/82

6. RESUMEN

La determinación de la excreción urinaria del ácido vanilmandélico es un parametro útil en el diagnóstico de tumores como el neuroblastoma o el feocromocitoma. Se describen en este trabajo una técnica semicuantitativa que permite clasificar las muestras de orina en aquellas que tienen un contenido elevado de VMA y, por consiguiente, requieren una cuantificación y aquellas cuyo contenido de VMA es normal.

La prueba semicuantitativa es una modificación de la técnica propuesta por Gitlow y col ⁽⁴⁾ modificando el volumen de reactivo de color y el criterio de positividad. Según Gitlow, este criterio es una comparación de colores, mientras que para este trabajo es una relación entre las absorbancias del compuesto a 450 y 550 nm. Por medición estadística se estableció el límite normal para el valor de R en 2.1, para una excreción máxima de VMA de 6 ng/24 horas. La prueba presentó hasta el momento un 100%

de correlación con la clínica de los pacientes y la medición de VMA por el método de Pisano ⁽¹¹⁾. En esta prueba no se presentan interferencias debido a dieta, drogas, o colorantes presentes en la orina.

La prueba cuantitativa es una modificación de las técnicas de Pisano ⁽¹¹⁾ Mc Gregor y col ⁽¹²⁾ y Merck ⁽¹³⁾. Se hace una extracción del VMA con acetato de etilo a partir de la orina acidulada con ácido clorhídrico y saturada con cloruro de sodio, separando el VMA por cromatografía en capa delgada, se revela con 2.6 dicloroquinonaclorimida, y se intensifica el color con amoníaco. El método muestra una gran precisión y exactitud chequeada por el método de Pisano ⁽¹¹⁾, y permite contemplar la posibilidad de cuantificar de la misma manera otros metabolitos como son el ácido homovainílico, el ácido vainílico y el ácido 5-hidroxiindolacético.

APENDICE I

Valores normales para el ácido 3-Metoxi -4hidroximandélico en
(19)
orina de niños .

Valores normal para VMA en orina en niños (ug/mg de
creatinina).

	E d a d				
	1- 12 meses	1- 2 años	2- 5 años	8-10 años	10-15 años
No. de sujetos	41	41	41	41	41
Rango	0-4-36.8	1.9-37.3	0.7-18.9	0.4-17.5	0.2-12.5
Promedio	15.0	13.6	7.1	6.7	4.8
Desviación Standard	9.9	8.3	4.2	3.6	2.8
Rango normal (+ 2S)	0-34,8	0-30.2	0-15.5	0-13.9	0-10.4

A P E N D I C E II

TRATAMIENTO ESTADISTICO

Se calcularon cuando fueron necesarios, el promedio aritmético y la desviación standard de los resultados. Se calculó el promedio aritmético debido a que para el caso de cuatro observaciones, la mediana tiene una eficiencia relativamente baja :

$$0.69^{(19)} .$$

Para la desviación standard en el caso de un número bajo de observaciones se calculó S_w . el cual es un valor más real para cuatro determinaciones que la desviación standard corriente la cual estaría más sujeta a valores extremos S_w se calculó de acuerdo a :

$$S_w = W \cdot K_w$$

donde K_w es una constante que depende del número de observaciones y para el caso de cuatro observaciones es 0,43 y W es

el intervalo o sea la diferencia entre los dos valores extremos.

Se calcularon enseguida los límites de confianza de acuerdo a la prueba "t" de Student (17).

$$X = t.s \sqrt{n}$$

tomando el valor adecuado de t : 2,78 y como S, el valor de S_w .

Finalmente, se calculó el coeficiente de variación de acuerdo a la fórmula.

$$C. v = \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

BIBLIOGRAFIA

- (1) ROGERS, L.E.; LYON, G.M.; PORTER, F.S.; Spot Test for vanillylmandelic acid and other guaiacols in urine of patients with neuroblastoma. Am. J. Clin. Path. 58: 383-387, 1972.
- (2) BRAY, P.F. Wu. J.T.; MYERS G.G. Reliable Chemical Diagnosis of Neuroblastoma Better than Screening. N. Eng J. Med 295 : 230 -231, 1976.
- (3) ARMSTRONG M.D.; Mc MILLAN, A.; SHAW, K.N.F.; 3 Methoxy 4 hidroxi - D-mandelic acid; a urinary metabolite of norepinephrine Biochem Biophys. Acta 25 : 422-423, 1957.
- (4) GITLOW, S.E.; BERTANI, L.M. RAUSEN, A.; GRIBETA, D; DZIEDZIC, SW, Diagnosis of Neuroblastoma by Qualitative and Quantitative Determination of Catecholamine metabolites in urine. Cancer 25: 1377-1383, 1970.
- (5) SUNDERMAN, C.R.; SUNDERMAN, F.W; BALLINGER, W.F.; Measurement of serum VMA in a Patient with pheocromocytoma . Am J. Clin. Path.43: 122-129, 1965.
- (6) LA BROSSE, E.M; Biochemical Diagnosis of neuroblastoma use of a urine spot test (abstract); Proc. Am. Assoc. Cancer Res, 9: 39, 1968.

- (7) ROBINSON, R. ; RATCLIFFE, J. ; SMITH, P. ; A
Screening test for Pheocromocytoma; J. Clin.Pathol;
12: 541-543, 1959.
- (8) VON STUDNITZ, W. ; HANSON, A. ; Determination of
3-methoxy - 4 - hidroxy- mandelic acid in urine by
high voltage paper electrophoresis Scandinv J.
Clin. Lab. Invest. 11:101- 105, 1959.
- (9) HERMANN, G.A. ; The determination of urinary 3- methoxy
4- hidroxy- mandelic (vanilmandelic acid) by means of
eletrophoresis with cellulose acetate membrane Am. J.
Clin. Path. 41: 373- 376, 1964.
- (10) WILLIAMS, C. M ; LEONARD R.H. ; Microanalytical deter-
mination of dihydroxi aromatic acids by gas chroma-
tography Anal Biochem - 5 : 362- 366, 1963.
- (11) PISANO, J. J. ; CROUT, R.J. ; ABRAHAM, C. ; Determi-
nation of 3 methoxi - 4 - hydroxymandelic acid in urine.
Clin. Chim. Acta; 7: 285-291, 1962.
- (12) Mc GREGOR, R.F. ; KHAN, M. ; MARRACK, D. ; SULLIVAN
M.P. ; Quantitative analysis of 4- hydroxy - 3 methoxy
mandelic acid by direct photometric. Scanning of Urinary
extracts separated by thin layer chromatography; Am. J.
Clin. Path. 46 (2): 163-171, 1966.
- (13) MERCK; Clinical Laboratory Cap. IV p.p. 395- 400 Ila. ed.
Edit. por E. Merck, Darmstadt, 1974.
- (14) GITLOW, S.E. ; ORNSTEIN, L. ; MENDLOWITZ, M. ; KHASIS,
S. ; KRUB, E. ; Simple Colorimetric Urine Test for Pheo-
chromocytoma. Am. J. Med. 28: 921- 926, 1960.

- (15) MERCK, Handbook of Laboratory Techniques, pp. 94-95
Edit by E. Merck Darmstadt, 1975.
- (16) KASSER, M. VON STUDNITZ, W.; Urine of Children
with sympathetic tumors the excretion of 3-methoxy
4-methoxy-hydroxymandelic acid. Am. J.
Dis. Child. 102: 199-204, 1961.
- (17) KNIGHT, J.A.; HAYMOND, R.E.; Improved Colorimetry
of Urinary 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid
(Homovanillic Acid). Clin. Chem. 23 (11): 2007-
2010, 1977.
- (18) HAYMOND, R.E.; KNIGHT, J.A.; BILLS, A.C.; Normal
Values for Urinary 3-Methoxy-4 hydroxymandelic
Acid (VMA) in Children. Clin. Chem. 24 (10):
1853-1854, 1978.
- (19) DEAN, R.B. DIXON, W.J. Simplified Statistics for small
number of observations. Anal. Chem. 23 (4):
636-638. 1951.

I/25/82

- ACIDO VANILMANDELICO
- DIAGNOSTICO
- NEUROBLASTOMA
- FEOCROMOCITOMA
- URINA

Instituto Nacional de Cancerología



INC002337