

## Monografía

# Catecolaminas vs. metanefrinas en el diagnóstico bioquímico de feocromocitoma y paraganglioma



P. Brenzoni<sup>a</sup>, D. Fabbro<sup>a</sup>, S. Fares Taie<sup>a</sup>, S. Garcia<sup>a</sup>, G. Gotta<sup>a</sup>, D. Lotero Polesel<sup>a</sup>, V. Ricci<sup>a</sup>, A. Kozak<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Alumnos del IV Curso de Especialista en Bioquímica Endocrinológica. <sup>b</sup> Tutora y Directora del IV Curso de Especialista en Bioquímica Endocrinológica, SAEM

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 11 de abril de 2018

Aceptado el 14 de mayo de 2018

#### Palabras clave:

Feocromocitoma

Catecolaminas

Metanefrinas

Diagnóstico bioquímico

### R E S U M E N

Los tumores secretores de catecolaminas, feocromocitoma y paraganglioma son entidades poco frecuentes y potencialmente letales si no son diagnosticadas y tratadas a tiempo.

El laboratorio cumple un rol fundamental en el diagnóstico y seguimiento de estos tumores a través de la evidencia bioquímica de un exceso de catecolaminas. Sin embargo, muchas veces suele ser dificultoso arribar a un diagnóstico temprano, debido a la baja incidencia de estos tumores y a la dificultad de hallar laboratorios con equipamiento especializado.

El marcador bioquímico y las técnicas utilizadas para su medición han ido cambiando con el correr de los años. Tradicionalmente, la medición de catecolaminas en orina era la prueba bioquímica utilizada. Posteriores hallazgos de metabolitos aumentados en la orina de paciente llevaron al uso de ensayos colorimétricos para la detección de ácido vainillín mandélico y metanefrinas como marcadores diagnósticos adicionales de tumor. Las pruebas actuales para el diagnóstico bioquímico muestran una excelente precisión diagnóstica. La medición de metanefrinas libres de plasma utilizando cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica o de espectrometría de masas en tándem proporciona la máxima precisión para el diagnóstico de estos tumores.

### Catecholamines vs. metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma

#### A B S T R A C T

Catecholamine-secreting neuroendocrine tumors called Pheochromocytoma and Paraganglioma are rare entities, but potentially lethal if diagnosis and treatment are not established early enough.

Clinical Laboratory plays an important role in the diagnosis and follow-up of these tumors, through the biochemical evidence of a hyperproduction of catecholamines and its metabolites.

#### Keywords:

Pheochromocytoma

Catecholamines

Metanephrines

Biochemical diagnosis

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: andrea.kozak@hospitalitaliano.org.ar (Andrea Kozak)

However, it is often difficult to arrive at certain early diagnosis, due to the low incidence of these tumors as well as the lack of access to specialized laboratories. The biochemical markers and the analytical methods for its measurement have been changing over the years. Traditionally, the quantification of catecholamines in urine has been the most important biochemical test. Subsequent findings of increased urine metabolites in patients with pheochromocytoma led to the use of colorimetric assays for the detection of vanillin-mandelic acid and metanephrines as additional diagnostic biomarkers. Currently, biochemical tests show an excellent diagnostic performance, and the measurement of plasma-free metanephrines using high performance liquid chromatography with electrochemical or tandem mass spectrometry detection provide maximum accuracy for the diagnosis of these tumors.

## Introducción

Los tumores secretores de catecolaminas (CA) que surgen de las células cromafines de la médula adrenal y los ganglios parasimpáticos se denominan feocromocitoma (PL) y paraganglioma (PGL), respectivamente<sup>1</sup>. El 80-85% de estos tumores se localizan en la médula adrenal y el resto en el tejido cromafín extra adrenal<sup>2</sup>. Son entidades poco frecuentes, presentando una incidencia global de 0,8-2/100.000 individuos por año<sup>3</sup>. La edad del paciente al momento del diagnóstico se asocia al fenotipo del tumor y la existencia de mutaciones patológicas subyacentes<sup>4</sup>.

Estos tumores se asocian con síndromes genéticos como: la Neoplasia Endocrina Múltiple (NEM) siendo el NEM tipo 2, producido por mutaciones en el protooncogen RET, el más frecuente; el síndrome Von Hippel-Lindau (VHL) que involucra el gen VHL; la neurofibromatosis 1 (NF1) debido a mutaciones en el gen NF1; síndromes de paraganglioma asociados a mutaciones en las cuatro subunidades del gen de la Succinato Deshidrogenasa (SDH): Tipo 1 por mutación del gen SDHD, Tipo 2 por mutación del gen SDHAF2, Tipo 3 por mutación SDHC, Tipo 4 por mutación SDHB, y mutaciones en otros genes como MAX y TMEM127 involucrados en la señalización de factores de crecimiento<sup>5</sup>.

PLs se caracterizan por exhibir síntomas adrenérgicos clásicos debido a la secreción esporádica de catecolaminas en exceso, como cefalea, palpitaciones, ansiedad y diaforesis<sup>6</sup>. La hipertensión puede ser persistente, asociada a los tumores secretores de noradrenalina, o paroxística, asociada a tumores secretores de ambas catecolaminas<sup>5</sup>, y si no se trata, es responsable de las complicaciones neurológicas, psiquiátricas, oculares y cardíacas<sup>3</sup>. Sin embargo con frecuencia suele observarse una masa suprarrenal clínicamente silente hallada durante estudios de imágenes, que se denomina incidentaloma. El 10-15% de los mismos son asintomáticos y el 50% son normotensos<sup>5</sup>. Es importante realizar el diagnóstico de forma temprana, ya que esto permite la curación tras la remoción quirúrgica del tumor<sup>7,8</sup>. En este sentido, el rol del laboratorio es fundamental a través de la medición de marcadores bioquímicos de alta sensibilidad y especificidad, que confirman el exceso de CA.

## Metabolismo de catecolaminas

Las CA (adrenalina, noradrenalina y dopamina) son neurotransmisores del sistema nervioso simpático que cumplen un rol clave en la regulación de procesos fisiológicos; asimismo, la adrenalina puede actuar como una hormona ejerciendo su acción en tejidos periféricos. Por otro lado, las alteraciones en el metabolismo de las CA pueden desarrollar trastornos neurológicos, psiquiátricos, endocrinológicos y cardiovasculares<sup>9</sup>. Entre los trastornos mencionados se destacan el riesgo de ACV, encefalopatía, ansiedad, miedo a la muerte, HTA, palpitaciones, taquicardia, arritmias y/o IAM. El conocimiento del metabolismo de las CA es primordial para el estudio del sistema fisiológico y la comprensión de las alteraciones que ocurren en la enfermedad.

El paso limitante en su síntesis es la conversión de L-tirosina en L-DOPA llevado a cabo por la tirosin hidroxilasa. Dicha enzima se encuentra presente en neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas del sistema nervioso central (SNC), nervios simpáticos y células cromafines adrenales y extra adrenales<sup>8</sup>.

La adrenalina (A) se sintetiza a partir de la noradrenalina (NA) por acción de la feniletanolamina n-metil transferasa (PNMT). Existen dos tipos de células cromafines: las adrenérgicas que contienen PNMT y, por lo tanto, sintetizan y almacenan A, y las noradrenérgicas que no contienen PNMT y, como consecuencia, sintetizan y almacenan NA. Las células cromafines de la médula adrenal son mayormente de tipo adrenérgico; como consecuencia, el 90% de la A circulante es de origen adrenal. Por otro lado, NA es el producto final de las neuronas del simpático y algunas del SNC. Alrededor del 93% de NA circulante proviene de sinapsis simpáticas<sup>8</sup>.

Una vez sintetizadas, las CA son almacenadas sin cambios bioquímicos dentro de los gránulos cromafínicos de la médula adrenal y en las neuronas post-ganglionares, en vesículas de almacenamiento unidas a la membrana, complejadas con proteínas no difusibles (cromograninas)<sup>10</sup>. La integridad de los gránulos las protege de la inactivación enzimática.

Es importante señalar que la mayor parte de las CA se metaboliza en las células donde se sintetizan y que este proceso es prácticamente independiente de la liberación exocítica<sup>8</sup>.

Las principales vías de degradación involucran dos enzimas, la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT), produciendo una serie de metabolitos. La desaminación por la MAO representa la vía más importante que dará lugar a la formación de dihidroxifenilglicol (DHPG). El segundo camino más importante incluye a la COMT, que lleva a la formación de metanefrina (MN) y normetanefrina (NMN). Dichas enzimas se encuentran intracelularmente, por lo que se necesita la captación de las CA liberadas para que se metabolicen. Existe captación tanto a nivel neuronal como extraneuronal y las enzimas encargadas del metabolismo presentan distinta distribución, por lo tanto el metabolito que se forme va a depender de la vía que haya sido involucrada<sup>8</sup>.

El catabolismo de catecolaminas liberadas por las neuronas es principalmente por la vía neuronal: la mayoría de la NA sintetizada y liberada por las neuronas es recapturada (92%) y metabolizada allí mismo. La MAO es la única enzima presente en las neuronas, por lo tanto las CA recapturadas a nivel neuronal van a ser convertidas en DHPG. En las células cromafines de la médula adrenal se encuentra tanto la MAO como la COMT, con un neto predominio intracitoplasmático de COMT que degrada la A, principalmente la que difunde del gránulo al citoplasma transformándola en MN.

La contribución del metabolismo adrenal a las concentraciones circulantes de DHPG es mínima en comparación a lo aportado por el metabolismo neuronal. Por el contrario, el 90% de la MN circulante y 40% de NMN circulante son producidos en la médula adrenal. El metabolismo de las CA en las células tumorales del PC es igual al que se produce en las células cromafines de la médula adrenal<sup>8</sup>.

El producto final del metabolismo de las CA es el ácido vainillín mandélico (VMA) producido casi exclusivamente en el hígado a partir de la A, NA, NME, ME, DHPG extraídos de la circulación. Menos del 20% del AVM deriva del metabolismo hepático de las CA y MN circulantes y más del 80% proviene de los metabolitos desaminados de las CA (DHPG)<sup>8</sup> (fig. 1).

Las CA son extensamente conjugadas antes de alcanzar la circulación, los niveles de catecolaminas libres (no conjugadas) en plasma y orina son independientes de las influencias dietarias<sup>11</sup> y reflejan con mayor seguridad la producción endógena. En el plasma, casi el 99% de la DA y alrededor del 60-70% de la NA y A circulantes existen como conjugados con sulfato y son excretadas junto con sus derivados O-metilados en orina como conjugados glucurónido y sulfato.

## Consideraciones analíticas

Tradicionalmente, la medición de catecolaminas en orina era la prueba bioquímica utilizada para el diagnóstico de PC y PGL. Las técnicas que se utilizaban en ese entonces eran bioensayos y ensayos fluorimétricos<sup>12</sup>.

Posteriores hallazgos de metabolitos aumentados en la orina de paciente con PC llevaron al uso de ensayos espectrofotométricos para la detección de VMA, y de metanefrinas como marcadores diagnósticos adicionales de tumor.

La mayor concentración en orina de éstos, en comparación con las CA en suero, significaba una ventaja<sup>12</sup>. Dos circunstancias provocaron un cambio en la prueba bioquímica elegida para hacer el diagnóstico de PC-PGL: por un lado, el avance en las tecnologías de los ensayos que permitieron

determinar concentraciones plasmáticas más bajas de metanefrinas<sup>13</sup> y, por el otro, avances en el entendimiento del metabolismo de las catecolaminas<sup>12</sup>.

La aparición de técnicas más sensibles como ensayos radioenzimáticos y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) permitieron detectar CA en plasma y orina, utilizándose para la detección bioquímica de PC, a pesar de que ya en ese momento se sabía que el metabolismo de las CA se llevaba a cabo en las mismas células donde eran sintetizadas y de forma independiente a la secreción de las mismas a circulación.

En 1980 surgieron los métodos radiológicos en el diagnóstico por imagen, y con ellos la detección de incidentalomas.

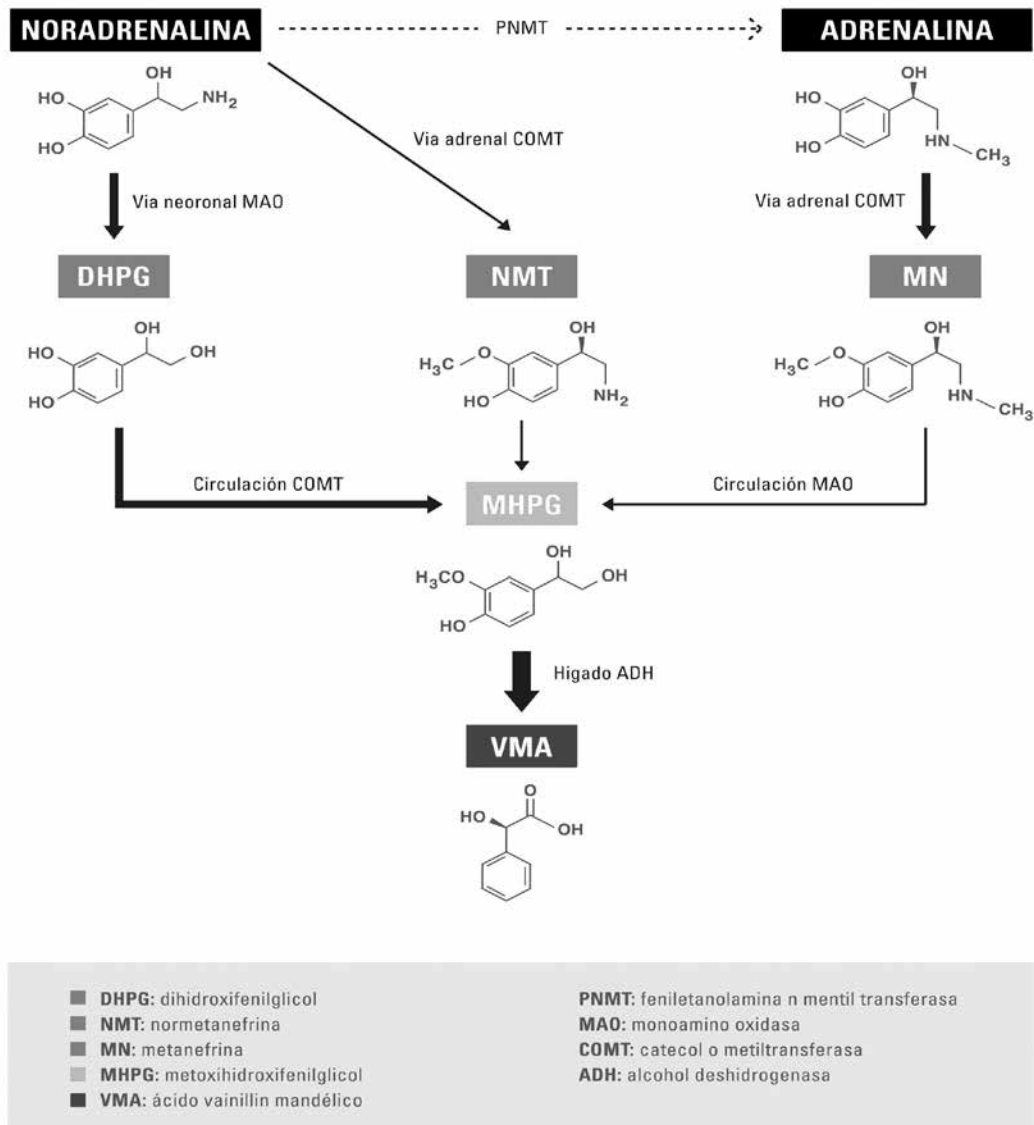
Por otro lado, el reconocimiento de síndromes hereditarios como causa de algunos PC y los avances en genética molecular trajeron como consecuencia que la búsqueda bioquímica de PC-PGL no sólo debía hacerse en pacientes con sospecha clínica, sino también en aquellos asintomáticos portadores de mutaciones relacionadas. Se llegó a la conclusión que podía haber tumores silentes, no secretantes, y por lo tanto, la determinación de CA como marcador bioquímico perdía sensibilidad. En cambio, las metanefrinas, que se sintetizan en forma continua e independiente de la liberación de CA, resultan marcadores de mayor sensibilidad para el diagnóstico de PC-PGL.

En Argentina se utiliza HPLC con detección electroquímica (HPLC-ED) para la cuantificación de A, NA, DA, NM, NMN y AVM, y el método espectrofotométrico para AVM urinarios. Por el momento no están disponibles en nuestro país las medidas de MN y NMN plasmáticas.

Se ha demostrado que HPLC-ED provee una técnica específica y sensible capaz de ser automatizada y es la más comúnmente utilizada. El paso inicial de purificación, previo a la separación cromatográfica es de importancia crítica, involucrando generalmente una extracción en fase sólida. El pretratamiento de las muestras es a menudo más simple con HPLC y detección electroquímica que con detección por fluorescencia (actualmente en desuso), ya que esta última generalmente requiere la formación de derivados fluorescentes estables, suele estar más interferida por drogas que posean propiedades fluorescentes.

Con respecto de NMN y MN urinarias, hay que considerar que son excretadas en la orina tanto de forma libre como conjugadas con sulfato y glucurónido, representando la fracción libre menos del 3% del total. El uso de HPLC permite la detección de ambos analitos en orina (libres y conjugadas, por aplicación de hidrólisis preliminar), reportándose de todas maneras una performance diagnóstica superior utilizando su medida en plasma<sup>14</sup>.

Existe una numerosa cantidad de trabajos en la literatura que reportan determinaciones de CA basadas en diferentes tipos de ensayos, pero HPLC con detección amperométrica o coulométrica (HPLC-EC) es el procedimiento analítico dominante debido a su versatilidad (adaptables a la determinación urinaria y a la medición de otros metabolitos), simplificación de los tratamientos preliminares y menor cantidad de interferencias. Contrariamente, si bien se han desarrollado varios procedimientos basados en inmunoensayos, los problemas asociados con la especificidad de los anticuerpos para estos haptenos de bajo peso molecular han restringido su aceptación, debiendo generarse sistemas analíticos dirigidos contra los derivados N-acetilados, dada



**Figura 1 - Metabolismo de las catecolaminas:** en el gráfico se observan las principales moléculas y enzimas involucradas en el metabolismo de las catecolaminas por la vía neuronal y la vía adrenal. El grosor de las líneas denota la importancia de la reacción enzimática.

la baja inmunogenicidad de las CA y las metanefrinas para generar anticuerpos<sup>15</sup>.

Estudios más recientes han mostrado los beneficios de la determinación de MN y NMN plasmáticas para la investigación de tumores de células cromafines, debido a su alto valor predictivo negativo<sup>16-18</sup>.

La discusión no radica tanto en la elección del método, sino al hecho de si la determinación de las formas no conjugadas o totales representa el procedimiento bioquímico óptimo para el diagnóstico de PC. En este sentido, la especificidad diagnóstica de las metanefrinas totales puede verse limitada por una disminución de la función renal, aunque el incremento de la vida media de las formas conjugadas minimizaría las amplias variaciones de las concentraciones plasmáticas que

podrían surgir de la liberación intermitente desde un tumor. Existe consenso en que la determinación de metanefrinas plasmáticas presenta mayor sensibilidad diagnóstica en comparación con las CA plasmáticas para el diagnóstico de PC. Esto se debe a la generación permanente de metanefrinas en las células tumorales, mientras que la secreción de CA es esporádica y se ve afectada por diferentes variables.

Por lo tanto, las metanefrinas plasmáticas constituyen un marcador más confiable para detectar la presencia de estos tumores<sup>17,19</sup>.

Con respecto a que si el mejor test es la medición de metanefrinas en plasma u orina de 24 horas, existen discrepancias entre diversos estudios; estableciendo en algunos mayor sensibilidad en plasma pero con una menor

especificidad en relación a la determinación en orina. En un estudio del NIH, establecieron una sensibilidad y especificidad del 97% y 85% para la medición de metanefrinas plasmáticas, frente a orina del 90% y 98%, respectivamente<sup>5</sup>.

La desventaja principal de la muestra de orina de 24 hs radica en la fase preanalítica. Por otro lado, la desventaja de la medición en muestras plasmáticas es que, dada su sensibilidad, requiere el establecimiento de un valor de referencia adecuado, ya que existe un solapamiento de algunos tipos de PC-PGL y el límite superior normal, generando falsos positivos por sobreactividad simpático-adrenal en otras patologías, e inadecuada preparación del paciente.

Estudios recientes proponen a la saliva como alternativa para la determinación de metanefrinas en pacientes con sospecha de PC, mediante HPLC asociado a espectrometría de masa en tándem. Si bien esta matriz presenta ventajas metodológicas en la fase preanalítica, es controvertida su correlación respecto a la determinación en plasma u orina.

Otro marcador bioquímico que puede utilizarse para el diagnóstico de estos tumores es la Cromogranina A (CgA), molécula que se almacena en grandes gránulos densos de las células neuroendocrinas<sup>20</sup>. Se trata de un marcador inespecífico de tumores neuroendocrinos, con una sensibilidad reportada de entre 90-95%<sup>3,20</sup>.

Estudios revelan que este marcador se encuentra elevado en aquellos pacientes con PGL relacionados a mutaciones en el gen SDHx<sup>8</sup>.

### Condiciones pre-analíticas

Con excepción de los neonatos y niños pequeños, la determinación de catecolaminas libres y de metanefrinas totales generalmente se realiza sobre muestras de orina de 24 hs. Sin embargo, los problemas de recolección completa han llevado a propuestas alternativas como la corrección por creatinina para muestras aisladas, que han ido autolimitándose por la amplia variabilidad biológica de la creatinina y reservándose únicamente para tumores que secretan catecolaminas de forma exacerbada. Algunos autores proponen la recolección de orina nocturna para determinación de noradrenalina, aprovechando su esperada normal declinación en individuos sanos durante la noche, en ausencia de estímulos ambientales y emocionales, simplificando el protocolo y evitando los efectos del estrés y el ejercicio<sup>21</sup>. Considerando, sin embargo, los episodios esporádicos de secreción de algunos tumores secretores, se requiere más de una recolección, o bien de la orina de 24 hs. Es necesario acidificar la orina para la determinación de catecolaminas y metanefrinas, reduciendo el pH a menos de 3,5 para estabilizar las muestras mediante el agregado de ácido (HCl 6N) desde el inicio de la recolección, pudiendo guardarse la orina durante 2 semanas a -20°C o por períodos más prolongados a -70°C. Por otra parte, cuando se recolectan muestras de plasma para la medición de catecolaminas, existen diversas variables a tener en cuenta: la hora del día (patrón diurno de secreción), el sitio de muestreo (mayores concentraciones en sangre arterial), estrés ambiental, postura corporal y actividad física (niveles aumentados en individuos ambulantes), tabaquismo, ingesta de cafeína, necesidad de reposo previo antes de la extracción y refrigeración de las

muestras<sup>22</sup>.

Las interferencias con algunos componentes de la dieta (por ejemplo vainilla, cafeína) y ciertas drogas como las antihipertensivas (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina,  $\beta$ -bloqueantes, antagonistas cálcicos y algunos diuréticos) o incluso medicamentos de uso habitual (amoxicilina, paracetamol), pueden influir sobre los resultados por coelusión con picos de interés, o por alteración de la recuperación durante la preparación de las muestras en los procedimientos basados en HPLC, siendo ideal discontinuarlos durante 3-7 días antes de la recolección de la orina o toma de las muestras de plasma, cuando sea posible. La determinación de las mismas con exactitud en el laboratorio dependerá del uso de estándares de pureza conocida, de ensayos de recuperación y de la participación en programas de control de calidad externo, ya que no existe un patrón de referencia internacional.

### Conclusión

Las metanefrinas resultan el mejor marcador bioquímico para el diagnóstico de PC y PGL, ya que:

- son producidas por la COMT en células de médula adrenal o tumorales derivadas de ellas; la ausencia de esta enzima en terminaciones simpáticas implica que son marcadores relativamente específicos
- son producidas en forma continua por el tumor, independientemente de la secreción de CA, y tienen mejor correlación con el tamaño del tumor.

La guía de práctica clínica publicada en 2014 por la Endocrine Society recomienda con alta calidad de evidencia que la medición de metanefrinas libres en plasma o metanefrinas fraccionadas en orina se incluyan como pruebas iniciales para el diagnóstico de PC-PGL<sup>23</sup>.

Con respecto a las técnicas de medición, es importante mencionar que hasta el momento no existen procedimientos de referencia para el análisis de las CA y sus metabolitos. Si bien HPLC ofrece una aproximación versátil y práctica para los análisis de rutina, también tiene sus limitaciones y, por lo tanto, se requiere de una interpretación crítica de los resultados para poder evaluar debidamente las potenciales fuentes de inexactitud. Asimismo, es importante que cada laboratorio determine sus propios valores de referencia para la metodología utilizada, sin poder utilizar los valores de referencia de la literatura o de otros laboratorios.

Las recomendaciones de expertos indican que se debe considerar asesoramiento genético para todos los pacientes con PPGLs, basándose en que al menos un tercio de estos pacientes presentan mutaciones en la línea germinal; que la presencia de la mutación SDHB lleva a metástasis en más del 40% de los casos y que la determinación de un síndrome hereditario en el caso índice lleva a un diagnóstico y tratamiento anticipado del PPGLs en los parientes<sup>23,24</sup>.

Con respecto al seguimiento de la enfermedad, se recomienda estimar de forma personalizada el riesgo que presenta el paciente de presentar metástasis o recidivas, teniendo en cuenta la edad del mismo, los resultados de los tests genéticos, sitio y tamaño del tumor. En los pacientes de alto riesgo (pacientes jóvenes, con mutaciones detectadas, grandes tumores y/o con paraganglioma), el seguimiento será de por vida<sup>24</sup>. Por último, en reconocimiento de las distintas

presentaciones genotipo-fenotipo de PPGLs hereditarios, se recomienda un enfoque personalizado para el manejo del paciente (pruebas bioquímicas, imágenes, cirugía y seguimiento)<sup>22</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

- Young W F. Clinical presentation and diagnosis of pheochromocytoma. En: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA, 2018. Disponible en <https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-and-diagnosis-of-pheochromocytoma>.
- Oleaga A, Goñi F. Feocromocitoma: actualización diagnóstica y terapéutica. *Endocrinol Nutr* 2008; 55(5):202-16.
- Borrajó Guadarrama E, Gutiérrez Macías A, López-Canti Morales LF. Hipertensión arterial de origen endocrino. En: Guías diagnóstico-terapéuticas en Endocrinología Pediátrica. Soc Española Endocrinol Ped. 2002; Cap 30.
- Eisenhofer G, Timmers HJ, Lenders JWM, et al. Age at Diagnosis of Pheochromocytoma Differs According to Catecholamine Phenotype and Tumor Location. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(2):375-84.
- Roderick Clifton-Bligh. Diagnosis of silent pheochromocytoma and paraganglioma. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2013; 8(1):47-57.
- Tsirlin A, Oo Y, Sharma R, et al. Pheochromocytoma: A review. *Maturitas.* 2014; 77(3):229-38.
- Boyle JG, Davidson DF, Perry CG, Connell JMC. Comparison of diagnostic accuracy of urinary free metanephrines, vanillyl mandelic acid, and catecholamines and plasma catecholamines for diagnosis of pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(12):4602-8.
- Eisenhofer G, Huynh TT, Hiroi M, Pacak K. Understanding Catecholamine Metabolism as a Guide to the Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001; 2(3):297-311.
- Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacol Rev* 2004; 56:331-349.
- Peaston R, Weinkove C. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem* 2004; 41:17-38.
- Moleman P. Effect of diet on urinary excretion of unconjugated catecholamines and some of their metabolites in healthy control subjects. *Clin Chem Acta.* 1990; 189:19-24.
- Eisenhofer G, Peitzsch M. Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Chem.* 2014; 60(12):1486-99.
- Lenders JW, Eisenhofer G, Armando I, et al. Determination of metanephrines in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin Chem.* 1993; 39(1):97-103.
- Lenders JWM, Keiser HR, Goldstein DS, et al. Plasma metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma. *Ann Intern Med.* 1995; 123:101-9.
- 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.
- Raber W, Rafflesberg R, Bischof M, et al. Diagnostic efficacy of unconjugated plasma metanephrines for the detection of phaeochromocytoma. *Arch Intern Med.* 2000; 160:2957-63.
- Eisenhofer G, Lenders JWM, Linehan WM, et al. Plasma normetanephrine and metanephrine for detecting phaeochromocytoma in Von Hippel-Lindau disease and multiple endocrine neoplasia type 2. *N Engl J Med.* 1999; 340:1872-9.
- Roden M, Rafflesberg W, Raber W, et al. Quantification of unconjugated metanephrines in human plasma without interference by acetaminophen. *Clin Chem.* 2001; 47:1061-7.
- Lenders JWM, et al. Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma. Which test is best? *JAMA.* 2002; 287(11):1427-1434.
- Giovanella I, Squin N, Ghelfo A, Ceriani I. Chromogranin A immunoradiometric assay in diagnosis of pheochromocytoma: comparison with plasma metanephrines and 123I-MIBG scan. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2006; 50(12): 344-7.
- Peaston RT, Lennard TWJ, Lai LC. Overnight excretion of urinary catecholamines and metabolites in the detection of phaeochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 1378-84.
- Goldstein DS. Sample handling and preparation for liquid chromatography and electrochemical assays for plasma catecholamines. En: Krsytulovic AM, ed. *Quantitative Analysis of Catecholamines and Related Compounds.* Chichester: Ellis Horwood. 1985:126-36.
- Lenders JWM, Duh Q-Y, Eisenhofer G, et al. Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99(6):1915-42.
- Plouin PF, Amar L, Dekkers OM, et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline for long-term follow-up of patients operated on for a phaeochromocytoma or a paraganglioma. *Eur J Endocrinol.* 2016; 174(5):1-10.