



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

SERVICIO BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCION HUMANA

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

**FRECUENCIA DE MACROPROLACTINEMIA EN PACIENTES
CON DIFERENTES ESTADOS HIPERPROLACTINÉMICOS:
ETIOLOGIA Y MANIFESTACIONES CLINICAS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUBESPECIALIDAD EN
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCION HUMANA

Presenta

Dra. Zarela Lizbeth Chinolla Arellano

Asesor Principal

Dra. Imelda Hernández Marín

Asesor

Dr. Alfredo Leños Miranda

México, D.F. Septiembre 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**HOSPITAL JUAREZ DE MÉXICO SSA
SERVICIO DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA**

Dr. Luis Delgado Reyes
Director de Investigación y Enseñanza
Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud

Dra. Imelda Hernández Marín
Profesor Titular del Curso de Biología de la Reproducción Humana
Universidad Nacional Autónoma de México
Jefe Servicio de Biología de la Reproducción Humana
Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud
Asesor de Tesis

Dr. Alfredo Leños Miranda
Investigador Titular "A"
Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva
Unidad Médica Alta Especialidad "Luis Castelazo Ayala"
Instituto Mexicano del Seguro Social
Sistema Nacional de Investigadores Nivel 1
Becario de Exclusividad por la Fundación IMSS
Asesor de Tesis

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
COR	Características operantes del receptor
E2	Estradiol
FSH	Hormona Folículo estimulante
HPRL	Hiperprolactinemia
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	KiloDaltons
LH	Hormona luteinizante
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PEG	Polietilenglicol
PRG	Pérdida gestacional recurrente
PRL	Prolactina
PRL-like	Similar a la prolactina
SOP	Síndrome de ovario poliquístico

CONTENIDO

	Página
Contenido	3
Abreviaturas	4
Resumen	5
Antecedentes	6
Planteamiento del problema	11
Hipótesis	12
Objetivos	12
Pacientes, material y métodos	13
Lugar del estudio	13
Diseño de la investigación	13
Diseño de la muestra	14
Definición de las variables	15
Análisis estadístico	17
Resultados	19
Discusión	27
Conclusiones	30
Referencias	31
Anexos	37

RESUMEN: FRECUENCIA DE MACROPROLACTINEMIA EN PACIENTES CON DIFERENTES ESTADOS HIPERPROLACTINÉMICOS: ETIOLOGIA Y MANIFESTACIONES CLINICAS

Objetivo. La macroprolactinemia es una de las causas de hiperprolactinemia y generalmente provoca un diagnóstico erróneo y tratamiento inapropiado. El objetivo del estudio fue determinar la frecuencia de macroprolactinemia en mujeres con diferentes estados hiperprolactinémicos atendidas en un Hospital de Ginecología de tercer nivel, así como determinar la etiología de la macroprolactinemia y sus manifestaciones clínicas.

Métodos y pacientes. Bajo un diseño transversal, se estudiaron 326 mujeres con hiperprolactinemia (≥ 25 ng/ml). A todas se les realizó mediciones de PRL total y libre, cromatografía de filtración en gel para determinar el porcentaje de las principales isoformas de la PRL sérica y cromatografía de afinidad con sefaroza acoplada a proteína G para determinar la presencia de autoanticuerpos anti-PRL de isotipo IgG. La información clínica y demográfica fue obtenida de sus expedientes clínicos.

Resultados. Del total de mujeres con hiperprolactinemia, 57 (17.5%, IC 95% 13.4% – 21.6%) de ellas fueron diagnosticadas con presencia de macroprolactinemia ($\geq 50\%$ de big big PRL por cromatografía de filtración en gel). La concentración sérica de PRL total en las pacientes sin macroprolactinemia no fue significativamente diferente de aquellas con macroprolactinemia (38.1 ng/ml vs. 42.0 ng/ml, $p=0.27$), en contraste, la concentración de PRL libre fue significativamente mayor en las pacientes sin macroprolactinemia que con macroprolactinemia (31.7 ng/ml vs. 9.2 ng/ml, $p<0.001$). La etiología de la macroprolactinemia fue debida en la mayoría de los casos a la presencia de autoanticuerpos anti-PRL (94.7%, IC 95% 88.9%–100%). La presencia de macroprolactinemia fue significativamente mayor en las pacientes con hiperprolactinemia idiopática que en las pacientes con causas secundarias de hiperprolactinemia (21.3% vs. 6.9%, $p=0.014$). Las manifestaciones clínicas generalmente atribuidas a la hiperprolactinemia como alteraciones menstruales y/o galactorrea fueron significativamente menos frecuentes en las pacientes con macroprolactinemia en comparación a las pacientes sin macroprolactinemia ($p\leq 0.014$), pero fueron más frecuentemente prescritas con agonistas dopaminérgicos en comparación a las pacientes sin macroprolactinemia (77.2% vs. 54.6%, $p=0.003$). Hubo una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de PRL sérica precipitada con polietilenglicol y el porcentaje de big big PRL obtenido por cromatografía de filtración en gel ($r=0.916$, $p<0.001$). A un punto de corte de ≥ 49.2 del porcentaje de PRL sérica precipitada con polietilenglicol para la detección de macroprolactinemia tuvo una sensibilidad de 100% y especificidad de 99.3%, y valores predictivos positivo y negativo de 95.8% y 99.8%, respectivamente. Las tasas de verosimilitud positiva y negativa fueron de 107.1 y de 0.009.

Conclusiones. La macroprolactinemia es una condición frecuente entre las mujeres con diferentes estados hiperprolactinémicos y asociada más comúnmente a la hiperprolactinemia idiopática. La causa en la mayoría de los casos se debe a la presencia de autoanticuerpos anti-PRL formando un complejo entre la PRL monomérica de 23 kDa y una IgG. La presencia de macroprolactinemia se asocia a menor frecuencia de manifestaciones clínicas atribuidas a la hiperprolactinemia, pero en su presencia se deben buscar otras posibles causas de dichas manifestaciones clínicas. Aparentemente se trata de una condición benigna y su identificación puede evitar estudios diagnósticos y tratamientos innecesarios. El método de precipitación de la PRL sérica con polietilenglicol tiene un excelente rendimiento diagnóstico para la detección de macroprolactinemia.

SUMMARY: MACROPROLACTINEMIA FREQUENCY IN PATIENTS WITH DIFFERENT STATES OF HYPERPROLACTINEMIA: ETIOLOGY AND CLINICAL MANIFESTATIONS.

Objective: The macroprolactinemia is one of the reasons of hyperprolactinemia and generally it provokes an erroneous diagnosis and inappropriate treatment. The aim of the study was to determine the frequency of macroprolactinemia in women with different conditions of hyperprolactinemia attended in a Hospital of Gynaecology of the third level, as well as to determine the etiology of the macroprolactinemia and the different clinical manifestations.

Methods and patients: Using a cross-sectional design. A total of 326 women with hyperprolactinemia were studied (25 ng/ml). Total and free PRL were determined in all of them, and the presence of PRL isoforms were determined by chromatography of filtration to determine the percentage of them and chromatography of affinity with G protein Sepharose to determine the presence of autoantibodies anti-PRL of isotypes IgG. The clinical and demographic information was obtained by their clinical reports.

Results: Among women with hyperprolactinemia, 57 (17.5 %, IC 95 % 13.4 % - 21.6 %) were diagnosed by presence of macroprolactinemia (≥ 50 % of big big by chromatography of filtration in gel). The serum of total PRL concentration in the patients without macroprolactinemia was not significantly different from those with macroprolactinemia (38.1 ng/ml vs. 42.0 ng/ml, $p=0.27$), in contrast, the concentration of free PRL was significantly major in the patients without macroprolactinemia that with macroprolactinemia (31.7 ng/ml vs. 9.2 ng/ml, $p < 0.001$). The etiology of the macroprolactinemia was owed in most cases to the presence of auto-antibodies anti-PRL (94.7 %, IC 95 % 88.9 %-100 %). The presence of macroprolactinemia was significantly major in the patients with idiopathic hyperprolactinemia that in the patients with secondary hyperprolactinemia (21.3 % vs. 6.9 %, $p=0.014$). The clinical manifestations generally attributed to the hyperprolactinemia like menstrual alterations and / or galactorrea were significantly less frequent in the patients with macroprolactinemia in comparison to the patients without macroprolactinemia ($p < 0.014$), but they were prescribed more frequently with dopaminergic agonists in comparison to the patients without macroprolactinemia (77.2 % vs. 54.6 %, $p=0.003$). There was a positive and significant correlation among the percentage of serum PRL precipitated with polyethylene glycol and the percentage of big big PRL obtained by chromatography of filtration in gel ($r=0.916$, $p < 0.001$). The cutoff point ≥ 49.2 of the percentage of serum PRL precipitated with polyethylene glycol for the detection of macroprolactinemia had a sensibility of 100 % and specificity of 99.3 %, and positive and negative predictive values of 95.8 % and 99.8 %, respectively. The rates of positive and negative likelihood ratios were of 107.1 and of 0.009.

Conclusions: The macroprolactinemia is a frequent condition among women with different conditions of hyperprolactinemia and associated more commonly with idiopathic hyperprolactinemia. The reason in most cases owes to the presence of autoantibodies anti-PRL forming a complex between the PRL monomérica of 23 kDa and an IgG. The presence of macroprolactinemia associates with minor frequency of clinical manifestations attributed to the hyperprolactinemia, but in her presence there must be looked other possible reasons of the above mentioned clinical manifestations. Probably it is a benign condition and her identification can avoid diagnostic studies and unnecessary treatments. The method of rainfall of the serum PRL with polietilenglicol has an excellent diagnostic performance for the detection of macroprolactinemia. The method of immunoprecipitation of the serum PRL with polyethylene glycol has an excellent diagnostic performance for the detection of macroprolactinemia.

ANTECEDENTES

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica, sintetizada y secretada principalmente por células especializadas (lactótrofos) de la hipófisis anterior.

La actividad biológica de la PRL fue reconocida por primera vez en 1929, cuando al administrar extractos de hipófisis a conejas ooforectomizadas se les provocaba secreción láctea (1). La PRL es una de las hormonas más versátiles de la hipófisis en términos de acciones biológicas. Más de 100 acciones diferentes de la PRL han sido documentadas en animales vertebrados (2), incluyendo entre otras: desarrollo mamario e inicio de la lactancia en mamíferos, osmorregulación en peces, conductas de anidación en pájaros, crecimiento y metamorfosis en anfibios. Estas acciones, son mucho más que las acciones reportadas en conjunto para el resto de las hormonas adeno-hipofisarias. Además, la PRL modula las funciones del sistema inmune (3).

La PRL es una hormona proteica de 199 aminoácidos, con un peso molecular de 23 kDa (3,4) y producida en la glándula hipofisaria (1) por una clase de células con tinción acidofílica conocidas hoy como mamotropos y mamosomatotropos (5). Inicialmente se creyó que esta hormona era de origen hipofisaria exclusivo, pero en los últimos años, se ha demostrado la presencia de PRL y moléculas PRL-like en una gran variedad de tejidos. De los tejidos no hipofisarios, la placenta es la fuente más abundante de PRL (6), la hormona es sintetizada por las células de la decidua placentaria y es idéntica a la PRL hipofisaria en propiedades químicas, biológicas e inmunológicas. La PRL se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro y la médula espinal de los mamíferos (7–8). La PRL y las moléculas PRL-like son producidas también por diferentes tipos de células del sistema inmune: timocitos humanos (9), células linfoblastoides-B IM-9-p3 (10), linfocitos T (11). Otros órganos y tejidos en los cuales la PRL-like inmunorreactiva se ha encontrado incluyen: glándula mamaria, glándula adrenal, cuerpo lúteo, próstata, testículo, glándula uretral, glándula lacrimal, glándula sudorípara, islotes pancreáticos e intestino (11–17).

El gen de la PRL se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, está compuesto por cinco exones y cuatro intrones largos, es más grande que el gen de la hormona del crecimiento (16 kb vs. 2 kb) debido a sus intrones largos. En todos los exones e intrones del gen de la PRL de

rata, además contienen más de un sitio posible de empalme (splicing) (18), con la posibilidad de dar diferentes variantes de PRL por diferentes sitios de empalme del mRNA.

La PRL se sintetiza como una pre-hormona de 227 aminoácidos en muchas especies de mamíferos (19), la hormona madura se deriva de esta molécula precursora por ruptura proteolítica del péptido señal de 28 aminoácidos (20, 21). El mRNA de la PRL cerebral es idéntico al mRNA de la PRL hipofisiaria (22). Las células linfoides y la decidua humana expresan un mRNA de la PRL aproximadamente 150 nucleótidos mayor que el mRNA de la PRL hipofisiaria, pero el precursor de la PRL sintetizada por estos tejidos parece idéntico al precursor de la PRL hipofisiaria (9,23).

La secreción normal de PRL está bajo un control inhibitorio tónico por la dopamina hipotalámica y su inhibición está sujeta a estímulos internos y externos. La síntesis y secreción de la PRL son estimulados por estrógenos, embarazo, estimulación del pezón, serotonina, hormona liberadora de la tirotropina, péptido intestinal vasoactivo, estrés, antagonistas dopaminérgicos (clorpromacina, metoclopramida, etc.), e interleucina 1 (IL-1) y 6 (IL-6) (24–26). La secreción de PRL es inhibida por corticoesteroides, progestágenos, andrógenos, dopamina, opiáceos y agonistas dopaminérgicos (bromocriptina) (27–31). Las interacciones hormonales entre la PRL, estrógenos y andrógenos son bidireccionales, en donde los estrógenos estimulan y los andrógenos inhiben la secreción de PRL, la PRL suprime la producción de estrógenos y andrógenos en humanos, ocasionando amenorrea o disfunción eréctil respectivamente.

La concentración sérica de PRL presenta variaciones circadianas. Normalmente, existe una secreción continua, alternada con una secreción pulsátil (cada 8-10 minutos) durante todo el día. Esta secreción continua y pulsátil es afectada por la ingesta de alimentos, el sueño (alcanzando los valores más altos en la etapa más profunda). Su concentración descienden después de una o dos horas después de haber despertado y paulatinamente disminuyen hacia el final de la tarde (la concentración antes de las 08:00 puede ser 20% más alta que más tarde durante el día, alcanzando su máxima concentración entre las 03:00 y las 05:00), pero sin una tendencia a repetirse en el mismo individuo en días posteriores (27, 28). La introducción de las pruebas para determinar la concentración sérica de PRL humana durante los años 70, trajo consigo la definición del síndrome hiperprolactinéxico (es decir, trastornos menstruales, infertilidad y galactorrea en la mujer; y disfunción sexual y pérdida de la libido en hombres).

Los valores normales de la concentración sérica de la PRL son menores a 25 ng/ml en las mujeres (4.2–25 ng/ml) y en los hombres es menor de 20 ng/ml (3.1–20 ng/ml) (32). Los valores superiores a estos límites se consideran como hiperprolactinemia.

La hiperprolactinemia puede tener varias causas, algunas en circunstancias fisiológicas tales como el embarazo, lactancia y la actividad sexual. Las patologías causantes de hiperprolactinemia son 1) prolactinoma, 2) adenomas pituitarios no funcionales y tumores paraselares, tales como meningioma y craneofaringioma que comprimen la silla turca o hipotálamo, 3) drogas que estimulan la secreción de PRL como los antagonistas dopaminérgicos e inhibidores de la recaptación de catecolaminas, 4) hipotiroidismo, 5) enfermedades de la pared torácica, 6) alteraciones hepáticas, 7) alteraciones renales e 8) hiperprolactinemia idiopática (cuando no se encuentra una causa explicable o probable) (33, 34).

Estudios durante los últimos años han mostrado que la PRL existe en varias formas moleculares, algunas resultan de modificaciones post-translacionales y otras por factores genéticamente determinados. Esto ha sugerido que la PRL es una pro-hormona, la cual es sintetizada como una molécula precursora y entonces convertida a diferentes formas (fragmentación, glicosilación, fosforilación, deamidación, sulfatación, formación de dímeros y polímeros, o a la unión con otras proteínas), las cuales pueden afectar sus propiedades biológicas en forma independiente a su inmunorreactividad. En el suero de sujetos normales y en la mayoría de pacientes con hiperprolactinemia, la mayor inmunorreactividad de la PRL por cromatografía de filtración en gel se encuentra en forma monomérica, con un peso molecular de 23 kDa (“little PRL”), cantidades menores se encuentran junto al volumen vacío (“big big PRL” >100 kDa) o en una posición que corresponde al peso molecular entre 45 a 50 kDa (“big PRL”) (35–39). Varios estudios han reportado que la presencia de hiperprolactinemia asintomática en algunas pacientes está relacionada a la presencia predominante de big big PRL circulante (35–48), también llamada macroprolactinemia (38,40). La frecuencia reportada de macroprolactinemia en diferentes estados hiperprolactinérmicos va de 8% al 28%, dependiendo del número de pacientes estudiados, nivel de atención médica o de la presencia o no de síntomas o signos relacionados a la hiperprolactinemia (49–54).

La causa principal de la macroprolactinemia es debida a la presencia de autoanticuerpos anti-PRL de isotipo IgG, el cual forma un complejo PRL-IgG con un peso aproximado de 180 kDa. La presencia de autoanticuerpos anti-PRL inicialmente fue detectada en el suero de pacientes con hiperprolactinemia idiopática y en quienes no se presentaban los síntomas clínicos de hiperprolactinemia (41,42). Hattori y cols (43), reportaron en pacientes con hiperprolactinemia idiopática y sin trastornos autoinmunes una frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL del 16% (12/75), así como una correlación positiva entre los títulos de autoanticuerpos anti-PRL y los niveles séricos de PRL ($r=0.74$), en contraste, la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL en otros estados hiperprolactinémicos fue mucho menor: en la inducida por drogas de 4.8% (3/63), en prolactinomas de 2.7% (1/37), por otras causas de 3% (1/33) y en normoprolactinemia ($<30 \mu\text{g/L}$) de 1.3% (3/228). Otros estudios han demostrado que los anticuerpos anti-PRL también se encuentran en el 2.4–2.9% de mujeres embarazadas sanas (55,56), en el 40% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico con hiperprolactinemia idiopática (57) y en el 44.4% de los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con hiperprolactinemia (58). Varios estudios han encontrado que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL de isotipo IgG en pacientes con macroprolactinemia va del 62.5–92%, dependiendo del número de pacientes estudiados (42,43,48,55–61).

Independientemente de la naturaleza de la big big PRL, la ausencia de síntomas ha sido atribuida a una baja actividad biológica de esta isoforma (44). Sin embargo, también se ha reportado como normal (45,46) o incluso incrementada (46) la actividad biológica de la big big PRL. La actividad biológica del complejo PRL-IgG también ha sido reportada desde normal (47,61,62), baja o incrementada (48). Estos resultados han dependido de: 1) Las muestras probadas (suero total o fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel), y 2) el método usado para detectar la PRL inmunorreactiva (radioinmunoensayo o ensayo inmunoradiométrico).

Debido a la falta de síntomas en muchos pacientes con hiperprolactinemia con macroprolactinemia y al hallazgo de que la macroprolactina exhibe una bioactividad *in vitro* normal en el bioensayo por células Nb2, se ha propuesto que la macroprolactina no tiene una actividad biológica *in vivo* porque es incapaz de llegar a su célula blanco a través del endotelio debido a su peso molecular grande y/o a un cambio en su carga neta (43,61,62). Sin embargo,

el desarrollo reciente de los nuevos bioensayos homólogos *in vitro* para la hPRL (63) ha enfatizado la especificidad de especie de la respuesta biológica observada por varios lactógenos, sugiriendo que el uso de un bioensayo heterólogo (como el bioensayo en células Nb2) puede no ser apropiado para determinar la bioactividad de la hPRL sérica.

Importancia clínica de la macroprolactinemia

El predominio de la PRL de alto peso molecular o macroprolactinemia, ha sido bien reconocido en pacientes hiperprolactinémicos con fertilidad probada (40,41,49,55,56,62). La presencia de macroprolactinemia es un fenómeno relativamente frecuente en pacientes con hiperprolactinemia, el no reconocer esta entidad puede llevar a los médicos tratantes a solicitar estudios innecesarios (tomografías y/o resonancias magnéticas de hipófisis y estudios hormonales complementarios) o incluso dar tratamientos inapropiados. Por lo anterior, se ha sugerido que el primer abordaje en los pacientes con hiperprolactinemia pero con pocos datos clínicos de hiperprolactinemia se realice un escrutinio para detectar la presencia de macroprolactinemia dado que esta entidad generalmente es una condición benigna (49,52,53,64,65).

Planteamiento del problema

Es conocido que los niveles séricos elevados de PRL por arriba de 25 ng/ml repercuten en la homeostasis hormonal, independientemente del origen de la alteración y que pueden presentar ó no manifestaciones clínicas diversas. Existen varias isoformas de la PRL identificadas en el suero y otros líquidos biológicos, la isoforma circulante que con mayor frecuencia se encuentra es un polipéptido de una sola cadena, la PRL monomérica (little PRL), con peso molecular de 23 KDa y corresponde alrededor del 85% del total de la PRL circulante en suero de sujetos normales y en la mayoría de las pacientes con hiperprolactinemia. Se ha reportado que entre un 10% a 30% de los pacientes con hiperprolactinemia idiopática tienen macroprolactinemia. Aunque generalmente la presencia de macroprolactina se asocia a la ausencia de síntomas clínicos de hiperprolactinemia, hay datos contradictorios. Esto puede ser explicado porque la presencia sola de la macroprolactina no excluye la presencia de hiperprolactinemia a expensas de la PRL monomérica (verdadera hiperprolactinemia), la cual es la isoforma de la PRL a la que se le atribuyen los verdaderos efectos biológicos *in vivo*, es decir, algunos pacientes tienen macroprolactinemia, pero también cursan con niveles elevados de PRL libre o monomérica, explicando entonces las manifestaciones clínicas de hiperprolactinemia. Por otra parte, aunque la etiología más frecuente de la macroprolactinemia es debida a la presencia de autoanticuerpos anti-PRL de isotipo IgG; es bien conocido, que el porcentaje de macroprolactinemia estimado por cromatografía de filtración no correlaciona con el porcentaje estimado obtenido por cromatografía de afinidad para IgG, lo que sugiere que durante el proceso de afinidad la PRL puede ser separada de la IgG, pero también puede deberse a que la participación de otros isotipos de inmunoglobulinas (IgM o IgA) y que no son unidas a la proteína A o G que se usan en la cromatografía de afinidad, pueden estar presentes y por lo tanto ser causas aún no estudiadas para la presencia de macroprolactinemia.

Justificación

En el presente trabajo se determinará la frecuencia de macroprolactinemia en mujeres con diferentes estados hiperprolactinémicos, así como se determinará la o etiologías más frecuente de la macroprolactinemia. Finalmente, se determinará si la presencia de macroprolactinemia

y/o la concentración libre de PRL esta asociada a las manifestaciones clínicas de hiperprolactinemia. Esto último, con la finalidad de identificar con precisión que pacientes se pudieran beneficiar con un tratamiento para disminuir las concentraciones de PRL.

En base a lo anterior, nos hicimos las siguientes preguntas

1. ¿Cuál es la frecuencia de macroprolactinemia en mujeres no embarazadas con diferentes estados hiperprolactinémicos?
2. ¿Cuáles son las etiologías más frecuentes de la macroprolactinemia?
3. ¿Cuál es la sintomatología más frecuente de la macroprolactinemia y si esta difiere de la encontrada en pacientes con hiperprolactinemia, pero sin macroprolactinemia?

HIPÓTESIS

Nuestras hipótesis de trabajo fueron las siguientes:

Las pacientes con diferentes estados hiperprolactinémicos tienen una frecuencia de macroprolactinemia del 15% y es mayor en aquellas que tienen hiperprolactinemia idiopática que en otros estados hiperprolactinémicos (tumoral, drogas, hipotiroidismo, etc.).

La etiología más frecuente de la macroprolactinemia en las mujeres con diferentes estados hiperprolactinémicos es debida a la presencia de autoanticuerpos anti-PRL de isotipo IgG.

Las pacientes con hiperprolactinemia, pero sin macroprolactinemia en comparación a las pacientes con macroprolactinemia tienen mayores manifestaciones clínicas de hiperprolactinemia.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la frecuencia de macroprolactinemia en mujeres no embarazadas con diferentes estados hiperprolactinémicos, así como su etiología y la relación con las manifestaciones clínicas clásicas de hiperprolactinemia.

Objetivos específicos

1. Determinar la frecuencia de macroprolactina en mujeres con diferentes estados hiperprolactinémicos.
2. Determinar la etiología de la macroprolactinemia.
3. Determinar la relación entre la macroprolactinemia y/o su etiología y la concentración sérica de PRL total y libre.
4. Determinar la relación entre el porcentaje de macroprolactinemia, su etiología y las concentraciones séricas con las manifestaciones clínicas clásicas de hiperprolactinemia.

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

1. Lugar donde se realizo el estudio.

El estudio se llevo a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva. UMAE. Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala” del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el Servicio de Biología de la Reproducción Humana del Hospital Juárez de México de la Secretaría de Salud.

2. Diseño de la investigación.

Tipo de Estudio.

I) Para el objetivo específico 1.

- a) Por el control de la maniobra experimental por el investigador: Observacional.
- b) Por la captación de la información: Prolectivo.
- c) Por la medición del fenómeno en el tiempo: Transversal.
- d) Por la presencia de un grupo control: Descriptivo.
- e) Por la dirección del análisis: Sin dirección.
- f) Por la ceguedad en la aplicación y evaluación de las maniobras: Ciego.

Diseño:

Estudio Transversal descriptivo.

II) Para el objetivo específico 2.

- a) Observacional.
- b) Prolectivo.
- c) Transversal.
- d) Comparativo.
- e) Sin dirección.
- f) Ciego.

Diseño:

Estudio Transversal comparativo.

3. Diseño de la muestra.

3.1 Población de estudio: Suero de mujeres no embarazadas atendidas en la unidades participantes. La captación de muestras séricas se llevo a cabo por el Servicio de Hormonas del laboratorio clínico del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4, IMSS y por la consulta externa del Hospital Juárez de México. Las muestras séricas con hiperprolactinemia ($PRL \geq 25$ ng/ml) fueron incluidas para fines de este estudio. En la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, las muestras séricas se les determino la presencia de macroprolactina por el método de precipitación con polietilenglicol y se corroboró por cromatografía de filtración en gel. La etiología se determino mediante cromatografía de afinidad con sefárosa acoplada a proteína G (véase anexos).

3.2 Muestra: Suero de mujeres no embarazadas que por cualquier razón se les haya solicitado la determinación de PRL (muestreo consecutivo no aleatorio), esto es, se tomaron todos los sueros con hiperprolactinemia, en el periodo comprendido del 1° Abril del 2008 a Mayo del 2009.

3.3 Grupo de estudio: A partir de la muestra se identificaron a dos grupos, uno con macroprolactinemia y otro sin macroprolactinemia.

3.4 Criterios de selección:

a) Criterios de inclusión para la muestra.

1. Suero de mujeres no embarazadas con hiperprolactinemia.
2. Tener expediente en la Unidad donde se le tomo la muestra sérica.

b) Criterios de eliminación.

1. No haber encontrado el expediente clínico.

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

1. Hiperprolactinemia.

- Definición operativa. Se considero que un paciente tenia hiperprolactinemia cuando tuvo un valor de PRL sérica ≥ 25 ng/ml.

- Escala de medición: Nominal.

- Categoría de la variable: 1. Sin hipeprolactinemia.
2. Con hiperprolactinemia.

2. Macroprolactinemia.

- Definición operativa. Se determino su presencia en base a la concentración relativa de big big PRL o macroprolactina estimada por cromatografía de filtración en gel. Un porcentaje mayor de 50% de big big PRL fue considerado como macroprolactinemia (Véase anexos).

- Escala de medición: Nominal.

- Categoría de la variable: 1. Con macroprolactinemia.
2. Sin macroprolactinemia.

3. Autoanticuerpos anti-PRL.

- Definición operativa. Para isotipo IgG, se determino en base al porcentaje de PRL unida a IgG utilizando proteína G acoplada a sefarosa CL-4B como inmunoprecipitante de los complejos (PRL-IgG) y estos últimos detectados con una ensayo inmunoenzimático (EIA). Un resultado positivo fue considerado cuando el porcentaje fue mayor a la media + 3 desviaciones estándares de todos las muestras con un perfil cromatográfico en gel con presencia de $\geq 95\%$ de little PRL (véase anexo 3).

- Escala de medición: Nominal.

- Categoría de la variable: 1. Autoanticuerpos anti-PRL negativos.
2. Autoanticuerpos anti-PRL positivos.

4. Infertilidad.

- Definición operativa. Pacientes con el hallazgo retrospectivo de no concepción con relaciones sexuales por más de un año sin uso de ningún método de anticoncepción y que tuvieran el factor endócrino ovárico alterado.

-Escala de medición: Nominal

- Categoría de la variable: 1. Sin infertilidad.
2. Con infertilidad.

5. Trastornos menstruales:

- Definición operativa. Se determinó como la presencia de opsomenorrea, oligomenorrea y/o amenorrea.

- Escala de medición: Nominal.

- Categoría de la variable: 1. Sin trastornos menstruales.
2. Con trastornos menstruales.

6. Alteraciones en la libido:

- Definición operativa. Fue catalogada como presente al referir dispareunia, disminución o ausencia libido al interrogatorio

- Escala de medición: Nominal.

- Categoría de la variable: 1. Sin alteraciones en la libido.
2. Con alteraciones en la libido.

7. Síndrome de ovario poliquístico:

- Definición operativa. Se determinó si presentaban 2 de 3 de los criterios de Rotterdam para el diagnóstico de SOP.

- Escala de medición: Nominal.

- Categoría de la variable: 1. Sin SOP.
2. Con SOP.

8. Pérdida recurrente gestacional:

- Definición operativa. Se tomó en el caso de presentar 2 ó más pérdidas gestacionales menores a 20 semanas espontáneos.

- Escala de medición: Nominal.

- Categoría de la variable: 1. Sin PRG.
2. Con PRG.

9. Hipotiroidismo:

- Definición operativa. Pacientes con el hallazgo de TSH ≥ 4.0 mUI/ml ó que ya tuvieran previamente el diagnóstico de hipotiroidismo.

- Escala de medición: Nominal.

- Categoría de la variable: 1. Sin hipotiroidismo.
2. Con hipotiroidismo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico fue hecho con el paquete estadístico SPSS 11.0 (SPSS Inc.) y con el MedCalc 7.2 (Medcalc Software). La significancia de la diferencia entre variables continuas fue determinada por la prueba de *t* student para muestras independientes (o la prueba de U de Mann-Whitney para variables con distribución no normal). La significancia de las diferencias entre variables categóricas fue determinada por la prueba de chi cuadrada con corrección de continuidad de Yates o con la prueba exacta de Fisher. Las relaciones lineales entre variables continuas fueron evaluadas por el coeficiente de correlación de Pearson. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos del porcentaje de macroprolactinemia con PEG fueron estimados a varios puntos de corte para la determinación de macroprolactinemia (usando la cromatografía de filtración en gel como estándar de oro). Una curva de características operantes del receptor (COR) fue construida y el área bajo la curva fue calculada. Un valor de $p < 0.05$ a dos colas fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Descripción general. La muestra del estudio incluyó a un total de 326 mujeres, con una media de edad de 33.4 ± 8.9 años (amplitud 14–63 años). La mediana de la concentración sérica de PRL total fue de 38.3 (amplitud 25.5–1,860.0 ng/ml). Los motivos más frecuentes para la solicitud de la determinación de PRL sérica fue la infertilidad en el 32.5%, presencia de galactorrea en el 30.1% y la presencia de trastornos menstruales en el 19.6% (Tabla 1). La etiología de la hiperprolactinemia sólo se pudo identificar en 87 mujeres (26.7%), las causas fueron hipotiroidismo en 61, tumores hipofisarios en 22 y por medicamentos en 4 (dos por antidepresivos tricíclicos, una por metoclopramida y una por haloperidol). En el resto de las 239 pacientes (73.3%) no se pudo identificar una causa de hiperprolactinemia, por lo que fueron consideradas como portadoras de hiperprolactinemia idiopática.

Tabla 1. Motivos de la solicitud del estudio de PRL en las mujeres con hiperprolactinemia.

Motivo	N = 326	(%)
No especificada	49	15.0
Infertilidad	106	32.5
Galactorrea	98	30.1
Amenorrea	44	13.5
Trastorno menstrual*	17	5.2
Pérdida gestacional recurrente	8	2.5
Opsomenorrea	3	0.9
Amenorrea-galactorrea	1	0.3

* Se incluyeron como trastorno menstrual todas las alteraciones del ciclo que no incluyera opsomenorrea, oligomenorrea y amenorrea.

Frecuencia de macroprolactinemia.

De acuerdo a los perfiles obtenidos por cromatografía de filtración en gel (Figura 1), se consideró que un suero tenía macroprolactinemia cuando la isoforma predominante fue la big big PRL ($\geq 50\%$) (Figura 1B y 1D). La macroprolactinemia fue detectada en 57/326 (17.5%, IC 95% 13.4% – 21.6%) mujeres con hiperprolactinemia.

De estas, la macroprolactinemia fue detectada en 6 mujeres con hiperprolactinemia secundaria (todas con hipotiroidismo) (6.9%, IC 95% 1.6% – 12.2%). En contraste, la frecuencia de macroprolactinemia fue significativamente mayor entre las mujeres consideradas con hiperprolactinemia idiopática (51/239 [21.3%, IC 95% 16.1% – 26.5%, $p = 0.014$]). Los estudios de imagen (TAC o RM de hipófisis) se realizaron en 16/57 (28.1%) pacientes con macroprolactinemia, todos ellos con resultados normales, en cambio, fueron hechos en 36/269 (13.4%) pacientes sin macroprolactinemia, de estos 11 fueron normales, 18 con microadenoma, 4 con macroadenoma, y 3 estudios de TAC fueron no concluyentes.

Etiología de la macroprolactinemia.

En base a la proporción de PRL retenida por la cromatografía de afinidad de sefarosa acoplada a proteína G (Figura 2), se consideró que un suero contenía anticuerpos anti-PRL de isotipo IgG cuando el porcentaje retenido fue mayor a la media + 3 DE ($0.68\% \pm 1.19\%$, es decir $\geq 4.19\%$) de los sueros con predominio de la isoforma monomérica de la PRL ($\geq 95\%$ de little PRL) por cromatografía de filtración en gel (Figura 1A). De acuerdo a esto, 54/57 pacientes con macroprolactinemia tuvieron un alto porcentaje de PRL retenida a la cromatografía de afinidad (media de $23.7\% \pm 8.3\%$) y los restantes tres sueros dentro de los valores encontrados en los controles (0%, 1.5% y 2.1%). Por consiguiente, la frecuencia de anticuerpos anti-PRL en los pacientes con macroprolactinemia fue de 94.7%, IC 95% 88.9% – 100%. En adición, hubo una correlación positiva y significativa entre la concentración de PRL total y el porcentaje de PRL retenido por cromatografía de afinidad ($r=0.63$, $p<0.001$) (Figura 3).

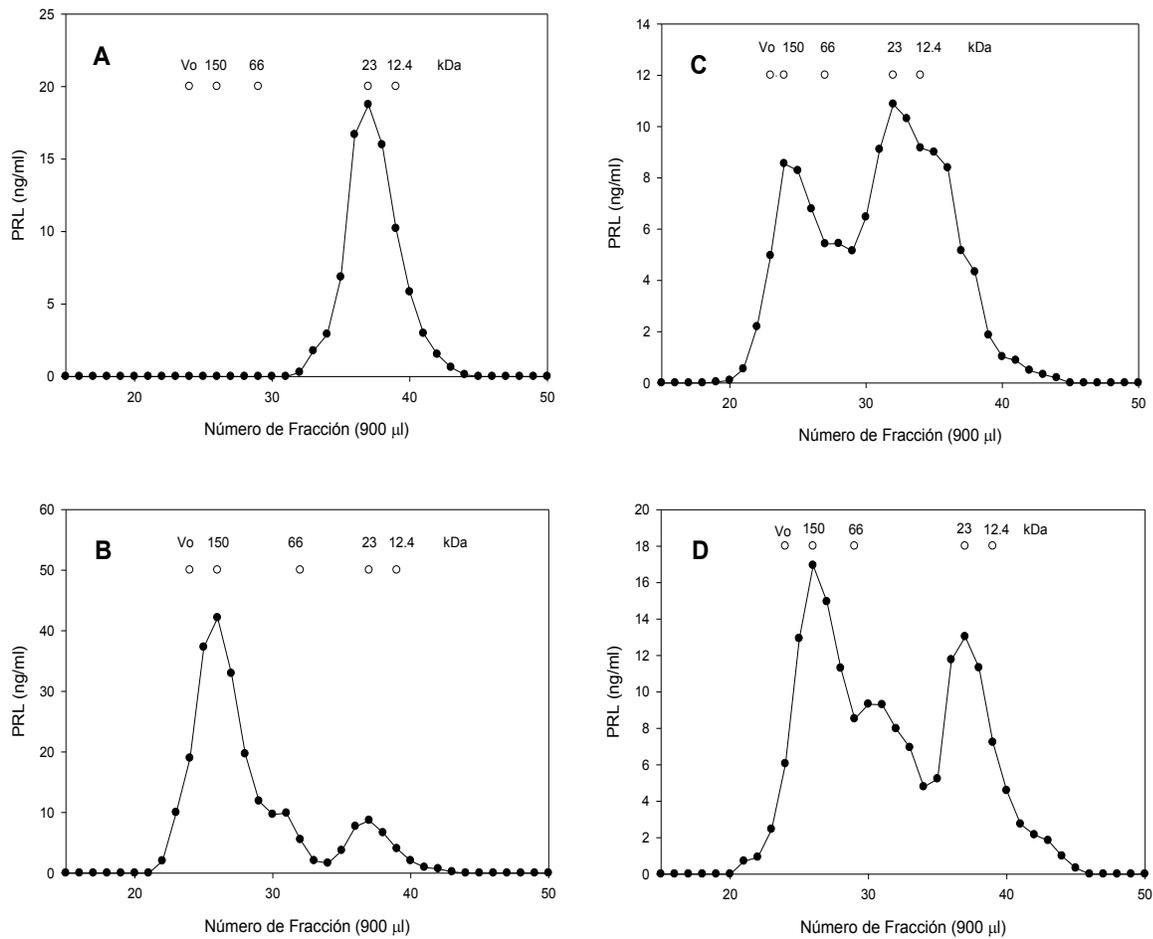


Figura 1. Perfiles representativos de la cromatografía de filtración en gel de la PRL inmunoreactiva en suero de pacientes con hiperprolactinemia en columna de 60x1 cm con Sephacryl 200 HR. Las muestras séricas fueron puestas en la columna y se colectaron fracciones de 0.9 ml. (A) Patrón exclusivo o predominante de PRL monomérica (little PRL); (B) Patrón exclusivo o predominante de macroprolactinemia (big big PRL); (C y D) Patrón mixto con cantidades significativas de PRL monomérica y macroprolactina, en C predomina la PRL monomérica y en D predomina la macroprolactina. En la parte superior se muestran los pesos moleculares relativos (kDa) estimados por su perfil de elusión.

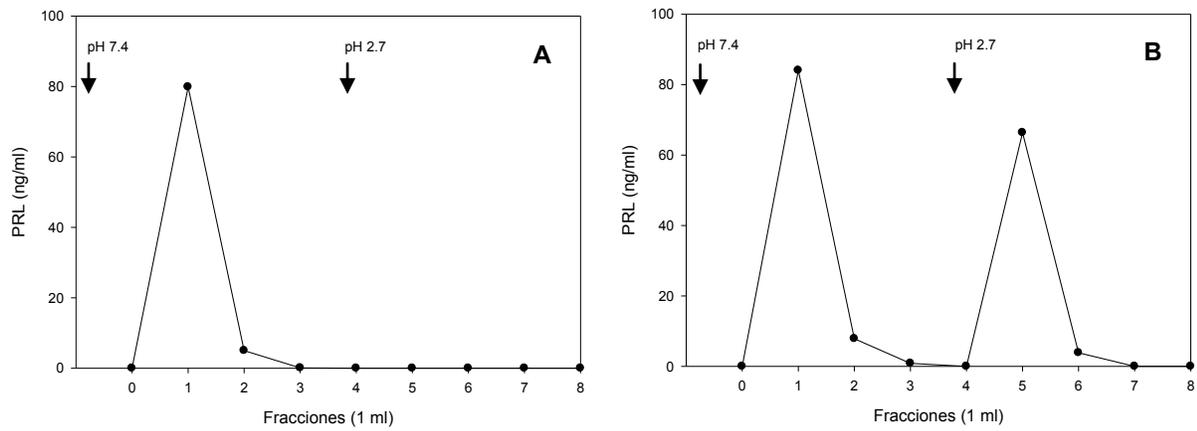


Figura 2. Perfiles representativos de la cromatografía por afinidad a proteína G acoplada a sefarosa de la PRL inmunoreactiva en (A) suero de una paciente sin autoanticuerpos anti-PRL y (B) en suero de una paciente con autoanticuerpos anti-PRL.

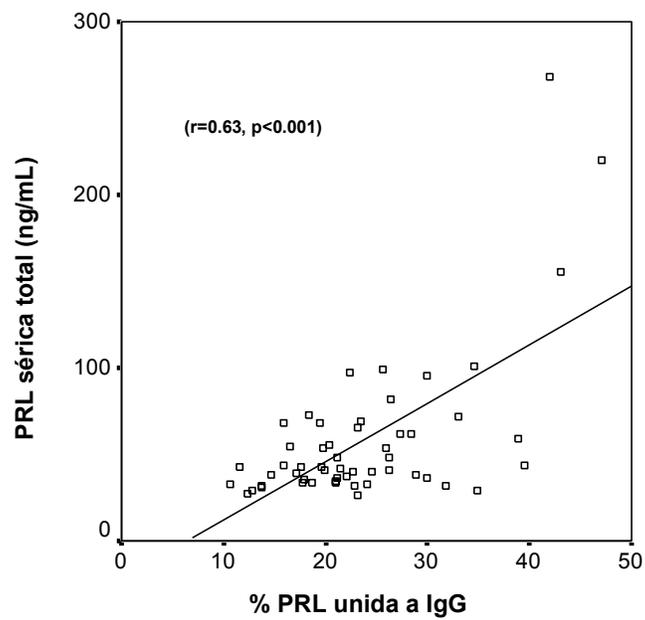


Figura 3. Relación entre la concentración de PRL sérica total y el porcentaje de PRL unida a proteína G acoplada a sefarosa.

Caracterización de los pacientes con macroprolactinemia.

Para caracterizar a las pacientes hiperprolactinémicas con y sin macroprolactinemia, se realizó una comparación entre sus variables demográficas, de laboratorio y clínicas (Tabla 2). La edad y el índice de masa corporal fueron semejantes entre los dos grupos. La mediana de la concentración sérica de PRL total fue de 38.1 ng/ml (amplitud 25.5–1,860.0 ng/ml) en las pacientes sin macroprolactinemia, semejante a la mediana de las pacientes con macroprolactinemia 42.0 ng/ml (amplitud 26.0–268.6 ng/ml), en contraste la mediana de la concentración de PRL libre o monomérica fue significativamente mayor en las pacientes sin macroprolactinemia que en las pacientes con macroprolactinemia (31.7 ng/ml vs. 9.2 ng/ml, $p < 0.001$). Como era de esperarse la proporción de macroprolactinemia fue significativamente más alta en las pacientes con macroprolactinemia que en las pacientes sin macroprolactinemia (78.6 ± 10.7 vs. 16.3 ± 13.6 , $p < 0.001$).

Tabla 2. Comparación entre las variables demográficas, de laboratorio y clínicas de las pacientes hiperprolactinémicas con y sin macroprolactinemia.

Variable	Sin MPRL n = 269	Con MPRL n = 57	Valor de p
Edad (años, media \pm DE)	33.6 \pm 8.9	32.9 \pm 9.1	0.62 *
Índice de masa corporal (media \pm DE)	27.4 \pm 4.8	27.7 \pm 4.1	0.72 *
PRL total (ng/ml, mediana, amplitud)	38.1 (25.5–1,860.0)	42.0 (26.0–268.6)	0.27 ‡
PRL libre (ng/ml, mediana, amplitud)	31.7 (25.5–1,860.0)	9.2 (2.2–22.2)	<0.001 ‡
% MPRL (media \pm DE)	16.3 \pm 13.6	78.6 \pm 10.7	<0.001 *
Big big PRL (media \pm DE)	2.9 \pm 7.0	72.0 \pm 10.0	<0.001 *
Big PRL (media \pm DE)	0.9 \pm 2.2	3.1 \pm 4.1	<0.001 *
Little PRL (media \pm DE)	96.0 \pm 8.7	24.9 \pm 10.1	<0.001 *
% de PRL retenida por proteína G (media \pm DE)	0.8 \pm 1.4	22.5 \pm 9.5	<0.001 *
Alteraciones menstruales (%)	116 (44.8)	14 (24.6)	0.014 §
Galactorrea (%)	91 (33.8)	7 (12.3)	0.002 §
Infertilidad (%)	85 (31.6)	21 (36.8)	0.54 §
Alteración en la libido (%)	13 (4.8)	1 (1.8)	0.50 ¶
Tratamiento prescrito (%)	147 (54.6)	44 (77.2)	0.003 §
Síndrome de ovario poliquístico (%)	22 (8.2)	4 (7.0)	0.93 ¶
Hiperprolactinemia secundaria (%)	81 (30.1)	6 (10.5)	0.004 §
Anticuerpos anti-PRL (%)	0 (0.0)	54 (94.7)	<0.001 §
MPRL = Macroprolactinemia.			
* <i>t</i> de student para muestras independientes.			
‡ Prueba de U de Mann-Whitney.			
§ Chi cuadrada con corrección de Yates.			
¶ Prueba exacta de Fisher			

El porcentaje de las diferentes isoformas de la PRL por cromatografía de filtración en gel varió entre los grupos, siendo significativamente mayores tanto la big big PRL como la big PRL en las pacientes con macroprolactinemia, en contraste, la isoforma little PRL fue significativamente mayor en las pacientes sin macroprolactinemia. Aunque las manifestaciones clínicas generalmente atribuidas a la hiperprolactinemia estaban presentes, tanto en las pacientes sin y con macroprolactinemia se observó que la frecuencia de las alteraciones menstruales y de galactorrea fueron significativamente más frecuentes en las pacientes sin macroprolactinemia que en las pacientes con macroprolactinemia ($p \leq 0.014$). En cambio, no hubo diferencia entre la frecuencia de infertilidad, alteraciones en la libido o presencia del síndrome de ovario poliquístico entre los grupos. Las causas secundarias de hiperprolactinemia (principalmente hipotiroidismo o tumores hipofisarios) fueron significativamente más frecuentes en las pacientes sin macroprolactinemia en comparación a las pacientes con macroprolactinemia (30.1% vs. 10.5%, $p=0.004$). Interesantemente, el tratamiento farmacológico con agonistas dopaminérgicos fue más frecuentemente prescrito en las pacientes con macroprolactinemia que en las pacientes sin macroprolactinemia (77.2% vs. 54.6%, $p=0.003$).

Utilidad del método de precipitación de la PRL sérica con polietilenglicol (PEG) en la detección de macroprolactinemia.

Hubo una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de big big PRL determinado por cromatografía de filtración en gel (estándar de oro) y el porcentaje de prolactina precipitado con PEG (esto es, el porcentaje de macroprolactina, el cual fue calculado como sigue: $(\text{PRL sérica total} - \text{PRL en el sobrenadante después de haber sido tratado el suero con PEG}) / \text{PRL sérica total} \times 100$ ($r = 0.916$, $p < 0.001$ [$r^2 = 0.84$], (Figura 4).

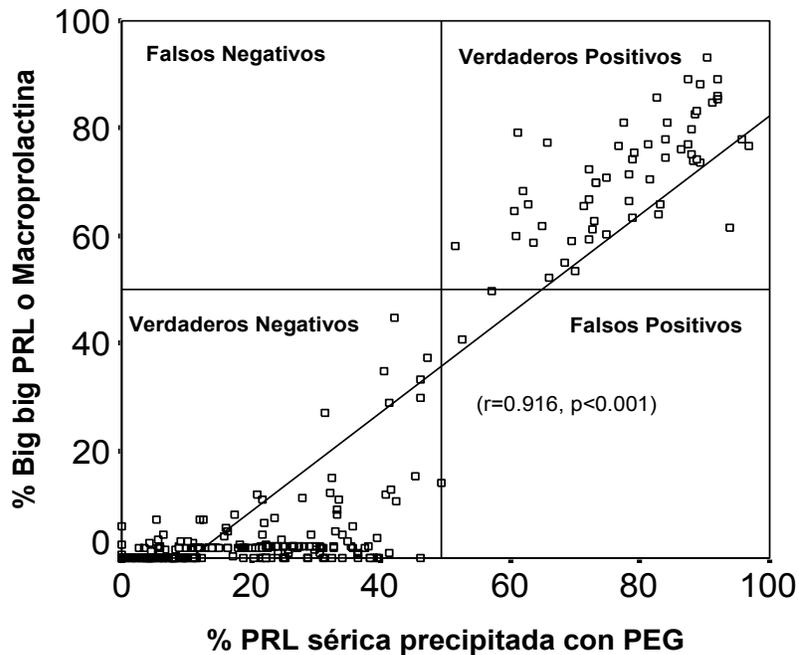


Figura 4. Correlación entre la concentración relativa de big big PRL o macroprolactina determinado por cromatografía de filtración en gel y el porcentaje de macroprolactinemia precipitado con polietilenglicol (PEG). La línea horizontal denota el límite para el predominio de macroprolactinemia ($\geq 50\%$) y la línea vertical esta puesta a 49.2% del porcentaje de macroprolactinemia precipitado por PEG, el cual representa el mejor punto de corte para la detección de macroprolactinemia.

El área bajo la curva del porcentaje de PRL precipitada con PEG para detectar un predominio de macroprolactinemia fue de 1.0 (IC 95% 0.988–1.0, Figura 3). El mejor punto de corte fue ≥ 49.2 ; este punto de corte tuvo una sensibilidad de 100% (IC 95% 93.7% – 100%), especificidad de 99.3% (IC 95% 97.3% – 99.9%), y los valores predictivos positivo y negativo de 95.8% (IC 95% 87.5% – 98.7%) y 99.8% (IC 95% 98.2% – 100%), respectivamente. Las tasas de verosimilitud positiva y negativa fueron de 107.1 (IC 95% 31.2 – 367.8) y de 0.009 (IC 95% 0.001 – 0.14). Como se muestra en la Figura 4, hubo 2 falsos positivos, sin embargo, ambas muestras mostraron tener cantidades significativas de big big PRL, pero inferiores al 50% por cromatografía de filtración en gel (44.6% y 40.8%, respectivamente).

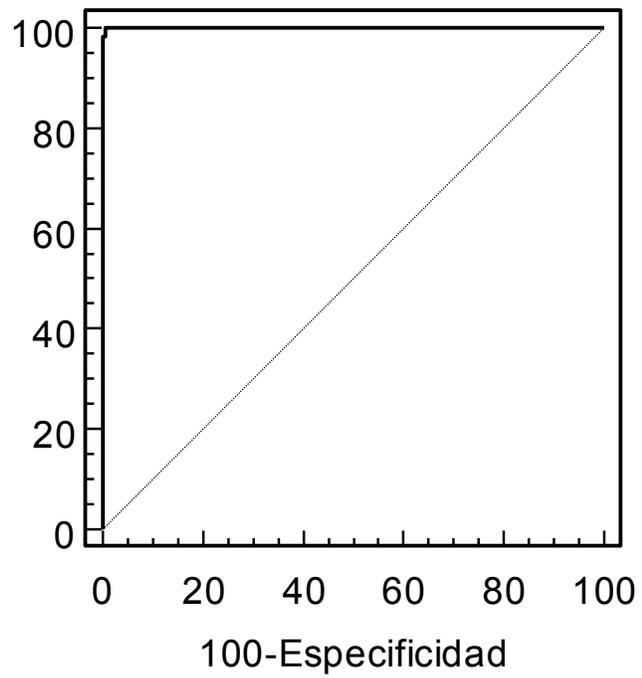


Figura 5. Curva característica operante del receptor del porcentaje de macroprolactinemia (PRL sérica precipitada con polietilenglicol al 12.5%) para la detección de macroprolactinemia en pacientes con hiperprolactinemia.

DISCUSION

La presencia de macroprolactinemia es un hallazgo común en pacientes con hiperprolactinemia. Este estudio demostró que el 17.5% de las pacientes con diferentes estados hiperprolactinémicos tienen macroprolactinemia y cuando son excluidas las causas de hiperprolactinemia secundaria, su frecuencia es discretamente mayor (21.3%, es decir, aproximadamente 2 de cada 10 mujeres). Estos resultados son consistentes con otros estudios reportados en donde la frecuencia de macroprolactinemia oscila del 9.6% – 45.0% (43,49,50,52,57,66–74). La etiología de la macroprolactinemia en nuestra serie fue debida en casi todos los casos a la presencia de autoanticuerpos anti-PRL (94.7%). Otros reportes también han mostrado que la presencia de los anticuerpos anti-PRL es la principal causa de macroprolactinemia, con una frecuencia que va del 66% – 100%, similar a la de nosotros tomando en cuenta el número de pacientes incluidos en cada serie (42,55–57,59). La presencia de autoanticuerpos anti-PRL (y por lo tanto de macroprolactinemia) se considera que es una de las causas de hiperprolactinemia debido a que la hiperprolactinemia es más común en pacientes con macroprolactinemia que en pacientes sin macroprolactinemia y porque existe una correlación positiva entre el porcentaje de PRL unida a IgG y la concentración sérica total de PRL (como también fue demostrada en nuestra serie de pacientes) (43,56–58). Además, también se ha demostrado que el complejo PRL-IgG es aclarado de la circulación más lentamente que la PRL monomérica, lo que permite que sea eliminada más lentamente por los riñones y debido a su alto peso molecular impide la retroalimentación negativa a nivel hipofisario para frenar la secreción de PRL hipofisaria manteniendo niveles elevados de ella en la circulación (47,61). Todos estos hallazgos, soportan la hipótesis de que la macroprolactinemia es la causa de la hiperprolactinemia en estos pacientes.

Una fortaleza indudable de nuestro estudio fue el hecho de que a todas las muestras se les realizó cromatografía de filtración en gel, como el estándar de oro incuestionable para detectar la concentración relativa de las diferentes isoformas de la PRL. Previos estudios de prevalencia de macroprolactinemia se han basado usando el método de precipitación de la PRL sérica con polietilenglicol (porcentaje de macroprolactinemia precipitado) como indicador de macroprolactinemia. Varios puntos de corte del porcentaje de macroprolactinemia por PEG se han empleado para determinar la presencia predominante de

macroprolactinemia, generalmente es aceptado un valor mayor del 60%, pero con la posibilidad de realizar un diagnóstico erróneo de macroprolactinemia en cerca del 10% de las pacientes (75). Por esto la importancia de validar localmente la utilidad del método de precipitación de la PRL con polietilenglicol. Con respecto a esto, nosotros encontramos una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de macroprolactinemia por polietilenglicol y el porcentaje de big big PRL por el estándar de oro (cromatografía de filtración en gel). Este método, con un punto de corte de $\geq 49.2\%$ mostró tener un alto rendimiento diagnóstico, con sensibilidad del 100% y especificidad del 99.3%. Este método es muy barato y dada su accesibilidad lo hace útil para la práctica clínica.

Las alteraciones menstruales y la infertilidad son las principales razones por las que una mujer puede acudir al ginecólogo. La prevalencia de infertilidad femenina es de 5.4% en Europa y de 6.0% en EUA (76). La concentración sérica de PRL usualmente es determinada como parte de la evaluación de disfunción gonadal, dado que su elevación interfiere con la secreción pulsátil de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), resultando en irregularidades menstruales y disfunción gonadal (78)

Aunque la significancia clínica de la macroprolactinemia no es del todo clara, la mayoría de las pacientes con macroprolactinemia tienen ciclos menstruales normales, no muestran disfunción gonadal y pueden embarazarse sin ningún tipo de tratamiento médico (38,41,43,45,47–49,56,62,70,73) debido a que la bioactividad de la macroprolactina es baja (47,61,63,79). En nuestras pacientes con macroprolactinemia, los síntomas de hiperprolactinemia fueron infrecuentes. La mayoría de las pacientes tenían una historia menstrual normal y sólo el 12.3% presentaron galactorrea, en contraste estas manifestaciones clínicas fueron significativamente más frecuentes en las pacientes con hiperprolactinemia pero sin macroprolactinemia. Interesantemente, cuatro pacientes con macroprolactinemia tuvieron concentraciones séricas de PRL mayores a 100 ng/ml, en 3 de ellas se les realizó TAC y/o RM, las cuales resultaron ser normales, una presentaba alteraciones menstruales e infertilidad, pero también tenía el diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico, y 3 de estas pacientes recibieron tratamiento con agonistas dopaminérgicos a pesar de no referir sintomatología de hiperprolactinemia. En relación a estas observaciones, algunas mujeres con hiperprolactinemia debida a la presencia de macroprolactinemia tienen alteraciones menstruales y disfunción gonadal debido a causas no relacionadas a la PRL, en estos casos, los síntomas pueden ser

atribuidos a la hiperprolactinemia sí los clínicos no consideran la posibilidad de la macroprolactinemia, resultando en tratamientos inapropiados con agonistas del receptor D2 (79) o cirugía sin beneficio a largo plazo (80); en otras palabras, considerando que las alteraciones menstruales y la infertilidad son signos clínicos comunes y dado que la macroprolactinemia es igual de común, entonces es muy probable la coincidencia de tener tanto irregularidades menstruales/infertilidad y macroprolactinemia y potencialmente provocar un diagnóstico equivocado (73). Dos estudios que han enfatizado lo anterior han demostrado como las pacientes que posteriormente se les hizo el diagnóstico de macroprolactinemia fueron manejadas durante años antes del diagnóstico de macroprolactinemia (64,69); en el 80% de las pacientes se les realizó una TAC o RM y entre el 80–90% de las pacientes recibieron tratamiento con agonistas dopaminérgicos, esto último es acorde con los hallazgos que encontramos en nuestra serie de pacientes. Además en estos mismos estudios se encontró que el diagnóstico final fue retardado en todos los casos, siendo los diagnósticos más frecuentes el síndrome de ovarios poliquísticos y la amenorrea asociada a pérdida de peso. Por otro lado, se ha reportado que la frecuencia de anomalías en la TAC o RM en pacientes con macroprolactinemia es del 10–20% (73), sin embargo, esta frecuencia de alteraciones es la misma que se encuentra en la población general (81,82), por lo que se puede anticipar que 1 en 5 a 10 pacientes con macroprolactinemia puedan tener imágenes en la hipófisis sugestivas de un adenoma hipofisiario, incluso hay reportes en que estas pacientes han sido sometidas a cirugía (80). De acuerdo a todo lo anterior, en las pacientes con macroprolactinemia incluidas en este estudio que presentaban alteraciones menstruales/infertilidad sea una coincidencia más que el efecto de la hiperprolactinemia, debido a que en todas las pacientes presentaban concentraciones de PRL libre menores a 22.5 ng/ml, por lo que difícilmente se puede explicar que la sintomatología presente esté relacionada a la PRL.

CONCLUSIONES

La macroprolactinemia es una condición muy frecuente en las mujeres con hiperprolactinemia, principalmente en aquellas con hiperprolactinemia idiopática. La etiología de la macroprolactinemia en la mayoría de las pacientes es debida a anticuerpos anti-PRL. Las manifestaciones clínicas atribuidas a la hiperprolactinemia son infrecuentes en las pacientes con macroprolactinemia. Dada la frecuencia de macroprolactinemia, esta condición debe ser descartada en todos los pacientes con hiperprolactinemia para entonces dar un diagnóstico y tratamiento más racional en estas pacientes y/o para la búsqueda de diagnósticos alternos que también expliquen la sintomatología de las pacientes. El método de precipitación de la PRL con polietilenglicol tiene un excelente rendimiento diagnóstico para detectar la presencia de macroprolactinemia, es fácil de realizarse, barato y muy útil en la evaluación de las pacientes con hiperprolactinemia.

REFERENCIAS

1. Stricker P, Grueter F. Actions du lobe anterieur de l'hypophyse sur la montée laiteuse. CR Soc Biol (Par) 1929; 99: 1978 - 1980.
2. De Vlaming VL. Actions of prolactin among the vertebrates. In: Hormones and Evolution. New York: Barrington EJW, 1979: 561 – 642.
3. Matera L. Action of pituitary and lymphocyte prolactin Neuroimmunomodulation 1997; 4: 171 –180.
3. Lamberts SWJ, MacLeod RM. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. Physiol Rev 1990; 70: 279 - 318.
4. Nicoll CS, Maye GL, Russell SM. Structural features of prolactin and growth hormones that can be related to their biological properties. Endocr Rev 1986; 7: 169 - 203.
5. Frawley LH, Boockfor FR. Mammosomatotropes: Presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. 1991 Endocr Rev; 12: 337 – 355.
6. Handwerger S, Richards RG, Markoff E. The physiology of decidual prolactin and other decidual protein hormones. Trends Endocrinol Metab. 1990; 3: 91 – 95.
7. Fuxe K, Hokfelt T, Eneroth P, Gustafsson JA, Skett P. Prolactin-like immunoreactivity: localization in nerve terminals of rat hypothalamus. Science 1977; 196: 899 – 900.
8. Schachter BS, Durgerian S, Harlan RE, Pfaff DW, Shivers BD. Prolactin mRNA exists in rat hypothalamus. Endocrinology 1984; 114: 1947 – 1949.
9. Montgomery DW, Shen GK, Ulrich ED, Steiner LL, Parrish PR, Zukoski CF. Human thymocytes express a prolactin-like messenger ribonucleic acid and synthesize bioactive prolactin-like proteins. Endocrinology 1992; 131: 3019 – 3026.
10. DiMattia GE, Gellersen B, Bohnet HG, Friesen HG. A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. Endocrinology 1988; 122: 2508-2517.
11. Pellegrini I, Lebrun J-J, Ali S, Kelly PA. Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cell. Mol Endocrinol 1992; 6: 1023 – 1031.
12. Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. Am J Obstet Gynecol 1979; 135: 751-754.
13. Rosen SW, Weintraub BD, Aaronson SA. Non-random ectopic protein production by malignant cells: direct evidence in vitro. J Clin Endocrinol Metab 1980; 50: 834-841.
14. Montgomery DW, Zukoski CF, Shah GN, Buckley AR, Pacholczyk T, Russell DH. Concanavalin A-stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity. Biochem Biophys Res Commun 1987; 145: 692-698.
15. De Vito WJ. Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hypohysectomy and intraventricular administration of colchicine. Neuroendocrinology 1989; 47: 87-99.
16. Golander A, Hurley T, Barret J. Prolactin synthesis by human chorion decidual tissue: a possible source of amniotic fluid prolactin. Science 1978; 202: 311-313.

17. Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995; 16: 354 – 369.
18. Maurer RA, Erwin CR, Donelson JE. Analysis of 5' flanking sequences and intron-exon boundaries of the rat prolactin gene. *J Biol Chem*; 256: 10524 – 10528.
19. Miller WL, Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev* 1983; 4: 97 – 130.
20. Maurer RA, Gorski J, McKean DJ. Partial amino acid sequence of rat pre-prolactin. *Biochem J* 1977; 161: 189 – 192.
21. Lingappa VR, Devillers-Thiery A, Blobel G. Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 2432 – 2436.
22. Emanuele NV, Jurgens JK, Halloran MM, Tentler JJ, Lawrence AM, Kelley MR. The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 35 – 42.
23. Gellersen B, DiMattia GE, Friesen HG, Bohnet HG. Prolactin (PRL) mRNA from human deciduas differs from pituitary PRL mRNA but resembles the IM-9-P3 lymphoblast PRL transcript. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 64: 127 – 130.
24. Bernton EW, Beach JE, Holaday JW. Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 1987; 238: 519-521.
25. Schettini G, Lorio T, Meucci O. Interleukin-1- β modulation of prolactin secretion from rat anterior pituitary cells: involvement of adenylate cyclase activity and calcium mobilization. *Endocrinology* 1990; 126: 1435-1441.
26. Yamaguchi M, Matsuzaki N, Hirota K. Interleukin 6 possibly induced by interleukin 1 β in the pituitary gland stimulates the release of gonadotropins and prolactin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990; 122: 201-205.
27. Reichlin S. Neuroendocrinology. In: JD Wilson, DW Foster, eds. *Williams' Textbook of Endocrinology*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1992: 173 – 5, 203.
28. Thorner OM, Vqnnce LM, Horvqth EM, Kovqes K. The anterior pituitary. In: JD Wilson, DW Foster, eds. *Williams' Textbook of Endocrinology*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1992: 226 - 228.
29. Ogawa N, Miyoshi M, Takahara J, Ofuji T. Inhibitory effects of glucocorticoids on prolactin release induced by thyrotropin-releasing hormone in man. *Acta Med Okayama* 1975; 4: 351 – 354.
30. Chen CL, Meites J. Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1970; 86: 503 – 508.
31. Nogami H. Fine structural heterogeneity and morphologic changes in rat pituitary prolactin cells after estrogen and testosterone treatment. *Cell Tissue Res* 1984; 237: 195 – 199.
32. Batrinos ML, Panitsa-Fafliia C, Tsiganou E, Liapi C. Incidence and characteristics of microprolactinomas (3-5 mm) in 4199 women assayed for prolactin. *Horm Metab Res* 1992; 24: 384 – 391.

33. Frantz AG. Prolactin. *N England J Med* 1978; 298: 201 – 206.
34. Katz E, Adashi Y. Hyperprolactinemic disorders. *Clin Obstet Gynecol* 1990; 33: 622 – 639.
35. Garnier PE, Aubert ML, Kaplan SL, Grumbach MM. Heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in man: decreased affinity of “big” prolactin in a radioreceptor assay and evidence for its secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47: 1273 -1281.
36. Farkouh NH, Packer MG, Frantz AG. Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum: high proportion in basal state and reduction after thyrotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48: 1026 -1032.
37. Soong YK, Ferguson KM, McGarrick G, Jeffcoate SL. Size heterogeneity of immunoreactive prolactin in hyperprolactinemic serum. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1982; 16: 259 - 265.
38. Larrea F, Escorza A, Granados J, et al. Familial occurrence of big-big prolactin as the predominant immunoreactive human prolactin species in blood. *Fertil Steril* 1987; 47: 956 - 963.
39. Tanaka T, Yano H, Umezawa S, et al. Heterogeneity of big-big hPRL in hyperprolactinemia. *Horm Metab Res* 1989; 21: 84 - 88.
40. Fraser IS, Lun ZG, Zhou JP, et al. Detailed assessment of big-big prolactin in women with hyperprolactinemia an normal ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 585 - 592.
41. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi K. A normal ovulatory woman with hyperprolactinemia: presence of anti-prolactin autoantibody and the regulation of prolactin secretion. *Acta Endocrinol* 1992; 126: 497 - 500.
42. Hattori N, Ishihara T, Ikekubo K, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Autoantibody to human prolactin in patients with idiopathic hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1226 - 1229.
43. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Correlation of the antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin autoantibody. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 438 - 445.
44. Farkouh NH, Packer MG, Frantz AG. Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum: high proportion in basal state and reduction after thyrotropin-releasing hormone *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48: 1026 -1032.
45. Andersen AN, Pedersen H, Djursing H, Andersen BN, Friesen HG. Bioactivity of prolactin in a woman with an excess of large molecular size prolactin, persistent hyperprolactinemia and spontaneous conception. *Fertil Steril* 1982; 38: 625 - 628.
45. Whittaker MD, Klee GG, Kao PC, Randall RV, Heser DW. Demonstration of biological activity of prolactin molecular weight variants in human sera. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58: 826 - 830.
46. Rowe RC, Cowden EA, Faiman C, Friesen HG. Correlation of Nb2 bioassay and radioimmunoassay values for human serum prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 94 2 - 5.
47. Hattori N, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: Bioassay and clearance studies of PRL-Immunoglobulin G complex. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3107 - 10.

48. Leite V, Cosby H, Sobrinho LG, Fresnoza A, Santos MA, Friesen HG. Characterization of big, big prolactin in patients with hyperprolactinemia. *Clin Endocrinol* 1992; 37: 365 - 72.
49. Vallette-Kasic S, Morange-Ramos I, Selim A, Gunz G, Morange S, Enjalberet A, Martin PM, Jaquet P, Brue T. Macroprolactinemia revisited: a study on 106 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:581–588.
50. Smith TP, Suliman AM, Fahie-Wilson MN, McKenna TJ. Gross variability in the detection of prolactin in sera containing big big prolactin (macroprolactin) by commercial immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5410–5415.
51. García Menéndez L, Díez Hernández A, Ciriza de los Ríos C, Delgado Gómez M, Orejas García A, Fernández Eraales AL, González Mateo A, Fernández Fernández M. Macroprolactin as etiology of hyperprolactinemia. Method for detection and clinical characterization of the entity in 39 patients. *Rev Clin Esp* 2003;203:459–464.
52. Toldy E, Lócsei Z, Szabolcs I, Kneffel P, Góth M, Szöke D, Kovács LG. Macroprolactinemia in the differential diagnosis of hyperprolactinemia. *Orv Hetil* 2003;144:2121–2127.
53. Alfonso A, Rieniets KI, Vigersky RA. Incidence and clinical significance of elevated macroprolactin levels in patients with hyperprolactinemia. *Endocr Pract* 2006;12:275–280.
- Vilar L, Moura E, Canadas V, Gusmão A, Campos R, Leal E, Teixeira L, Santos V, Gomes B, Lima M, Paiva R, Albuquerque JL, Egito CS, Botelho CA, Azevedo M, Casulari LA, Naves LA. Prevalence of macroprolactinemia among 115 patients with hyperporlactinemia. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:86–91.
54. Vilar L, Freitas MC, Navales LA, Casulari LA, Azevedo M, Montenegro R Jr, et. Al. Diagnosis and management of hyperprolactinemia: results of a Brazilian multicenter study with 1234 patients. *J Endocrinol Invest* 2008;31:436–444.
55. Hattori N. The frequency of macroprolactinemia in pregnant women and the heterogeneity of its etiologies. *J Clin Endocrinol Metab* 1966;81:586–590.
56. Pascoe-Lira D, Duran-Reyes G, Contreras-Hernández I, Manuel-Apolinar L, Blanco-Favela F, Leañós-Miranda A. Frequency of macroprolactinemia due to autoantibodies against prolactin in pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:924–929.
57. Leañós-Miranda A, Pascoe-Lira D, Chávez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Antiprolactin autoantibodies in systemic lupus erythematosus: frequency and correlation with prolactinemia and disease activity. *J Rheumatol* 2001;28:1546–1553.
58. Leañós-Miranda A, Contreras-Hernández I. Anti-prolactin autoantibodies are associated with hyperprolactinemic status in men infected with human immunodeficiency virus. *Endocrine* 2002;19:139–146.
59. Amadori P, Dilberis C, Marcolla A, Pinamonti M, Menapace P, Valentín A. identification of IgG-immunocomplex macroprolactin with an immunometric “sandwich” system: technical and clinical considerations. *J Endocrinol Invest* 2004;27:1022–1028.
60. De Schepper J, Schiettecatte J, Velkeniers B, Blumenfeld Z, Shteinberg M, Devroey P, Anckaert E, Smit J, Verdood P, Hooghe R, Hooghe-Peters E. Clincial and biological characterization of macroprolactinemia with and without prolactin-IgG complexes. *Eur J Endocrinol* 2003;149:201–207.

61. Leños-Miranda A, Chávez Rueda KA, Blanco-Favela F. Biologic activity and plasma clearance of prolactin-IgG complex in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001;44:866–875.
62. Leños-Miranda A, Pascoe-Lira D, Chávez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Persistence of macroprolactinemia due to anti-prolactin autoantibody before, during and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2619–2624.
63. Leños-Miranda A, Cárdenas-Mondragón G, Rivera-Leños R, Ulloa-Aguirre A, Goffin V. Application of new homologous in vitro bioassays for human lactogens to assess the actual bioactivity of human prolactin isoforms in hyperprolactinemic patients. *Clin Endocrinol* 2006; 65:146–153.
64. Suliman AM, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ. Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of macroprolactin screening: application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia, *Clin Chem* 2003;49:1504–1509.
65. Khandwala HM. Macroprolactinemia in a patient with infertility and hyperprolactinemia. *South Med J* 2006;99:1282–1284.
66. Bjoro T, Morkrid L, Wergeland R, Turtur A, Kvistborg A, Sand T, Torjesen P. Frequency of hyperprolactinaemia due to large molecular weight prolactin (150-170 kD PRL). *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55: 139–147.
67. Fahie-Wilson MN, Soule SG. Macroprolactinaemia: contribution to hyperprolactinaemia in a district general hospital and evaluation of a screening test based on precipitation with polyethylene glycol. *Ann Clin Biochem* 1997;34:252–258.
68. Vieira JG, Tachibana TT, Obara LH, Maciel RM. Extensive experience and validation of polyethylene glycol precipitation as a screening method for macroprolactinemia. *Clin Chem* 1998;44:1758–1759.
69. Olukoga AO, Kane JW. Macroprolactinaemia: validation and application of the polyethylene glycol precipitation test and clinical characterization of the condition. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;51:119–126.
70. Leslie H, Courtney CH, Bell PM, et al. Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia identified by a simple polyethylene glycol precipitation method. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2743–2746.
71. Hauache OM, Rocha AJ, Maia AC, Maciel RM, Vieira JG, et al. Screening for macroprolactinaemia and pituitary imaging studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57:327–331.
72. Strachan MW, Teoh WL, Don-Wauchope AC, Seth J, Stoddart M, Bckett GJ. Clinical and radiological features of patients with macroprolactinaemia. *Clin Endocrinol* 2003;59:339–346.
73. Gibney J, Smith TP, McKenna TJ. The impact on clinical practice of routine screening for macroprolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90: 3927–3932.
74. Ellis MJ, Livesey JH, Soule SG. Macroprolactin, big-prolactin and potential effects on the misdiagnosis of hyperprolactinemia using the Beckman Coulter Access Prolactin assay. *Clin Biochem* 2006;39:1028–1034.
75. McKenna TJ. Should macroprolactin be measured in all hyperprolactinaemic sera? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Mar 6. [Epub ahead of print].

76. The ESHRE Capri Workshop. European Society for Human Reproduction and Embryology. Infertility revisited: The state of the art today and tomorrow. *Human Reprod* 1996;11:1779–1807.
77. Cook CB, Nippoldt TB, Kletter GB, Kelch RP, Marshall JC. Naloxone increases the frequency of pulsatile luteinizing hormone secretion in women with hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:1099–1105.
78. Glezer A, Soares CR, Vieira JG, Giannella-Neto D, Ribela MT, Goffin V, Bronstein MD. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1048–1055.
79. Sluijmer AV, Lappöhn RE. Clinical history and outcome of 59 patients with idiopathic hyperprolactinemia. *Fertil Steril* 1992;58:72–77.
80. Cattaneo FA, Fahie-Wilson MN. Concomitant occurrence of macroprolactin, exercise-induced amenorrhea, and a pituitary lesion: a diagnostic pitfall. Case report. *J Neurosurg* 2001;95:334–337.
81. Molitch ME, Russell EJ. The pituitary "incidentaloma". *Ann Intern Med* 1990;112:925–931.
82. Aron DC, Howlett TA. Pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2000;29:205–221.

ANEXOS

Determinación de PRL

La concentración de PRL sérica total, libre y de las cromatografías de filtración en gel y de afinidad fueron determinadas por un ensayo inmunoenzimático (EIA) ultrasensible para PRL humana desarrollada por el Dr. Alfredo Leños Miranda y que ha sido descrito previamente (58). Brevemente, placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc, Roskilde, Denmark) fueron sensibilizadas con 100 μ l de anticuerpos monoclonales específicos par hPRL (American Qualex, San Clemente, CA) a una concentración de 3 μ g/ml en amortiguador de carbonatos-bicarbonatos 0.1 M, pH 9.0. Las placas fueron incubadas por 2 horas a 37 °C y almacenadas a 4 °C hasta su uso. Los pozos fueron bloqueados con 300 μ l de leche descremada al 5% en amortiguador de salino de fosfatos (PBS), pH 7.4 conteniendo Tween-20 al 0.05% por una hora a 37 °C. Después de lavar 4 veces la placa con PBS-Tween-20, las muestras fueron añadidas por duplicado a diferentes diluciones para obtener paralelismo con la curva estándar, e incubadas una hora a 37 °C, después fueron lavadas 4 veces con PBS-Tween-20 y subsecuentemente incubadas con antisuero anti-hPRL de conejo (producido por el Dr. Alfredo Leños Miranda) a una concentración final 1:2,000. Seguido de la incubación por una hora a 37 °C, las placas fueron lavadas y subsecuentemente incubadas con antisuero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Dako, Carpintería, CA) a una dilución 1:2,000 por una hora a 37 °C. Posteriormente las placas fueron lavadas 5 veces con PBS-Tween-20 antes de que la reacción fuera revelada con o-fenilendiamina (Sigma, St Louis, MO). La densidad óptica fue leída a 490 nm usando un lector de ELISA (Molecular Device). La mínima cantidad detectable por este método es de 0.018 ng/ml y los coeficientes de variación inter- e intra-observador son menores a 6.8%. La presencia de autoanticuerpos anti-PRL no interfiere con el ensayo y es capaz de detectar cualquier isoforma de la PRL humana.

Extracción sérica de PRL libre

Se realizaron los siguientes pasos:

1. 200 μ l de suero se dejaron a 37 °C por 30 min.
2. Se agrego al suero 200 μ l de polietilenglicol 6,000 (PEG) al 25% y se agitó vigorosamente, la mezcla se centrifugó a 3,000 rpm por 30 minutos a 4 °C.
3. En el sobrenadante se determinó la PRL libre por EIA.
4. Los estándares de PRL comercial se trataron de la misma manera para excluir el efecto del procedimiento de extracción en las mediciones.

El PEG a la concentración final de 12.5 % precipita fracciones de gammaglobulinas.

Inmunoprecipitación de complejos PRL-IgG

En tubos Eppendorf de 1.5 ml se depositaron 200 µl de proteína G acoplada a sefarosa (previamente hidratada). Una vez preparados los tubos se agrega 900 µl de amortiguador fosfato salino (PBS, pH 7.4) conteniendo 0.2 % de azida de sodio, luego se continuó con la siguiente secuencia:

1. Agregar 100 µl del suero problema e incubar a temperatura ambiente en agitación continua por 10 minutos (durante este proceso la IgG presente en el suero es unida a la proteína G acoplada a sefarosa), se centrifuga a 3,000 r.p.m. a 4 °C durante un minuto y se aspira el sobrenadante.
2. El sedimento (IgG-proteína G acoplada a sefarosa) se lava con 1 ml de PBS y se centrifuga del mismo modo que en el paso 1 y este lavado se repite cinco veces más (durante este proceso son eliminados del tubo las proteínas que no fueron retenidas por la proteína A, quedando solamente la IgG).
3. Después del quinto lavado y una vez aspirado el PBS, se resuspende el sedimento con 900 µl de 0.1 M glicina-HCl (pH 2.7) y se deja incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos en agitación continua (durante este proceso la IgG se separa de la proteína G acoplada a sefarosa al igual que la PRL en caso de encontrarse en complejo con la IgG), se centrifuga del mismo modo que en el paso 1. Luego el sobrenadante se neutraliza con 100 µl de 1 M TRIS-HCl (pH 9.0). En el sobrenadante se determina el porcentaje de unión de PRL a la IgG por EIA.

Cromatografía de filtración en gel

Se utilizó una columna de vidrio de 60 x 1 cm, la cual se empacó con dextrana (Sephacryl 200 HR, Pharmacia Fine Chemicals) usando la solución eluyente PBS (pH 7.4) conteniendo azida de sodio al 0.2 % y albúmina bovina al 0.1 %. El empacado de la columna se realizó a 4 °C, se dejó pasar el amortiguador (PBS) a través del lecho del gel (2-3 veces el volumen de la columna) y se dejó estabilizar sin flujo durante 48 horas. La calibración de la columna y la filtración de los sueros se hizo a 4 °C.

Calibración de la columna

Se utilizaron pesos moleculares conocidos (SIGMA, Chemical CO) a concentraciones de 0.2 % en PBS. Se aplicó 1.5 ml de cada solución a la columna cromatográfica, se recolectaron 60 fracciones de 0.9 ml, midiendo después su absorbancia de cada una de las fracciones eluidas en un espectrofotómetro a 280 nm. Se usaron los siguientes marcadores, azul dextran (2,000 kDa, volumen vacío), albúmina bovina (66 kDa), y citocromo C (12.4 kDa). Después se cromatografió en las mismas condiciones ¹²⁵I-IgG (150 kDa), ¹²⁵I-hPRL (23 kDa) y ¹²⁵I (volumen final), midiendo después las CPM en cada una de las fracciones eluidas.

Cromatografía de los sueros

Se utilizó entre 0.5 a 1 ml de suero diluido en PBS (volumen total de 1.5 ml), la muestra se agregó a la columna lentamente e inmediatamente se inició a coleccionar las fracciones y en cada una de las fracciones se determinó la concentración de PRL por EIA.

Anexo 2.

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS
HPRL/MACROPROLACTINEMIA

Fecha _____ No. Progresivo (Codificación interna) _____

Nombre _____

Edad _____ Afiliación _____

Antecedentes Gineco-Obstétricos.

Menarca _____ años FUM _____ Ritmo _____

Gesta _____ Para _____ Abortos _____ Cesáreas _____

Método anticonceptivo _____

Motivo de envío o atención

Antecedentes de ingesta reciente de medicamentos (en los últimos 30 días). Cuál, tiempo de tomarlo y dosis y motivo _____

Galactorrea (NO) (SI), especifique _____

Trastornos menstruales (NO) (SI), especifique _____

Alteraciones en la libido (NO) (SI), especifique _____

Trastornos visuales (NO) (SI), especifique _____

Otros signos y/o síntomas, especifique _____

Hallazgos en la TAC o RM de hipofisis, especifique _____

Diagnóstico de hiperprolactinemia por el médico tratante, especifique

Tratamiento prescrito para hiperprolactinemia (NO) (SI), especifique _____

Observaciones

Patologías endocrinas asociadas

Tiroidea

Ovárica

Suprarrenal

Metabólica

Otra

Resultados de laboratorio

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
PRL sérica total		PRL sérica libre	
% de macroprolactinemia por PEG		% de big big PRL por cromatografía de filtración en gel	
% de big PRL por cromatografía de filtración en gel		% de little PRL por cromatografía de filtración en gel	
% de PRL retenida en cromatografía de afinidad con proteína G		Densidad Optica para IgG	
Densidad Optica para IgA		Densidad Optica para IgM	
TSH			

Anexo 3. Consentimiento informado



Hospital Juárez de México

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

El propósito de esta carta es darle la información necesaria para que usted decida su participación en el estudio. Investigadores: *Dra. Imelda Hernández Marín, Dra. Lizbeth Chinolla Arellano.*

Propósito del estudio: Se le ha pedido participar en un estudio que se está realizando en mujeres con elevación de la hormona prolactina para determinar el tipo. Si decido participar tendré que proporcionar muestra de sangre en una sola ocasión.

Riesgo del estudio: Yo comprendo que no existe riesgo alguno con la toma de las muestras, sin embargo puede ser molesta. Se me ha explicado que los beneficios de este estudio son determinar el tipo y la cantidad de hormona prolactina.

Compensación: Se me ha explicado que no recibiré compensación alguna de tipo monetaria por participar en este estudio. Y que no pagaré nada por participar en este estudio.

Confidencialidad: Comprendo que los resultados en caso de ser relevantes en mi padecimiento se me darán a conocer a la brevedad posible. Las pruebas se discutirán conmigo y será confidencial conforme lo señala la ley.

La participación es voluntaria: Me han explicado que la participación en este estudio es voluntaria. Si decido abandonar el estudio, esto no será obstáculo para ningún tratamiento que esté recibiendo o tenga que recibir, y no afectará mis consultas médicas actuales o futuras en los servicios médicos que ofrece el Hospital de Juárez de México.

Preguntas: Puedo ponerme en contacto con los investigadores del proyecto: En el servicio de Biología de la Reproducción Humana, de lunes a viernes de 8 hrs a 15 hrs en los Consultorios 30 y 31 del hospital.

Nombre y firma: _____

Fecha: _____.