

RESUMO

José Gilberto H. Vieira

A dosagem de prolactina é teste de rotina em numerosas condições da prática clínica, e o encontro de hiperprolactinemia pode desencadear outros protocolos diagnósticos mais complexos e custosos. A prolactina é um hormônio bastante heterogêneo e, do ponto de vista de peso molecular, existem três formas principais em circulação: monômero de 23kDa, dímero (*big prolactin*) de 45kDa e macroprolactina (*big-big prolactin*) de peso molecular acima de 150kDa. Em condições normais ou em pacientes com hiperprolactinemia sintomática, predomina em circulação a forma monomérica. A macroprolactina é constituída, na maioria dos casos, por uma associação entre uma molécula de prolactina e uma de IgG, o que leva a uma meia-vida mais longa e atividade biológica menor. O método mais empregado para a pesquisa da existência de quantidades significativas de macroprolactina é o estudo de recuperação pós precipitação do soro com polietilenoglicol (PEG), e a confirmação, quando necessária deve ser feita por cromatografia em coluna de gel filtração. A definição dos valores de corte deve ser feita para cada método, desde que o reconhecimento das formas pode variar entre métodos. A frequência do encontro de predomínio de macroprolactina em pacientes com hiperprolactinemia referida na literatura varia de acordo com a casuística publicada, mas deve estar na faixa de 25%. A importância do encontro do fenômeno de predomínio de formas moleculares de alto peso molecular se prende ao fato de que estas formas teriam menor atividade biológica, e estão associadas a casos assintomáticos, ou oligossintomáticos, e a encontro de estudos de imagem normais. Desta maneira, em especial em pacientes cujo quadro clínico não seja característico, a pesquisa de macroprolactinemia é fundamental. Em amostras positivas, estudos adicionais de imagem só devem ser indicados em pacientes com quadro clínico suspeito de hiperprolactinemia patológica. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/1:45-50)

Setor de Endocrinologia do Centro de Medicina Diagnóstica Fleury e
Disciplina de Endocrinologia,
Universidade Federal de São Paulo
(UNIFESP/EPM), São Paulo, SP.

Descritores: Formas circulantes de prolactina; Macroprolactina; Hiperprolactinemia; Precipitação com PEG

ABSTRACT

Macroprolactinemia

Serum prolactin measurement is a routine test in several conditions in every day clinical practice, and the finding of hyperprolactinemia can induce complex and expensive imaging studies. Circulating prolactin is a heterogeneous hormone and, from a molecular weight point of view, there are three main forms: the 23kDa monomer, the 45kDa dimer (*big prolactin*) and the higher than 150kDa macroprolactin, or *big-big prolactin*. In normal conditions, or in patients with symptomatic hyperprolactinemia, the monomeric form is the predominant. Macroprolactin is constituted, in the majority of cases, by an association of prolactin and IgG that leads to a longer half-life and decreased biological activity. The most commonly employed method to screen for the presence of significant quantities of macroprolactin is the study of recovery after polyethylene glycol (PEG) precipitation, and the confirmation, if necessary, includes gel filtration chromatography. The cut-

Recebido em 11/12/01
Aceito em 05/01/02

off values must be defined for each method, since the recognition of the different forms can vary between methods. The frequency of the finding of a predominance of macroprolactin in a patient with hyperprolactinemia varies in the literature, but is most commonly accepted to be around 25%. The importance of the finding of the phenomenon of predominance of macroprolactin is related to the fact that this molecular form of prolactin is supposed to have lower biological activity, is associated to asymptomatic or oligosymptomatic cases, and normal imaging studies. Consequently, in special in patients with clinical symptoms not characteristic, the screening for macroprolactin is essential. In positive cases, additional imaging studies should only be indicated in patients with clinical symptoms suspect of being a consequence of a pathological hyperprolactinemia. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/1:45-50)

Keywords: Circulating prolactin forms; Macroprolactin; Hyperprolactinemia; PEG precipitation

ADOSAGEM DE PROLACTINA SÉRICA é atualmente um teste laboratorial amplamente disponível. As indicações da dosagem são cada vez mais amplas e incluem alterações menstruais, amenorréia, infertilidade, e galactorréia em mulheres, além de problemas relacionados à fertilidade e impotência no homem. Adicionalmente, a dosagem de prolactina sérica é fundamental no diagnóstico e seguimento de tumores hipotálamo-hipofisários. Mais do que isso, a

dosagem passou a fazer parte da avaliação basal em qualquer circunstância clínica real, ou presuntiva, relacionada à função reprodutiva. A prolactina é um hormônio heterogêneo (1) e, no que se refere ao seu tamanho molecular, encontra-se em circulação em três formas principais: monômero, dímero, e formas de alto peso molecular. A forma monomérica, peptídeo linear de 199 aminoácidos, tem peso molecular em torno de 23kDa e é a forma que normalmente predomina (> 90% das formas circulantes) no soro de indivíduos normais e de pacientes com diagnóstico clínico e anatômico de prolactinoma. O dímero tem peso molecular em torno de 45kDa, sendo também conhecido como *big prolactin*; já a forma de alto peso molecular, de 150 a 170kDa (*big-big prolactin*), é usualmente conhecida como macroprolactina (2). Estas duas últimas encontram-se em circulação em praticamente todos os indivíduos, mas em concentrações pouco expressivas, em geral inferiores a 10% da prolactina total circulante. A caracterização das três formas é idealmente realizada através de estudos de cromatografia em colunas de gel filtração, onde a eluição se dá em função do peso molecular (figura 1). Além das formas com divergências significativas quanto ao peso molecular, a prolactina apresenta várias formas circulantes que apresentam pontos isoelétricos diferentes, em especial devido a diferenças de glicosilação (3).

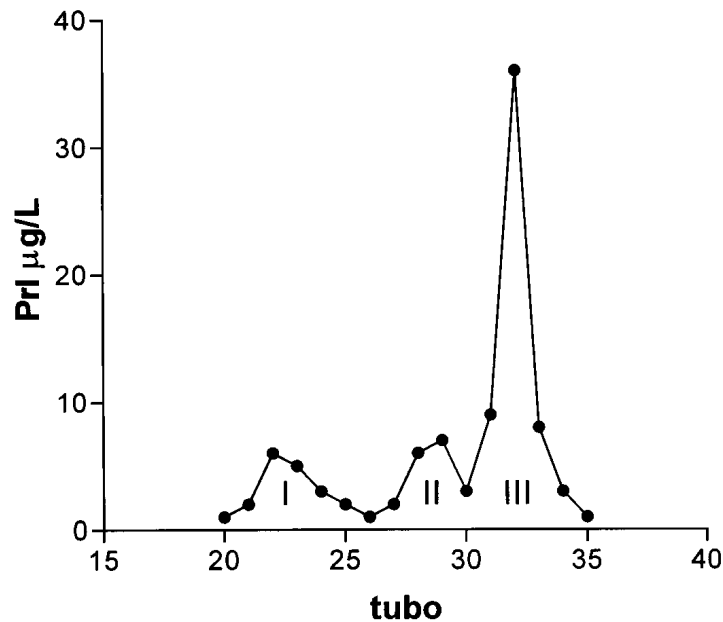


Figura 1. Perfil de eluição de prolactina obtido pela cromatografia em coluna de gel filtração (Superdex 200, 1,6x30cm, alíquotas de 1,2mL) de soro de paciente com hiperprolactinemia devida a microadenoma hipofisário. O pico I corresponde à macroprolactina, o pico II aos dímeros e o pico III às formas monoméricas.

Diversos trabalhos relatam o encontro de pacientes com níveis elevados de prolactina sérica, que no entanto são assintomáticos, ou pacientes onde os sintomas clínicos à priori relacionados com a hiperprolactinemia posteriormente se revelaram de outra origem. Estes indivíduos tinham em comum o fato de que a forma predominante de prolactina circulante era a macroprolactina (4-7). Tais observações, algumas de várias décadas, se sucedem na literatura, chamando a atenção para o fenômeno e tornando-o assunto que passou a ser debatido na literatura internacional (8). De fato, as estatísticas disponíveis, que colocam a frequência do fenômeno na faixa de 25% ou mais dos casos de hiperprolactinemia, talvez consigam levar seu estudo ao lugar de destaque que merece (9-12).

A Natureza do Fenômeno

A estrutura da macroprolactina é, pelo menos na maioria dos casos, relacionada à presença em circulação de imunoglobulinas que se ligam à prolactina (13-16). Em alguns casos essas imunoglobulinas apresentam alta afinidade (14), mas na maioria a afinidade é baixa, e a comprovação de que se trata de um complexo imunoglobulina-prolactina só pode ser feito com técnicas muito sensíveis e específicas (16). O importante, do ponto de vista prático, é que a ligação da prolactina à imunoglobulina altera suas propriedades funcionais, tornando-a menos disponível para a ligação com os receptores específicos, com conseqüente diminuição da bio-atividade, e aumentando sua meia-vida em circulação (17). Este último fato é que leva ao encontro de níveis elevados de prolactina nos portadores do fenômeno, sem aparente elevação do nível de atividade biológica. O reconhecimento da macroprolactina pelos ensaios específicos para prolactina sérica, desenvolvidos visando à medida da forma monomérica, é universal, porém não equivalente (18-21). Isto pode resultar em resultados díspares, e não comparáveis, em pacientes com hiperprolactinemia com predomínio da macroprolactina, obrigando a que todos os métodos empregados em rotina diagnóstica sejam estudados quanto a esta característica (22).

Métodos de Detecção de Macroprolactina

Com a detecção da presença de quantidades significativas de macroprolactina em pacientes com hiperprolactinemia sendo potencialmente importante, tal pesquisa necessita de um método de triagem simples, específico e de baixo custo. O ideal seria que os ensaios regulares para prolactina detectassem apenas a forma monomérica mas, como já mencionado, isto não ocorre. O método de referência para a quantificação da macroprolactina, cromatografia líquida em coluna de

gel filtração, apesar de teoricamente simples, é trabalhoso, demorado e de alto custo. O método de triagem mais empregado, por sua simplicidade, boa reprodutibilidade e correlação com o método de referência, é a precipitação com polietilenoglicol (PEG) (10,11). O princípio deste teste tem como base a observação de que a exposição de imunoglobulinas a concentrações definidas de PEG levam à sua insolubilização. Considerando-se que a macroprolactina seria constituída por prolactina e imunoglobulina, métodos mais específicos, como utilização de proteína A, que liga especificamente IgG, poderiam ser utilizados mas seu custo é mais elevado, o que inviabiliza sua utilização prática.

Nós temos realizado a triagem com PEG em todas as amostras de nossa rotina diagnóstica com resultados acima de 30µg/L, sendo que o limite superior da faixa de normalidade para o método empregado (imuno-fluorométrico) é de 15µg/L. Em resumo o teste é feito com a mistura de 250µL de soro do paciente com 250µL de uma solução de 250g/L de PEG 6000 em água, mantida a 4°C. Após mistura por agitação em agitador tipo vórtex por 1 minuto, a mistura é submetida a centrifugação por 5 minutos a 9500g. A quantidade de prolactina existente no sobrenadante é medida no mesmo ensaio empregado na rotina, e a recuperação calculada com base no valor inicial da amostra. Recuperações 65% classificam a amostra como tendo predomínio de formas monoméricas, e recuperações ≤ 30% como predomínio de formas de alto peso molecular (macroprolactinemia). Os valores entre 30 e 65% de recuperação são classificados como indeterminados e devem ser submetidos a cromatografia numa coluna de gel filtração para melhor definição. Os valores de corte definidos nos níveis de 65 e 30% de recuperação tiveram como base a análise de 171 amostras de soro com prolactina acima de 30µg/L que foram precipitadas e cromatografadas (figura 2) (11). A razão para o encontro de amostras com recuperação intermediária (entre 30 e 65%) pode ter várias razões. Entre estas podemos citar o coeficiente de variação do teste de precipitação, que se situa entre 7 e 28%, dependendo do nível de prolactina (11), o predomínio da forma dimérica, que apresenta precipitação não uniforme, e a real presença de duas populações equivalentes, de formas monoméricas e de formas de alto peso molecular. Quanto ao estudo cromatográfico, empregamos coluna calibrada de Superdex 200 (1,6x30cm); cerca de 0,5mL de soro são aplicados, eluídos a uma velocidade de 1mL por minuto, e alíquotas de 1,2mL são coletadas e analisadas quanto ao conteúdo de prolactina, sendo então a área sob a curva calculada e definida em % de cada forma molecular (monômero, dímero e macroprolactina).

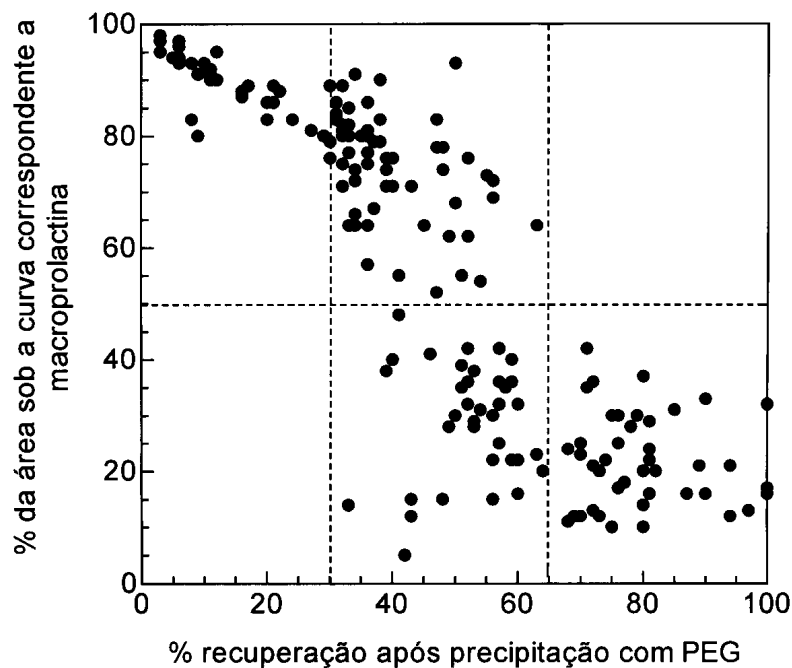


Figura 2. Correlação entre a área sob a curva obtida pós cromatografia em coluna de gel filtração correspondente a macroprolactina, e a percentagem de recuperação obtida pela dosagem de prolactina no sobrenadante após tratamento do soro com PEG.

Frequência do Encontro de Macroprolactina

A aplicação rotineira do teste de precipitação com PEG para pesquisa de macroprolactina tem revelado números surpreendentes. No último levantamento de nossa rotina, baseada em 110.450 dosagens de prolactina ao longo de 56 meses, realizamos a pesquisa de macroprolactina em todas as amostras com níveis de prolactina superiores a $30\mu\text{g/L}$, num total de 7.055 amostras (6,4%). Destas, recuperação superior a 65%, o que classifica o soro como apresentando predomínio de forma monomérica, foi encontrada em 3.881 amostras, ou 55% das pesquisadas. Já recuperações inferiores a 30%, classificando as amostras como tendo predomínio de macroprolactina, foram encontradas em 2.316 casos, ou 32,8% das pesquisadas. Recuperações intermediárias, ou seja, entre 30 e 65%, foram encontradas em 858 amostras, ou 12,2%, sendo estas submetidas a estudo cromatográfico, sendo que em 61,4% (527) o estudo mostrou predomínio de macroprolactina. No total chegamos ao número de 2.843 amostras de um total de 7.055 sendo classificadas como portadoras de predomínio de macroprolactina, ou 40,3%. Este número é superior ao descrito pelas principais estatísticas publicadas na literatura (9,10,12), que variam em torno da cifra de 25%. Os números de nossa casuística podem ser explicados pelo fato de sermos um laboratório de referência no Brasil

para o estudo de macroprolactinemia, o que faz com que recebamos amostras de todo o país, muitas delas suspeitas de predomínio de macroprolactina.

Correlação entre Macroprolactinemia e Achados de Estudos de Imagem da Região Hipotálamo-Hipofisária

Se bem que as informações sobre macroprolactinemia são cada vez mais disponíveis, mais dados que correlacionem a presença de macroprolactinemia, com avaliação clínica e achados de exames de imagem são ainda necessários. Nós completamos recentemente (23) um estudo correlacionando a presença de macroprolactinemia com o achado de exames de imagem da região hipotálamo-hipofisária em 113 pacientes com hiperprolactinemia, sendo 61 negativos na pesquisa para macroprolactina e 52 positivos. Dos pacientes testados como negativos, 75% apresentavam imagem compatível com a presença de um adenoma hipofisário, em contraste com apenas 21% dos pacientes que testaram positivo para macroprolactina. Em 68 dos 113 pacientes iniciais tivemos acesso a informações sobre o quadro clínico inicial e evolução; 90% (36/40) dos pacientes com predominância de prolactina monomérica (negativos na pesquisa para macroprolactina) apresentavam sintomas que poderiam ser relacionados ao estado de hiperprolactinemia. Em con-

traste, 46,4% (13/28) dos pacientes que apresentavam pesquisa positiva para macroprolactina eram assintomáticos. Estes achados, em conjunto com os recentemente publicados por Leslie e cols. (12), sugerem fortemente que em pacientes com macroprolactinemia estudos de imagem somente deveriam ser realizados quando achados clínicos os referendassem. Em função disto, todas as amostras com hiperprolactinemia deveriam ser testadas para a presença de macroprolactina. Esta observação levanta dois problemas: a partir de que nível definimos hiperprolactina, e com que método efetuar a pesquisa. Quanto à primeira questão, a resposta mais simplista poderia ser todos os valores acima da faixa da normalidade. No entanto os níveis de prolactina são sabidamente sujeitos a flutuações não patológicas muito freqüentes como, por exemplo, por estresse ou uso de drogas. Outro fator complicador são as diferentes faixas de normalidade para diferentes métodos, sendo que o valor máximo considerado normal para mulheres adultas na fase folicular varia desde 15 até 30µg/L. Na nossa opinião um valor igual ou superior ao dobro da faixa superior da normalidade poderia ser considerado como francamente anormal e a amostra deveria ser submetida ao estudo. Quanto ao método de pesquisa a precipitação com PEG, descrita acima, é a nosso ver o método que alia, no momento, melhor custo-benefício.

Conclusões e Perspectivas

A definição diagnóstica em casos de hiperprolactinemia é, mais do que nunca, um desafio (24,25). Os dados existentes na literatura, e que foram resumidos acima, são claros quanto à importância da definição da presença do fenômeno da macroprolactina. Sua pesquisa com o método de precipitação com PEG é simples e na maioria dos casos (85%) define a condição. O processo cromatográfico já é mais dispendioso e complexo, devendo ser restrito a laboratórios de referência e casos selecionados. Quanto às possibilidades de desenvolvimento de métodos específicos para a forma monomérica, teoricamente seria a condição ideal, partindo-se da premissa de que a forma monomérica é a forma ativa. Não creio, no entanto, que com o modelo de ensaio imunométrico atualmente empregado isto seja viável, desde que as imunoglobulinas anti-prolactina responsáveis pelo fenômeno têm afinidades variáveis, e seu deslocamento pelos anticorpos de alta afinidade empregados nos ensaios deve ser a regra. Alternativas metodológicas como bioensaios utilizando células transfectadas com o receptor de prolactina acoplado a gene reporter, ou ensaios concomitantes para prolactina e IgG ligado a prolactina, poderão ser as alternativas futuras.

REFERÊNCIAS

1. Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995;16:354-69.
2. Suh HK, Frantz AG. Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;39:928-35.
3. Campino C, Torres C, Ampuero S, Diaz S, Gonzalez GB, Seron-Ferre M. Bioactivity of prolactin isoforms: lactation and recovery of menses in nursing women. *Hum Reprod* 1999;14:898-905.
4. Whittaker PG, Wilcox T, Lind T. Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to big, big prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;53:863-6.
5. Larrea F, Villanueva C, Cravioto MC, Escorza A, del Real O. Further evidence that big, big prolactin is preferentially secreted in women with hyperprolactinemia and normal ovarian function. *Fertil Steril* 1985;44:25-30.
6. Jackson RD, Wortsman J, Malarkey WB. Characterization of a large molecular weight prolactin in women with idiopathic hyperprolactinemia and normal menses. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:258-64.
7. Guay AT, Sabharwal P, Varma S, Malarkey WB. Delayed diagnosis of psychological erectile dysfunction because of the presence of macroprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2512-4.
8. Lindstedt G. Endogenous antibodies against prolactin – a “new” cause of hyperprolactinemia. *Eur J Endocrinol* 1994;130:429-32.
9. Bjoro T, Morkrid L, Wergeland R, Turter A, Kvistborg A, Sand T et al. Frequency of hyperprolactinaemia due to large molecular weight prolactin (150-170kDa PRL). *Scand J Clin Lab Investig* 1995;55:139-47.
10. 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;34:252-8.
11. Vieira JGH, Tachibana TT, Obara LH, Maciel RMB. Extensive experience and validation of polyethylene glycol precipitation as a screening method for macroprolactinemia. *Clin Chem* 1998;44:1758-9.
12. Leslie H, Courtney CH, Bell PM, Hadden DR, McCance DR, Ellis PK et al. Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia identified by a single polyethylene glycol precipitation method. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2743-6.
13. Bonhoff A, Vuille JC, Gomez F, Gellersen B. Identification of macroprolactin in a patient with asymptomatic hyperprolactinemia as a stable Pr-IgG complex. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1995;103:252-5.
14. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurabachi H. Correlation of the antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin autoantibody. *Eur J Endocrinol* 1994;130:438-45.
15. Leite V, Cosby H, Sobrinho LG, Fresnoza A, Santos MA, Friesen HG. Characterization of big, big prolactin in

- patients with hyperprolactinaemia. **Clin Endocrinol** 1992;37:365-72.
16. Cavaco B, Leite V, Santos MA, Arranhado E, Sobrinho LG. Some forms of big-big prolactin behave as a complex of monomeric prolactin with an immunoglobulin G in patients with macroprolactinemia. **J Clin Endocrinol Metab** 1995;80:2342-6.
 17. Hatori 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.
 18. Cavaco B, Prazeres S, Santos MA, Sobrinho LG, Leite V. Hyperprolactinemia due to big-big prolactin is differently detected by commercially available immunoassays. **J Endocrinol Invest** 1999;22:203-8.
 19. Fahie-Wilson M. Detection of macroprolactin causing hyperprolactinemia in commercial assays for prolactin. **Clin Chem** 2000;46:2022-3.
 20. John R, McDowell IFW, Scanlon MF, Ellis AR. Macroprolactin reactivities in prolactin assays: an issue for clinical laboratories and equipment manufacturers. **Clin Chem** 2000;46:884-5.
 21. Fahie-Wilson M, Brunsden P, Surrey J, Everitt A. Macroprolactin and Roche Elecsys prolactin assay: characteristics of the reaction and detection by precipitation with polyethylene glycol. **Clin Chem** 2000;46:1993-5.
 22. Vieira JGH, Nishida SK, Lombardi MT, Kasamatsu TS. Desenvolvimento de um método imunofluorométrico para a dosagem de prolactina sérica e identificação das isoformas circulantes. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1996;40:187-92.
 23. Hauache OMG, Rocha AJ, Maia Jr. ACM, Maciel RMB, Vieira JGH. Screening for macroprolactinaemia may prevent unnecessary pituitary imaging studies. **Clin Endocrinol**, in press.
 24. Glezer A, d'Alva CB, Bronstein MD, Vieira JGH. Macroprolactinemia e incidentaloma hipofisário. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2001;45:190-8.
 25. Cruz T. Hyperprolactinemia: challenges in diagnosis. In: Coutinho EM and Spinola P (ed) **Current Knowledge in Reproductive Medicine**, Elsevier Sciences, Amsterdam, 2000;pp 417-24.

Endereço para correspondência:

José Gilberto H. Vieira
Setor de Endocrinologia
Fleury - Centro de Medicina Diagnóstica
Av. General Waldomiro de Lima 508
04.344-070 São Paulo, SP
e.mail: jose.vieira@fleury.com.br