

Artículo Original

Presencia de macroprolactina en sueros con normo e hiperprolactinemia: Comparación de dos métodos de detección

Sandra Solari G.¹, Teresita Quiroga G.¹, Manuela Goycolea M.², Jacqueline Parada B.², Ana María Guzmán D.¹, Marcela Lagos L.¹, Juan Carlos Ríos B.¹, Luis Rodríguez P.¹ y Eugenio Arteaga U.³

Comparison of two techniques to detect the presence of macroprolactin in serum

¹Departamento de Laboratorio Clínico,
²Servicio de Laboratorios Clínicos y
³Departamento de Endocrinología,
Facultad de Medicina,
Pontificia Universidad Católica de Chile,
Santiago, Chile.

Correspondencia a:
Dra. Sandra Solari. Departamento
de Laboratorio Clínico, Facultad de
Medicina, Pontificia Universidad Católica
de Chile. Vicuña Mackenna 4686,
Piso 3, Macul, Santiago, Chile.
Teléfono: (562) 354 8979,
Fax (562) 552 1665.
E-mail: ssolari@med.puc.cl

Recibido: 17 Diciembre de 2008
Aceptado: 14 Enero de 2009

Background: Macroprolactin is biologically inactive but may be detected by immunoassays. This leads to errors in diagnosis and inadequate treatment of patients with hyperprolactinemia. **Aim:** To assess two techniques to detect the presence of macroprolactin. **Material and Methods:** Prolactin was measured by immunoassay in 57 serum samples (from 4 males and 53 females aged 33 ± 13 years), before and after precipitation with polyethyleneglycol (PEG) and separation by ultrafiltration. A significant level of macroprolactin was considered to be present when prolactin detected in the supernatant after PEG precipitation or in the ultrafiltrate was less than 40% of the initial concentration of prolactin. **Results:** Prolactin levels fluctuated from 5 to 411 ng/mL. The percentages of recuperation were independent of the initial prolactin concentration. In 12 and 14% of samples, using polyethyleneglycol and ultrafiltration respectively, there was a prolactin recuperation of less than 40%. Eight and 11% of samples with a prolactin concentration of more than 30 ng/ml, had a recuperation of less than 40% using polyethyleneglycol and ultrafiltration respectively. **Conclusions:** Approximately 10% of samples with a prolactin concentration over 30 ng/mL have recuperation values suggestive of the presence of macroprolactin. There is a good concordance between precipitation using polyethyleneglycol or ultrafiltration.

Key words: Macroprolactin, hiperprolactinemia, polyethyleneglycol precipitation, ultrafiltration.

Introducción

La Prolactina (Prl) es una hormona polipeptídica sintetizada en las células acidófilas de la adenohipófisis; circula en varias formas moleculares de diferentes tamaños: a) "Prl monomérica", nativa o pequeña de 23 kDa, bioactiva y con gran afinidad a su receptor, que constituye aproximadamente el 85% de la PRL circulante en individuos normales; b) "Prl grande" de 50-70 kDa que puede ser Prl glicosilada o compuesta por dímeros de la nativa y que representa 10-15% del total; c) "Prl grande-grande o Macroprolactina" de PM > 100 kDa, que es principalmente un complejo con IgG, pudiendo también constituirse por agregación de Prl nativa; esta forma es biológicamente inactiva y tiene vida media más prolongada. En individuos hiperprolactinémicos, la proporción relativa de estas formas circulantes puede ser considerablemente diferente¹.

En algunos, la Prl puede estar mayoritariamente en forma de macroprolactina (macro Prl), lo que debe considerarse "pseudo-hiperprolactinemia" sin trascendencia clínica², dado que no se asocia a tumor hipofisiario y tampoco induce supresión del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Esto avala lo importante que es identificar adecuadamente la macro Prl para evitar procedimientos diagnósticos y terapéuticos inadecuados y costosos. Por ello, algunos laboratorios efectúan la detección rutinaria de macro Prl en los sueros hiperprolactinémicos, considerando que la presencia de macro Prl es probablemente la causa más común de error de diagnóstico y tratamiento inadecuado en los pacientes con hiperprolactinemia².

Los actuales inmunoensayos usados para la detección de Prl presentan diversos grados de reactividad con macro Prl, diferencias que se explican probablemente en la disímil reactividad cruzada de los anticuerpos^{3,4}. A pesar de que

algunos métodos dicen tener una baja reactividad cruzada con macro Prl, hay literatura que contradice esta afirmación⁵. Lamentablemente, no hay un método sencillo y automatizado para la detección de macro Prl y la gran mayoría de los laboratorios chilenos no ofrecen un procedimiento para esta detección. El método "gold standard" para la detección y confirmación de macro Prl es la cromatografía de filtración en gel (GFC) que consiste en la separación de las distintas formas moleculares de acuerdo al peso molecular de ellas. Este es un método laborioso, de alto costo y poco práctico para laboratorios clínicos de alta demanda y que necesitan respuesta rápida; por esto, se han desarrollado técnicas alternativas, como la de precipitación con polietilenglicol y la separación por ultrafiltración⁶, que permiten determinar en forma indirecta la eventual presencia de macro Prl en la muestra.

El objetivo de este estudio fue evaluar comparativamente las técnicas de precipitación con polietilenglicol (PEG) y de separación por ultrafiltración (UF) para la determinación de macro Prl en muestras propias de la rutina de un laboratorio clínico.

Sujetos, Material y Métodos

Muestras

Se escogieron 57 sueros anónimos de las muestras guardadas a -20 °C en que se solicitó determinación de Prl (53 mujeres, edad $\bar{x} \pm DE = 32 \pm 13$ años y 4 hombres, edad $\bar{x} \pm DE = 37 \pm 18$ años). Las muestras se dividieron en 3 grupos según al valor de Prl (11 sueros ≤ 18 ng/mL, 13 sueros > 18 ng/mL y < 30 ng/mL, y 32 sueros ≥ 30 ng/mL). Cada muestra fue descongelada, homogenizada y separada en tres alícuotas: una para medir Prl, otra que fue tratada con una solución al 25% de PEG y la tercera para ser ultrafiltrada.

Ensayo de Prl

La determinación de Prl fue realizada en el autoanalizador ADVIA Centaur (Siemens Diagnostics). Este es un inmunoensayo tipo emparejado de dos puntos que utiliza tecnología quimioluminométrica directa, y cantidades constantes de dos anticuerpos. Los valores de referencia son dependientes de la edad y sexo de los pacientes, con un valor superior normal para adultos hombres de 20 ng/mL y 25 ng/mL para mujeres. Los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 5,5\%$ a valores de 3,3 a 118 ng/mL. El ensayo mide concentraciones de Prl de hasta 200 ng/mL, con una sensibilidad analítica de 0,3 ng/mL. La fórmula de conversión provista por el ensayo es $1 \text{ ng/mL} = 21,2 \mu\text{UI/mL}$.

Ensayo de precipitación con Polietilenglicol (PEG)

Se mezclan 200 μL de suero con igual volumen de una solución acuosa al 25% de PEG 6.000 (SIGMA, cat. P2263). Se agitan vigorosamente por 2 min y se incuban a temperatura ambiente durante 10 min. La suspensión se centrifuga a 10.500 g por 15 min; el sobrenadante recuperado

se diluye 1:3 con multidiluyente 1 (provisto por el ensayo de Prl del ADVIA Centaur, Siemens) para la determinación de Prl. Los resultados de Prl del sobrenadante, después de la corrección por dilución, se comparan con los resultados de Prl obtenidos a partir del suero no tratado y se expresan como el porcentaje de recuperación de Prl.

Ensayo de ultrafiltración (UF)

Se utilizó el dispositivo comercialmente disponible Millipore Amicon Ultra-4 (cat. UFC810096) con un punto de corte de 100 kDa. Se agregan 250 μL de suero junto a 250 μL de NaCl 0,9% a temperatura ambiente. Luego se centrifuga a 4.000 g por 20 min. La determinación de Prl se realiza en el ultrafiltrado y su concentración corresponde a Prl de PM < 100 kDa. Estos resultados se compararon con los obtenidos a partir del suero no tratado y se expresaron como el porcentaje de recuperación de Prl.

Se consideró como nivel significativo de macroprolactinemia aquel que muestra una recuperación de Prl inferior al 40% en el sobrenadante, después de la precipitación con PEG o en el ultrafiltrado. Los resultados se expresaron como porcentaje de recuperación.

Resultados

Las muestras analizadas presentaron valores de Prl que fluctuaron entre 4,5 y 411 ng/mL. Los porcentajes de recuperación posterior al tratamiento con PEG y UF fueron independientes de la concentración inicial de Prl. Los resultados obtenidos en 56 de las 57 muestras analizadas se observan en la Tabla 1. Se excluyó una muestra debido a que presentaba una recuperación muy baja de Prl comparado con lo encontrado normalmente en la literatura para macro Prl, (6% con PEG y 13% con UF) con valor inicial de Prl de 54 ng/mL (ver Discusión).

Al separar las muestras de acuerdo a si la recuperación era mayor o menor al 40% se encontró concordancia entre ambos métodos en 55 de las 56 muestras analizadas, presentando 7 de ellas recuperación $< 40\%$ por precipitación con PEG y 8 por UF. La muestra discordante presentó una recuperación por precipitación con PEG de 51% y de 38% por UF. Al dividir las muestras de acuerdo al valor de la concentración inicial de Prl se encontró una recuperación bajo el punto de corte de $< 40\%$ en los tres rangos evaluados; la muestra discordante entre ambos métodos correspondía a una Prl de 53 ng/mL (Figura 1). Si consideramos sólo las muestras con valores de Prl > 30 ng/mL, se observa que 3 de 32 presentaron recuperación $< 40\%$ cuando se trataron con PEG y 4 de 32 cuando se realizó UF. Los valores de Prl y recuperaciones de estas muestras se presentan en la Tabla 2.

Al comparar los porcentajes de recuperación en cada muestra según las dos técnicas, se observa que la precipitación con PEG tiene mayor dispersión de los valores que la UF permitiendo una mejor separación de las muestras. (Figura 2).

Artículo Original

Tabla 1. Recuperación de Prl expresada porcentualmente como promedio \pm DE. Número de muestras del total de 56 examinadas con recuperación < 40%, las que luego fueron separadas según la concentración de Prl en ellas.

Prl ng/mL	% Recuperación post PEG		% Recuperación post UF	
	$\bar{x} \pm$ DE (dispersión)	recuperación < 40%	$\bar{x} \pm$ DE (dispersión)	recuperación < 40%
4,5 – 411	67 \pm 19 (17 – 106)	7/56 (12,5 %)	47 \pm 8 (29 – 65)	8/56 (14,3 %)
\leq 18	64 \pm 29 (23 – 106)	3/11 (27,3 %)	50 \pm 13 (29 – 65)	3/11 (27,3 %)
> 18 y < 30	72 \pm 17 (33 – 93)	1/13 (7,7 %)	48 \pm 5 (38 – 57)	1/13 (7,7 %)
\geq 30*	65 \pm 16 (17 – 98)	3/32 (9,4 %)	45 \pm 6 (29 – 56)	4/32 (12,5 %)

*Hubo sólo una muestra discordante con recuperación de 51% post PEG y 38% post UF

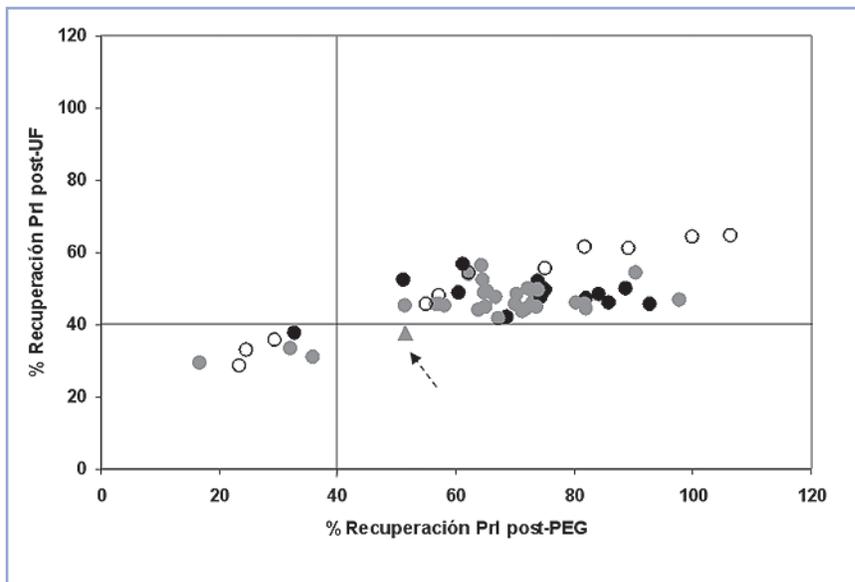


Figura 1. Correlación entre los métodos de precipitación con PEG y UF. Las muestras fueron separadas de acuerdo a su valor inicial de Prl (\circ \leq 18 ng/mL, \bullet > 18 y < 30 ng/mL, \blacktriangle \geq 30 ng/mL). La flecha indica la única muestra discordante considerando 40% el punto de corte.

Tabla 2. Concentración y porcentaje de recuperación de Prl en muestras con Prl inicial > 30 ng/mL

Prl (ng/mL)	Recuperación post-PEG (%)	Recuperación post-UF (%)
32	17	29
41	32	33
53	51	38
143	36	31

Discusión

Estos resultados demuestran que los porcentajes de recuperación de Prl fueron independientes de los valores iniciales de Prl y que un 12,5% de las muestras analizadas con la técnica PEG y 14,3% con la técnica UF presentaron recuperación de prolactina < 40%, sugerente de la presencia de macro Prl. Con las técnicas de precipitación con PEG y UF sólo se puede hablar de porcentaje de recuperación y no se puede determinar el porcentaje de macro Prl, debido a que su precipitación así como su separación por UF, es

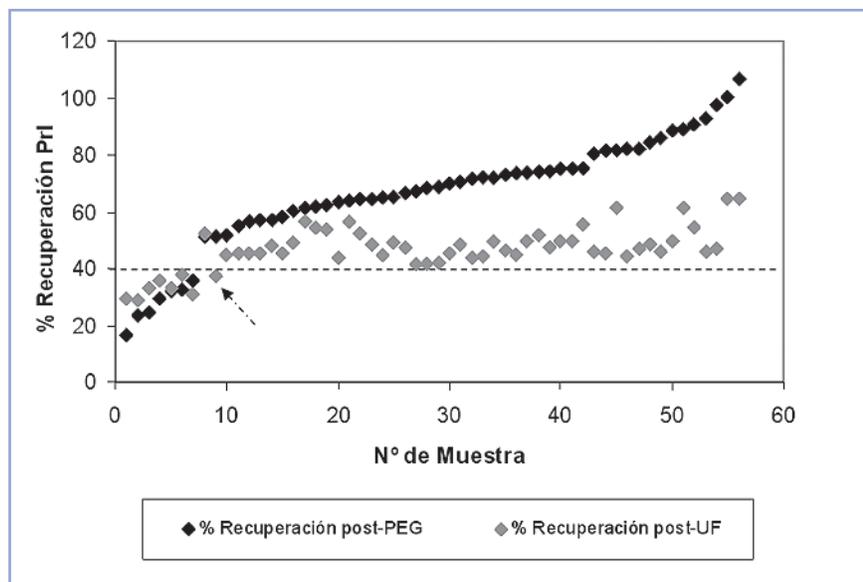


Figura 2. Porcentaje de recuperación de Prl de cada muestra post tratamiento con PEG y UF. La flecha indica la única muestra discordante considerando 40% el punto de corte.

inespecífica. En este estudio no fue posible comprobar la presencia de macro Prl en los sueros analizados debido a la escasez de la muestra y a la falta de disponibilidad de la técnica GFC.

La mayoría de los estudios anteriores han demostrado que recuperaciones menores del 40% determinan confiabilidad respecto de la presencia de importantes cantidades de macro Prl y que recuperaciones de más del 50% señalan la ausencia de macro Prl, con un área gris en las recuperaciones entre el 40 y el 50% que requerirían GFC para confirmar o refutar la presencia de macro Prl. Otros han sugerido que las muestras con recuperación entre 30 y 65% deberían ser clasificadas como indeterminadas y requieren efectuar GFC para un diagnóstico definitivo^{2,6-8}. En las muestras analizadas, sólo un pequeño número de pacientes pertenecían a esta categoría "gris", con 7 de los 56 pacientes en la cohorte con recuperaciones menores al 40% con precipitación con PEG y 8 con UF. Si consideramos sólo las muestras con valores de PRL > 30 ng/mL, se observa que un 12,5% (4 de 32) y un 9,4% (3 de 32) de los sueros post PEG y UF, respectivamente, tenían una recuperación < 40%, haciendo importante investigar la presencia de macroprolactinemia en dichas muestras.

Está claramente demostrado que el ensayo de precipitación con PEG no es específico para la eliminación de macro Prl, ya que las Prl grandes y alrededor de un 20% de la Prl monomérica pueden quedar atrapadas en el precipitado. El carácter no específico de la precipitación con PEG es una de las principales limitaciones de la técnica, ya que podría confundir una hiperprolactinemia causada sólo por presencia de macro Prl de una hiperprolactinemia real en que puede haber además, presencia de macro Prl². Un ejemplo de la

precipitación inespecífica podría ser la muestra excluida de los análisis en que la extremadamente baja recuperación de Prl (6% con PEG y 13% con UF), pudiera explicarse por el hecho de que se encontró aumento en la fracción gama en la electroforesis de proteínas de esa muestra. En este caso, la Prl monomérica sería co-precipitada por gammaglobulinas con PEG y la cantidad de Prl precipitada está relacionada con la concentración de globulinas del suero; así las altas concentraciones de globulinas pueden ser una causa de baja recuperación de Prl después de la precipitación con PEG y llevar a la errónea interpretación de que se está en presencia de macro Prl⁹. Por otro lado, puede haber interferencia en algunos inmunoensayos para la determinación de Prl post precipitación con PEG, hecho que es importante considerar al momento de implementar la determinación de macro Prl.

No obstante, la precipitación con PEG es simple, rápida y de bajo costo para la detección de macro Prl y se correlaciona bien con cromatografía de filtración en gel⁵, por lo que resulta ser un método conveniente con buena relación costo-efectividad como tamizaje, donde una recuperación de PRL en el sobrenadante < 40%, sugiere la presencia de macroprolactina². El método de UF es bastante sensible para la detección de macro Prl ya que separa las isoformas de Prl de acuerdo al peso molecular y puede ser especialmente valioso cuando PEG interfiere en algunos ensayos; sin embargo, tiene como inconveniente el alto costo económico¹⁰.

Al comparar las técnicas de precipitación con PEG y UF para detectar la presencia de macro Prl, se encontró una buena correlación entre ellas cuando se consideraba una recuperación < 40% como punto de corte para diferenciar hiperprolactinemia de macroprolactinemia; sin embargo, la

Artículo Original

precipitación con PEG permite una mejor diferenciación de los pacientes que la UF, lo que la hace muy apropiada para la búsqueda de macro Prl en casos de hiperprolactinemia asintomática, ya que trabaja con una escala más amplia, lo que redundaría en mayor sensibilidad para la pesquisa. Dado lo anterior, se ha favorecido al ensayo de precipitación con PEG como el mejor método para la detección de macro Prl y ha sido ampliamente adoptado para este fin¹¹.

En resumen, estos resultados demuestran que alrededor de un 10% de las muestras con Prl > 30 ng/mL presentaban valores de recuperación de Prl < 40%, sugerentes de la presencia de macro Prl, lo que avala el uso más extendido e incluso rutinario de alguna de estas técnicas en pacientes con hiperprolactinemia. La precipitación con PEG permite la detección de macro Prl en forma fácil y con un costo razonable, permitiendo su implementación como técnica de uso habitual en un laboratorio clínico. Sin embargo, los autores consideran que la determinación de macro Prl no debe realizarse automáticamente, sino que debe estar sujeta a la solicitud expresa del médico tratante.

Referencias

1. Smith TP, Suliman AM, Fahie-Wilson MN, McKenna TJ. 2002. Gross variability in the detection of Prolactin in sera containing big big Prolactin (Macroprolactin) by commercial immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5410-5415.
2. Suliman AM, Smith TP, Gibney T, McKenna TJ. 2003. Frequent Misdiagnosis and Mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of Macroprolactin screening: Application of a new strict laboratory definition of Macroprolactinemia. *Clin Chem* 49: 1504-1509.
3. Fahie-Wilson MN, John R. 2000. Detection of Macroprolactin causing hyperprolactinemia in commercial assays for Prolactin. *Clin Chem* 46: 2022-2023.
4. Schneider W, Marcovitzb S, Al-Shammarib S, Yagoa S, Chevalier S. 2001. Reactivity of macroprolactin in common automated immunoassays. *Clinical Biochemistry* 34: 469-473.
5. Kavanagh L, McKenna TJ, Fahie-Wilson MN, Gibney J, Smith TP. 2006. Specificity and clinical utility of methods for the detection of Macroprolactin. *Clin Chem* 52: 1366-1372.
6. Smith TP, Kavanagh L, Healy M-L, McKenna TJ. 2007. Technology insight: measuring prolactin in clinical samples. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 279-289.
7. Sapin R, Gasser F, Grucker D. 2002. Free prolactin determinations in hyperprolactinemic men with suspicion of macroprolactinemia. *Clin Chim Acta* 316: 33-41.
8. Vilar L, Naves LA, Freitas MC, Lima M, Canadas V, Albuquerque JL, et al. 2007. Clinical and laboratory features greatly overlap in patients with macroprolactinemia or monomeric hyperprolactinemia. *Minerva Endocrinol* 32: 79-86.
9. Ram S, Harris B, Fernando JJR, Gama R, Fahie-Wilson MN. 2008. False-positive polyethylene glycol precipitation tests for macroprolactin due to increased serum globulins. *Ann Clin Biochem* 45: 256-259.
10. Landberga E, Wahlberg J, Rydén I, Arvidsson B-M, Ekman B. 2007. Detection of molecular variants of prolactin in human serum, evaluation of a method based on ultrafiltration. *Clinica Chimica Acta* 376: 220-225.
11. Casanueva FF, Molitch ME, Schlechte JA, Abs R, Bonert V, Bronstein MD, et al. 2006. Guidelines of the Pituitary Society for the diagnosis and management of prolactinomas. *Clin Endocrinol* 65: 265-273.